



Institut für Molekulare Virologie



Westfälische Wilhelms-  
Universität Münster

**Auftragsforschungsprojekt:  
Institut für Molekulare Virologie / Fa. Wilms  
(AF 930143)**

**Untersuchung wässriger Extrakte aus Kiefernkernholz  
und ihre Wirkung auf die Vermehrung von  
Influenza A Viren**

**- Abschlussbericht -**

# I. INHALTSVERZEICHNIS

I. INHALTSVERZEICHNIS .....	2
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
III. ZUSAMMENFASSUNG .....	5
1. EINLEITUNG.....	6
1.1.    Aufbau und Eigenschaften von Influenzaviren.....	6
1.1.1.    Aufbau .....	6
1.1.2.    Replikation.....	7
1.2.    Therapie und Prophylaxe.....	8
1.2.1.    Antivirale Eigenschaften von Pflanzenextrakten.....	8
1.3.    Fragestellung der Arbeit.....	8
2. MATERIAL und METHODEN.....	9
2.1.    Material.....	9
2.1.1.    Zellen und Virusstämme.....	9
2.1.2.    Zellkultur .....	9
2.1.3.    SDS PAGE und Western Blot.....	10
2.2.    Methoden .....	11
2.2.1.    Untersuchungen zur Zell-Viabilität von Madin-Darby canine kidney Zellen und A549 Zellen.....	11
2.2.1.1.    Morphologische Untersuchungen .....	11
2.2.1.2.    PI-Färbung.....	11
2.2.2.    Untersuchung auf antivirale Effekte der Kiefernholzextrakte.....	12
2.2.2.1.    Nachweis viraler Proteine.....	12
2.2.2.2.    Plaque Assay.....	12
2.2.2.3.    Immunfärbung des FPV Nucleoproteins.....	13
3. ERGEBNISSE.....	14
3.1.    Effekte der Extrakte auf die Zell-Viabilität von Madin-Darby canine kidney Zellen und A549 Zellen.....	14
3.1.1.    Morphologische Veränderungen.....	14
3.1.2.    Zytolethaler Effekt der Extrakte .....	17
3.2.    Effekt der Extrakte auf die Replikation von Influenza A Virus .....	19

3.2.1.	Reduktion des infektiösen Virustiters in Madin-Darby canine kidney Zellüberständen .....	19
3.2.2.	Reduktion der intrazellulären, viralen Proteinmenge.....	21
3.2.3.	Lokalisierung des FPV Nucleoproteins.....	22
3.2.4.	<i>Time of addition</i> -Kinetik.....	24
4.	DISKUSSION .....	25
4.1.	Antivirale Eigenschaften der untersuchten Pflanzenextrakte .....	25
4.2.	Ausblick.....	26
5.	LITERATUR.....	27

## II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A549	humane Lungeneithelzelllinie
bzw.	beziehungsweise
DOC	Desoxycholsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK2	extracellular signal regulated kinase 2
FITC	Fluoreszin-5-Isothiocyanat
FCS	fetal calf serum, Hitze-inaktiviert
FPV	fowl plague virus
NP	Nucleoprotein
NP-40	Octylphenolpoly(ethyleneglycolether)
M	Matrixprotein
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MDCK	Madine-Darby canine kidney Zellen, Hunde Nierenepithelzelllinie
PR8	Influenza A/Puerto-Rico/8/34
PI	Propidiumjodid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
rpm	revolutions per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
u.s.w.	und so weiter
% (v/v)	Volumenprozent; prozentualer Anteil des Volumens am Gesamtvolumen
% (w/v)	Gewichtprozent; prozentualer Anteil des Gewichts am Gesamtvolumen
u.a.	unter anderem

### III. ZUSAMMENFASSUNG

Die anti-pathogene Wirkung, verschiedener in der Literatur beschriebener Pflanzenextrakte wird oftmals auf die Anwesenheit von Polyphenolen zurückgeführt. Es gibt bereits publizierte Daten, die belegen, dass das Kernholz von Kiefern antimikrobielle Substanzen enthält. Im Rahmen der vorliegenden Auftragsforschungsstudie wurde die Wirkung eines von der Fa. Wilms zur Verfügung gestellten wässrigen Kiefern Kernholzextrakts auf die Replikation von Influenza Viren, spezifisch auf das humane Virusisolat A/Puerto-Rico/8/34 (PR8) und das hochpathogene Vogelgrippevirus A/fowl plague virus/Bratislava/79 (FPV) in verschiedenen Wirtszellen, spezifisch in Hundenierenepithelzellen (Madin-Darby canine kidney cells (MDCK)) sowie A549 Lungeneithelzellen *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Virustiter des infektiösen PR8 nach einer Inkubation der infizierten MDCK Zellen mit einer nicht zytotoxischen Extraktkonzentrationen von 25 % (v/v) im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu 100 % und der Virustiter von infektiösem FPV zu 90 % reduziert wurde. Beschränkte sich die Behandlung von MDCK Zellen mit 10 % oder 20 % (v/v) des Extrakts ausschließlich auf eine zweistündige Inkubation vor der Inokulation mit Virus, führte dies zu keiner signifikanten Reduktion des infektiösen Virustiters, sowohl von PR8 als auch von FPV. Ebenso wurde durch Western Blot Analysen gezeigt, dass eine sechsstündige Inkubation von PR8 infizierten MDCK Zellen mit Extrakt in nichttoxischen Konzentrationen (10 % und 25 % (v/v)) zu einer signifikanten Reduktion der viralen Nucleoprotein- und Matrixproteinmenge führte. Eine Immunfärbung des FPV Nucleoproteins in infizierten A549 Zellen welche mit 25 % (v/v) Extrakt behandelt wurden sowie kinetische Untersuchungen, bei denen der Extrakt (Endkonzentration 25 % (v/v)) zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu FPV-infizierten MDCK Zellen gegeben wurden, deuten auf eine frühe Inhibition des FPV Replikationszyklus durch den Kiefernholzextrakt, möglicherweise bereits auf der Ebene der Adsorption, hin. Der exakte antivirale Mechanismus der Kiefernholzextrakte konnte hierbei nicht aufgeklärt werden. Weitere Untersuchungen, gegebenenfalls mit fraktionierten Inhaltsstoffen der Extrakte könnten weitere Aufschlüsse über die Details des antiviralen Mechanismus geben.

# 1. EINLEITUNG

Influenza A Virusinfektionen treten jährlich, gehäuft in den Wintermonaten, in Form von Grippe Epidemien in Erscheinung. Nach Angaben des Robert Koch Instituts in Berlin gab es allein in Deutschland von Oktober 2004 bis April 2005 zwischen 22000 und 32000 Influenza assoziierte Hospitalisierungen (Buchholz, 2005). Neben epidemisch auftretenden Influenzaviren sind auch pandemische Stämme von Influenza A Viren bekannt, die in der Vergangenheit immer wieder zu großen Grippepandemien geführt haben, wie z.B. 1918 im Falle der so genannten *Spanischen Grippe* mit weltweit zwischen 20 und 40 Millionen Toten (Taubenberger et al. 2005). Die Entwicklung von antiviralen Wirkstoffen gegen Influenza A Virusinfektionen ist daher von großem medizinischem Interesse.

## 1.1. Aufbau und Eigenschaften von Influenzaviren

Influenza Viren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*, deren Vertreter ein segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom in Negativstrang-Orientierung besitzen. Unter den Influenzaviren sind es besonders die Influenza A Viren, die über virushaltige Aerosole auf den Menschen, aber auch auf Schweine, Geflügel und Pferde übertragen werden können und dort eine fiebrige Infektion der Atemwege, die Influenza oder Virusgrippe, hervorrufen.

Durch die Segmentierung des Genoms der Influenzaviren, ist es möglich, dass bei einer Infektion einer Wirtszelle mit verschiedenen Influenzavirus Typen, Reassortanten durch den sogenannten *antigenic shift* entstehen. Durch diesen Mechanismus können durch den Austausch ganzer Genomsegmente Influenza Viren entstehen, die völlig neue Eigenschaften zeigen (Modrow et al. 2003). Man nimmt an, dass sich durch diesen Mechanismus auch das Pandemie Virus von 1918 an den Menschen adaptieren konnte.

### 1.1.1. Aufbau

Als Vertreter der *Orthomyxoviridae* sind Influenza A Viruspartikel pleomorph. Sie kommen hauptsächlich in der sphärischen Form vor und haben einen Durchmesser von 120 nm. Das Genom besteht aus acht einzelsträngigen RNA-Segmenten die mit Nucleoproteinen (NP) assoziiert sind und von einer Hüllmembran umgeben werden. In die Membran sind die glycosylierten Proteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) sowie das M2 Protein eingelagert. Die Innenseite der Membran wird von Matrixproteinen (M) ausgekleidet. Zur Transkription und Replikation des Virusgenoms besitzt das Influenzavirus einen RNA-abhängigen RNA-Polymerase Komplex, bestehend aus den Untereinheiten PB1 (RNA-

abhängige RNA-Polymerase), PB2 und PA. Zusammen mit den Nucleoproteinen bildet er das Nucleocapsid.

### 1.1.2. Replikation

Die Influenzavirusreplikation beginnt mit der Adsorption der Viruspartikel an die Wirtszelle. Dazu bindet die HA<sub>1</sub> Untereinheit der HA Proteine an Neuraminsäure gekoppelte Glycoproteine auf der Oberfläche von Epithelzellen<sup>1</sup>. Anschließend erfolgt die Endocytose der Viruspartikel und die Freisetzung der Nucleocapside aus dem Endosom in das Cytoplasma (*Uncoating*). Von dort werden die Nucleocapside in den Zellkern transportiert, wo es im Folgenden zur Transkription und Replikation des Virusgenoms kommt<sup>2</sup>. Für das *Uncoating* ist eine Konformationsänderung der HA<sub>2</sub> Untereinheit des HA Proteins durch die Ansäuerung des Endosoms Voraussetzung. Erst dadurch gelangt die fusogene Region der HA<sub>2</sub> Untereinheit in die unmittelbare Nähe der Endosomenmembran und induziert so die Fusion der Lipiddoppelschichten.

Nach dem Transport der viralen mRNAs aus dem Kern in das Cytoplasma erfolgt die Translation und Prozessierung der Virusproteine. Nach der Translation der membranassoziierten Virusproteine an der ER Membran und der nachfolgenden Prozessierung im Golgi-Apparat, werden die Proteine über Golgi-Vesikel zur Cytoplasmamembran transportiert. Die im Cytoplasma translatierten Proteine (PB1, PB2, PA, NP, M, NS1, NS2/NEP) wandern in den Zellkern und assoziieren dort mit den Genomsegmenten zu Nucleocapsiden. Diese gelangen über einen NS2/NEP vermittelten Transport aus dem Zellkern an die Stellen der Cytoplasmamembran, die einen erhöhten Gehalt an eingelagertem M, HA und NA aufweisen. Hier kommt es zum *Budding* und

---

<sup>1</sup> Für die Infektiosität der Viren ist die Spaltung des HA Vorläuferproteins durch intra- oder extrazelluläre, Furin-ähnliche Proteasen in die Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> unbedingt notwendig, weil nur dadurch, die für die Adsorption und das *Uncoating* verantwortlichen Domänen des HA-Proteins ausgebildet werden.

<sup>2</sup> Die Bildung von mRNA erfolgt durch die Transkription genomischer RNA, durch die, bereits im Virion vorhandene, RNA-abhängige RNA-Polymerase und dem Anfügen einer 5' *Cap*-Struktur und eines 3' poly(A) Schwanzes zellulärer mRNA-Vorläufer. Die spätere, virale Genom Replikation verläuft zunächst über die Bildung von komplementärer RNA (cRNA) mit positiver Polarität, die wiederum als Matrize für die Synthese der genomischen RNA, dient.

schließlich zur enzymatischen Abspaltung der Viruspartikel durch die Aktivität des NA-Proteins (Modrow et al. 2003).

## 1.2. Therapie und Prophylaxe

Der Einsatz von Impfstoffen, in Form von abgetöteten Viren, ist heutzutage die gängige Praxis als prophylaktischer Schutz gegen epidemisch auftretende Influenza Virusinfektionen. Neben dem Einsatz von Impfstoffen, gibt es eine Reihe von Wirkstoffen, die virale Proteine und Funktionen inhibieren (wie z.B. der Neuraminidase-Inhibitor *Oseltamivir*). Darüber hinaus werden Ansätze diskutiert, replikationsfördernde, intrazelluläre Signalkaskaden, wie z.B. MAPK abhängige Signalwege, zu inhibieren und auf diesem Wege der Virusreplikation entgegenzuwirken (Ludwig et al. 2003).

### 1.2.1. Antivirale Eigenschaften von Pflanzenextrakten

Neben den bekannten, oftmals synthetischen, antiviralen Wirkstoffen, die gezielt den Replikationsprozess unterbrechen oder inhibieren, ist eine Vielzahl von Naturstoffen, die in Form von Pflanzenextrakten eine nachweislich antivirale, antibakterielle und antifungizide Wirkung *in vitro* und *in vivo* zeigen. Es wird vermutet, dass bei vielen Pflanzen die antiviralen Eigenschaften auf die Anwesenheit von Polyphenolen zurückzuführen sind (Che 1991), die der chemisch sehr heterogenen Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe angehören. Der genaue, antivirale Wirkmechanismus der Polyphenole in solchen Extrakten ist jedoch noch unbekannt.

## 1.3. Fragestellung

Durch die Hinweise auf Polyphenole als antiviral wirkende Komponenten in polyphenolreichen Pflanzenextrakten, sollten im Rahmen dieser Arbeit, ein vermutlich ebenfalls polyphenolreicher, wässriger Extrakt aus Kiefernholz, hinsichtlich der Wirkung auf die Replikation von PR8 und FPV in A549 und MDCK Zellen untersucht werden. Im ersten Teil der Arbeit sollten zunächst mögliche toxische Effekte der Kiefernholzextrakte auf die verwendeten Wirtszellen untersucht werden, während im zweiten, virologischen Teil der Arbeit, die Effekte der Extrakte auf die Replikation verschiedener Influenza A Viren untersucht wurde.

## 2. MATERIAL und METHODEN

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Zellen und Virusstämme

Im Rahmen der Arbeit wurde mit der humanen Lungenepithelzelllinie A549 sowie mit Epithelzellen aus der Hunde-Niere (Madin-Darby canine kidney cells; MDCK) gearbeitet. Die Lagerung erfolgte bei  $-172^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden zur Infektion entweder mit dem humanen Virusstamm Influenza A/Puerto-Rico/8/34 (H1N1) oder mit einem hochpathogenen Vogelgrippevirus A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (fowl plague virus; FPV) inokuliert.

#### 2.1.2. Zellkultur

A549 Zellen wurden zum Wachstum in GlutaMAX™ HAM's F12 Nutrient Mixture, 1-fach und MDCK Zellen in GlutaMAX™ D-MEM Nutrient Mixture, 1-fach (beide Gibco™ Cell Culture, Invitrogen, Deutschland) mit jeweils 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/ Streptomycin (100-fach) in Petrischalen (10 cm Durchmesser) oder 6-Well Platten inkubiert. Vor und nach der Inokulation mit virushaltigen Lösungen wurden die Zellen mit Medium inkubiert, das statt FCS, 0.6 % (v/v) Albumin aus Rinderserum enthielt. Das Kiefernkernelholzextrakt aus zwei unterschiedlichen Extraktionen wurden in diesem Medium verdünnt. Zur Auszählung von infektiösen Viren im Plaque Assay wurden MDCK Zellen nach der Infektion mit einem 2-fach Plaque Medium aus 69.3 % (v/v) 2-fach MEM Medium (Tab. 2.1.1) und 29.7 % (v/v) eines 3 % (w/v) Oxoid Agars (Sigma, Deutschland) sowie 1 % (v/v) Ca,Mg Lösung (100-fach) bedeckt. Im Falle einer Inokulation mit PR8-haltigen Lösungen wurde dem 2-fach Plaque Medium 0.1 % (v/v) Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen, Deutschland) zugesetzt<sup>3</sup>.

Die Inkubation der Zellen, ebenso wie die Inokulation mit virushaltigen Lösungen, erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus, Deutschland) bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter 5 %  $\text{CO}_2$ -Begasung. Zum Verdünnen von virushaltigen Lösungen wurde PBS mit 1 % (v/v) Albumin aus Rinderserum (35 % w/v) und 0.6 % (v/v) einer Calcium- (1% (w/v)) und Magnesium- (1% (w/v)) haltigen Lösung verwendet. Bei einer Vorinkubation von Virus mit dem Extrakt, wurde der Extrakt zuvor ebenfalls in dieser Lösung verdünnt.

---

<sup>3</sup> Trypsin wird zur Spaltung des HA Vorläuferproteins zugesetzt.

**Tab. 2.1.1: Zusammensetzung des 2-fach MEM Mediums**

Komponente	Anteil (% v/v)
steriles Wasser (Sigma, Deutschland)	78
GlutaMAX™ D-MEM Nutrient Mixture, 10-fach (Gibco™cell Culture, Invitrogen, Deutschland)	14
Penicillin/ Streptomycin (je 10,000 µg/ml)	1,4
NaHCO <sub>3</sub> -Lösung	4,0
1 % (w/v) DEAE-Dextran Lösung (Sigma, Deutschland)	1,4
35 % (w/v) Albumin aus Rinderserum	0,8

### 2.1.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

MDCK Zellen wurden mit RIPA Puffer (1 % (v/v) NP-40, 0.5 % (v/v) DOC, 1 % (w/v) SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 90 % H<sub>2</sub>O dest., 200 µM Pefablock, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 1 mM Natrium-Vanadat, 5 mM Benzamidin) lysiert. Die Proteingemische wurden mittels SDS PAGE in einer mit SDS Puffer gefüllten Elektrophorese Kammer (BioRad, Deutschland) aufgetrennt. Der SDS Puffer enthielt: 25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS. Als Probenpuffer wurde ein 5-fach SDS Puffer in der folgenden Zusammensetzung verwendet: 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerol, 25 % (β-Mercaptoethanol, 0.01 % Bromphenolblau, 312 mM Tris). Für die SDS PAGE wurden 10 % Gele mit der in Tab.2.1.2 gezeigten Zusammensetzung verwendet. Die Gele wurden in einer ElektrobloTTing Apparatur (BioRad, Deutschland) in Gegenwart eines BloTTing Puffers (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0.037 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol) auf eine Nitrocellulosemembran gebloTTet. Die Membranen wurden mit BloTTing Puffer mit folgender Zusammensetzung gebloTTet: 5 % (w/v) Magermilch in TBST (1 M Tris pH 7.4, 5 M NaCl, 1 ml Twen 20).

**Tab. 2.1.2: Zusammensetzung eines 10 % SDS Polyacrylamid Gels**

	Komponente	Volumen (ml)
Sammelgel	Rotiphorese Gel30™ (Roth, Deutschland)	0.50
	Stacking-Puffer <sup>1)</sup>	3.25
	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat Lösung	0.05
Trenngel	Rotiphorese Gel30™ (Roth, Deutschland)	3.40
	Running-Puffer <sup>2)</sup> (pH 9)	2.50
	Aqua dest.	4.10
	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat Lösung	0.10

<sup>1)</sup> 0.14 M Tris pH 6.8, 0.11 % (v/v) Temed, 0.11 % (w/v) SDS

<sup>2)</sup> 1.5 M Tris pH 9, 0.4 % (v/v) Temed, 0.4 % (w/v) SDS

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Untersuchungen zur Zell-Viabilität von Madin-Darby canine kidney Zellen und A549 Zellen**

Um die hypothetische antivirale Eigenschaft der Kieferholzextrakte zu untersuchen, war es zunächst notwendig, mögliche, zytotoxische Eigenschaften der Substanz zu erkennen. Da die Virus Replikation auf physiologisch intakte Wirtszellen angewiesen ist, könnte ein vermeintlicher antiviraler Effekt ebenso auf zytotoxische Eigenschaften der Substanz und der damit verbundenen Schädigung der Wirtszelle, zurückzuführen sein. Es ist deshalb notwendig zunächst die Effekte der Extrakte auf die Viabilität der Wirtszellen zu untersuchen.

#### **2.2.1.1. Morphologische Untersuchungen**

Einen ersten Hinweis auf den physiologischen Zustand von Zellen erhält man durch die Betrachtung der Zellmorphologie. Dazu wurden jeweils auf zwei 12-Well Platten  $0.5 \times 10^5$  A549 Zellen und  $10^5$  MDCK Zellen pro Well ausgesät und 24, 48 oder 72 Stunden mit 850  $\mu$ l pro Well 0 %, 10 %, 25 %, 50 % oder 100 % (v/v) Extrakt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Phasenkontrast bei 200-facher Vergrößerung mittels eines inversen Mikroskops (Zeiss, Deutschland) untersucht und mit einer Canon Digitalkamera fotografiert.

#### **2.2.1.2. Propidiumiodid (PI)-Zellfärbung**

PI bindet an DNA in dem es zwischen die Basen interkaliert. PI ist nicht in der Lage die Membran lebender Zellen zu passieren, und dringt nur in tote Zellen ein. Aufgrund dieser unterschiedlichen Permeabilität, lässt sich nach einer Behandlung der Zellen mit PI zwischen PI-gefärbten, toten Zellen und lebenden Zellen unterscheiden. Zu diesem Zweck wurden jeweils  $10^5$  MDCK und A549 Zellen pro Well mit 1.5 ml mit 0 %, 10 %, 20 %, 25 %, 50 % oder 100 % (v/v) des Kiefernholzextrakts 24 oder 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Zellüberstand in einem Probenröhrchen gesammelt. Die Zellen wurden danach mit 1 ml PBS gewaschen und der Überstand ebenfalls gesammelt. Nach der Zugabe von 200  $\mu$ l Trypsin pro Well und anschließender, 10 minütiger Inkubation bei 37° C, wurden 700  $\mu$ l pro Well extraktfreies Medium zugegeben und die abgelösten Zellen gesammelt. Sämtliche Zellsuspensionen wurden vereinigt und 5 Minuten bei 450 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit 2 ml PBS gewaschen und das Pellet in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen. Anschließend wurden 25  $\mu$ l PI zu der Zellsuspension gegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Mittels eines Durchflusszytometers (FACSCalibur, BD Bioscience, USA) wurden die Zellen anschließend hinsichtlich ihrer Größe (detektiert durch den FSC-H Kanal) und der Stärke, des durch Anregung (488 nm) von PI emittierten Lichts (ungefähr 600 nm, detektiert durch den FL2-H Kanal) analysiert.

## 2.2.2. Untersuchung auf antivirale Effekte der Kiefernholzextrakte

### 2.2.2.1. Nachweis viraler Proteine

Um mögliche Effekte einer Inkubation von MDCK Zellen mit Kiefernholzextrakten auf die intrazelluläre Menge Akkumulation viraler Proteine zu untersuchen, wurden Monolayer konfluent gewachsener MDCK Zellen 30 Minuten lang vor und sechs Stunden nach Infektion mit PR8 (MOI: 5 *pfu* pro Zelle) mit 0 %, 10 %, 25 % oder 50 % (v/v) Kiefernholzextrakt inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen und danach mit RIPA Puffer 30 Minuten bei 4° C lysiert. Die Lysate wurden anschließend 5 Minuten bei 20000 x g 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit 10 µl 5-fach SDS Puffer versetzt und 8 Minuten bei 100° C inkubiert. Die Proben und ebenso ein mitaufgetragener Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Deutschland) wurden anschließend elektrophoretisch mittels SDS PAGE in einem 10 % Gel bei 30 mA zwei Stunden aufgetrennt.

Die Proteine wurden danach durch Elektroblothing (200 mA für zwei Stunden) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach dem Blotten wurden die Membranen mit jeweils 10 ml Blocking Puffer für 30 Minuten blockiert. Nach dem Blockieren wurden die Membranen zunächst mit jeweils 10 ml eines in Magermilch verdünnten, primären Antikörpers (Tab. 2.2.1) über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper abgesaugt und die Membran dreimal mit TBST gewaschen. Danach erfolgte bei Raumtemperatur, für 45 Minuten die Inkubation mit jeweils 10 ml eines sekundären, Peroxidase konjugierten Antikörpers, der gegen den jeweiligen ersten Antikörper gerichtet war. (Tab. 2.2.1). Die Membranen wurden nach dem Absaugen des sekundären Antikörpers erneut dreimal in TBST gewaschen und anschließend mit 2 ml Entwicklerlösung (Amersham, Deutschland) versetzt. Das emittierte Licht aus der Reaktion der Peroxidase mit der Entwicklerlösung, wurde durch 30 minütiges Auflegen eines lichtempfindlichen Films detektiert.

**Tab. 2.2.1: Im Rahmen der Untersuchung detektierte Proteine und dazu verwendete Antikörper**

detektiertes Protein	primärer <sup>1)</sup> Antikörper	sekundärer <sup>2)</sup> Antikörper (Santa Cruz Biotechnology)
NP	anti-NP aus Maus (1:1000)	anti-Maus (1:2500)
M	anti-M aus Maus (1:1000)	anti-Maus (1:2500)
ERK2 <sup>*)</sup>	anti-ERK2 aus Kaninchen	anti-Kaninchen (1:2500)

<sup>\*)</sup> als Ladekontrolle detektierte, zelluläre Kinase; <sup>1)</sup> in TBST mit 5 % (w/v) Magermilch;

<sup>2)</sup> in TBST ohne Magermilch

### 2.2.2.2. Plaque Assay

Zur Ermittlung der Anzahl replikationsfähiger Viruspartikel pro ml Zellüberstand (infektiöser Virustiter) Extrakt-behandelter MDCK Zellen, wurden Monolayer konfluent gewachsener MDCK

Zellen 30 Minuten mit FPV (MOI: 0.005 *pfu* pro Zelle) oder PR8 (MOI: 0.01 *pfu* pro Zelle) inokuliert. Die Zellen oder das Virus wurden entweder 30 Minuten oder 2 Stunden vor der Inokulation mit 1 ml pro Well 10 %, 20 %, 25 % oder 50 % (v/v) Extrakt vorinkubiert (das Virus wurde auf Eis vorinkubiert). Nach der Inokulation erfolgte die weitere Inkubation der Zellen mit 1 ml pro Well extrakthaltigem oder extraktfreiem Medium für 8, 24, 30 oder 36 Stunden. Zur Bestimmung des infektiösen Titers wurden anschließend die Zellüberstände gesammelt. Monolayer konfluent gewachsener MDCK Zellen in 6-Well Platten wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 500 µl pro Well der verdünnten Zellüberstände, 30 Minuten inokuliert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 2 ml 2-fach Plaquemedium bedeckt. Der im 2-fach Plaquemedium enthaltene Agar, blockiert die Virusmotilität, so dass es zur Ausbildung von Plaques kommt, weil nur angrenzende Zellen infiziert werden. Nach zwei bzw. drei Tagen Inkubation (für FPV bzw. PR8 inokulierte Zellen) bei 37° C, wurden die Plaques nach Anfärbung mit Neutralrot gezählt und der Titer bestimmt (Anzahl der Plaques x Verdünnungsstufe x 2).

### **2.2.2.3. Immunfärbung des FPV Nucleoproteins**

Auf sterilisierten Deckgläschen, in einer 24-Well Platte, gewachsene A549 Zellen ( $10^5$  Zellen pro Well) wurden einmal mit PBS gewaschen und mit jeweils 0 %, 10 %, 15 %, 20 % oder 25 % (v/v) Kiefernholzextrakt 30 Minuten inkubiert und anschließend 30 Minuten mit FPV (MOI: 200 *cfu* pro Zelle) inokuliert. Nach dem Absaugen der Viruslösung wurden die Zellen wieder mit den entsprechenden Extraktkonzentrationen für eine Stunde inkubiert und danach einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 3.7 % (v/v) Formaldehyd (in PBS) inkubiert und danach zweimal je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Im folgenden wurden die Zellen je fünf Minuten bei -20° C mit 30 %, 60 % und 100 % (v/v) Aceton (in PBS) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (je fünf Minuten mit PBS) wurden die Zellen 20 Minuten bei 37° C mit 10 % (v/v) FCS blockiert und anschließend zweimal je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit je 300 µl pro Well eines anti-NP Maus Antikörpers (1:1000 in PBS verdünnt) 30 Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend, nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS, erneut 10 Minuten mit 10 % FCS bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen ein weiteres mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation (30 Minuten bei 37° C) mit einem sekundären FITC-konjugierten anti-Maus Ziegen Antikörpers (1:300 in PBS verdünnt, 300µl pro Well). Nach zweimaligem, je fünfminütigem Waschen der Zellen wurden die Deckgläschen mit der beschichteten Seite auf einen Objektträger mit Eindeckelmedium gelegt und mit Nagellack abgedichtet. Die Zellen wurden anschließend mittels eines Umkehrmikroskops (Zeiss, Deutschland) und einer Kamera bei 400-facher Vergrößerung unter Blaulicht-Anregung des FITC Farbstoffs fotografiert.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Effekte der Extrakte auf die Zell-Viabilität von Madin-Darby canine kidney Zellen und A549 Zellen

##### 3.1.1. Morphologische Veränderungen

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den zwei getesteten Kiefernholzextrakt Chargen, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Morphologie von MDCK und A549 Zellen.

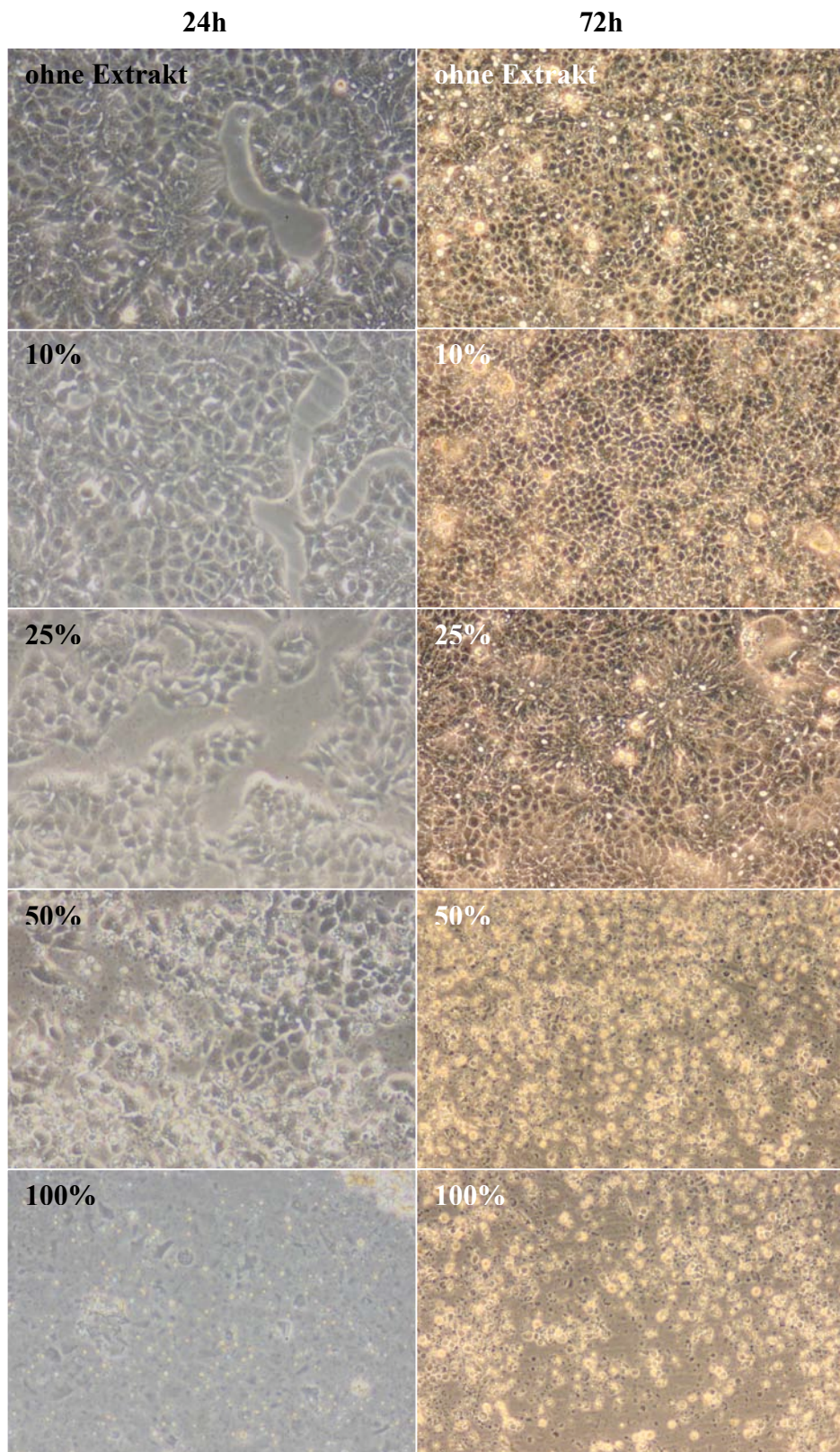
Eine 24 stündige Inkubation von MDCK Zellen mit 10 % und 25 % (v/v) Extrakt induzierte keine sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen; im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ließen sich keine morphologischen Unterschiede erkennen (Abb. 3.1). Eine 24 stündige Inkubation mit 50 % (v/v) Extrakt führte dagegen bei einigen Zellen zu einer Abkuglung der Zelloberfläche.

Nach 72 Stunden waren sowohl die unbehandelten Zellen als auch, die mit 10 % und 25 % (v/v) Extrakt behandelten Zellen, konfluent gewachsen. Es waren nur vereinzelt, abgekugelte Zellen zu erkennen, die sich aus dem Monolayer gelöst hatten. Dagegen zeigten die Zellen nach einer 72 stündigen Inkubation mit 50 % (v/v) Extrakt kein konfluentes Wachstum. Nahezu alle Zellen zeigten eine abgekugelte Oberfläche.

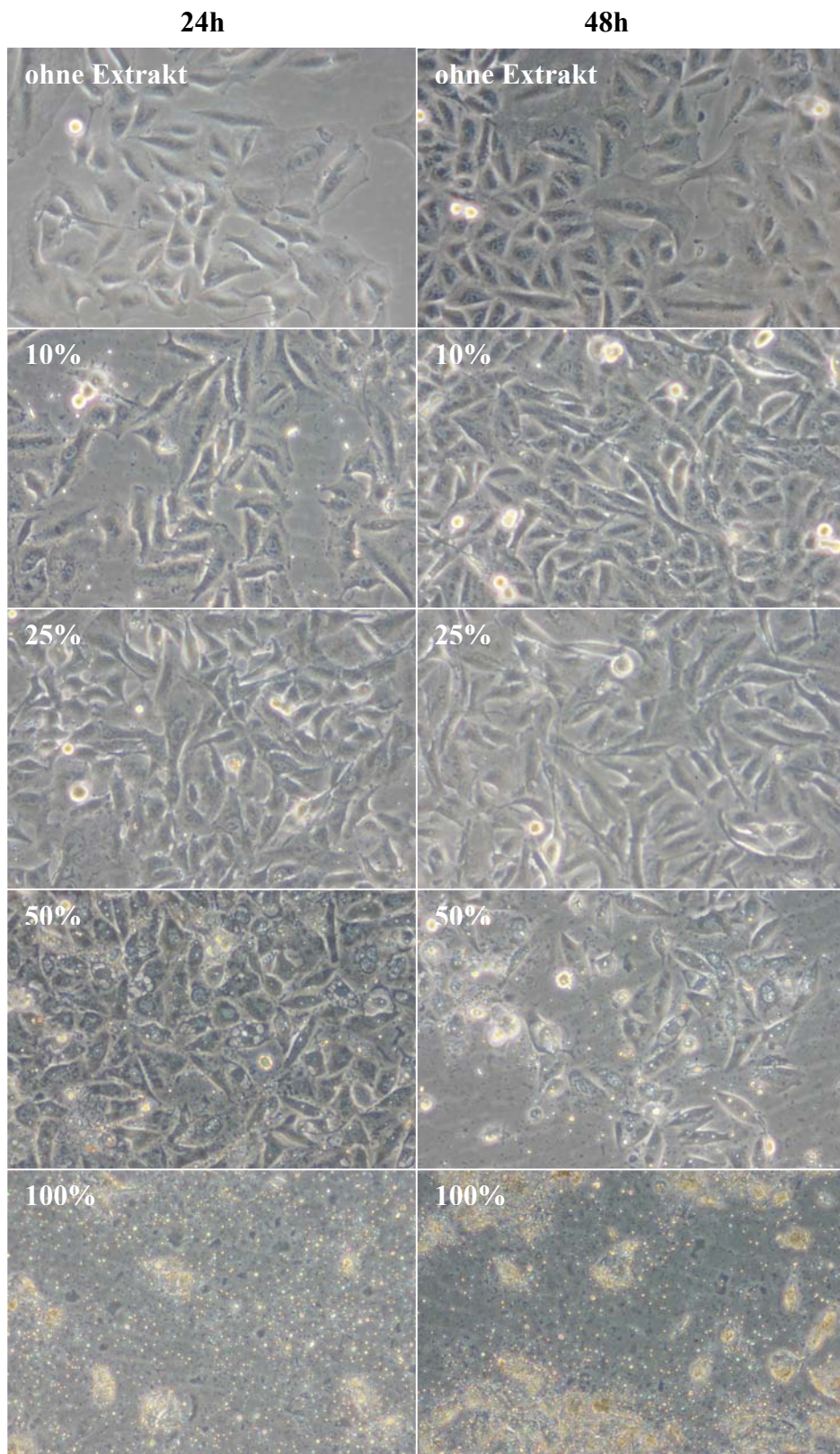
Eine Inkubation der MDCK Zellen mit 100 % Extrakt führte dazu, dass sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 72 Stunden die meisten Zellen lysiert waren. Es zeigten sich nur noch Zelltrümmer und vereinzelt, abgekugelte Zellen.

Ähnliche Effekte waren bei A549 Zellen zu beobachten. Eine 24 stündige Inkubation mit 10% und 25 % Extrakt führte zu keinen signifikanten, morphologischen Veränderungen (Abb. 3.2). Auch nach 72 Stunden zeigten die mit 10 % und 25 % (v/v) Extrakt behandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede zu den unbehandelten Zellen. Dagegen führte bereits eine 24 stündige Inkubation mit 50 % (v/v) Extrakt bei einigen Zellen zu einer Abkuglung der Oberfläche. Ebenso zeigten sich, im Unterschied zu den unbehandelten Zellen, in einigen A549 Zellen vakuoläre Strukturen. Eine 48 stündige Inkubation mit 25 % (v/v) Extrakt, führte zu den gleichen Befunden.

A549 Zellen die mit 100 % (v/v) des Kiefernholzextrakts behandelt wurden zeigten keine klaren Zellstrukturen mehr. Sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 48 Stunden waren nur noch Zellfragmente zu erkennen.



**Abb. 3.1.: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen eines Kiefernholzextrakts auf die Morphologie von Madin-Darby canine kidney Zellen.** Die Zellen wurden jeweils 24 und 72 Stunden mit oder ohne Extrakt-haltigem Medium in der gezeigten Konzentration % (vol/vol) bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einem inversen Mikroskop (Zeiss, Deutschland) und einer Digitalkamera bei 200-facher Vergrößerung im Phasenkontrast fotografiert.

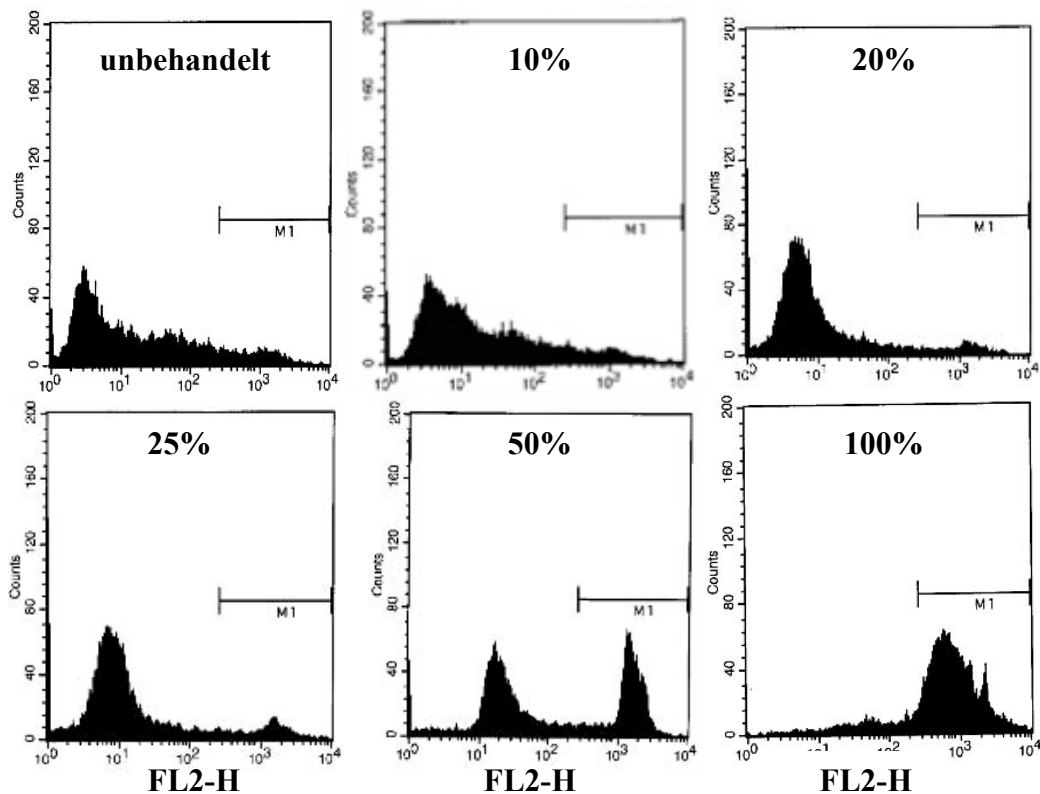
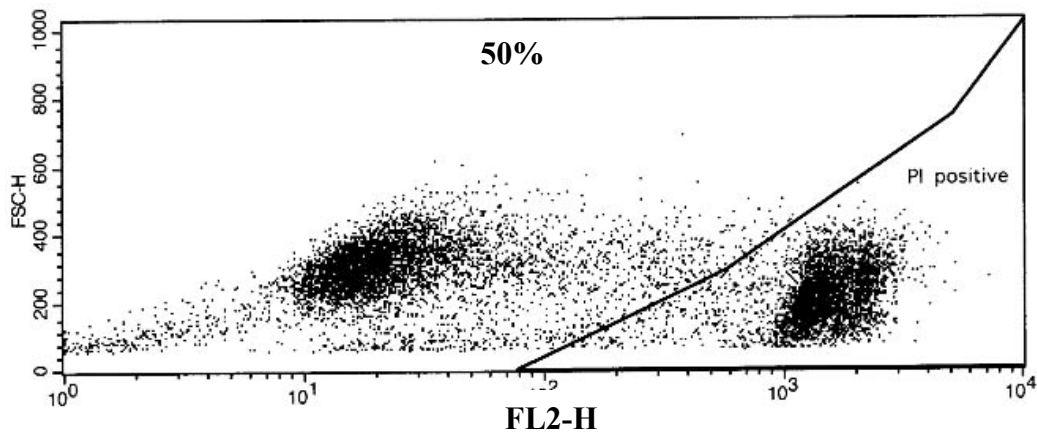


**Abb. 3.2:** Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen eines Kiefernholzextrakts auf die Morphologie von A549 Zellen. Die Zellen wurden jeweils 24 und 48 Stunden mit oder ohne Extrakt-haltigem Medium in der gezeigten Konzentration % (vol/vol) bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einem inversen Mikroskop (Zeiss, Deutschland) und einer Digitalkamera bei 200-facher Vergrößerung im Phasenkontrast fotografiert.

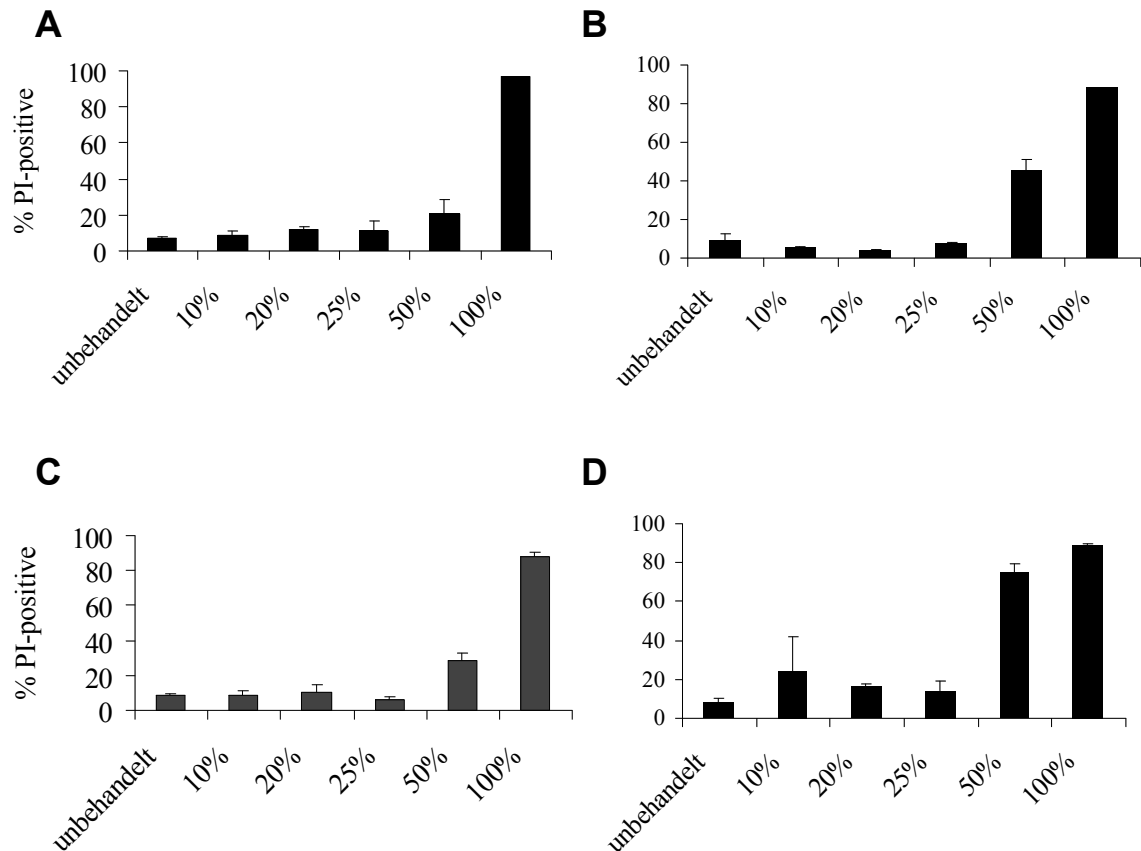
### 3.1.2. Untersuchung potentieller zytotoxischer Effekte der Extrakte

Um zwischen lebenden und toten Zellen nach einer Extraktbehandlung genauer zu differenzieren, wurden extrakt-behandelte MDCK Zellen und A549 Zellen mit PI inkubiert (Abschnitt 2.2.1.2.). Die Analyse der Zellen in einem Durchflusszytometer (beispielhaft für A549 Zellen in Abb. 3.3 gezeigt) zeigt, dass mit zunehmender Konzentration des Extrakts, die Anzahl der A549 Zellen, die eine, der PI-Färbung entsprechenden Fluoreszenzstärke zeigen (Zellen in M1, Abb. 3.3 A), ansteigt. Der Dot Plot in Abbildung 3.3 B, der neben der Fluoreszenzstärke auch die Größe der Zellen berücksichtigt, zeigt, dass es durch die Behandlung mit 50 % (v/v) Extrakt zu einer Teilung der Zellpopulation in zwei Subpopulationen von A549 Zellen kam: PI gefärbte Zellen (rechte Wolke) und ungefärbte, lebende A549 Zellen (linke Wolke). Beide Zellpopulationen liegen nahezu auf der gleichen Höhe und unterscheiden sich daher nur geringfügig hinsichtlich ihrer Größe. Die gleichen Ergebnisse, jedoch mit unterschiedlichen prozentualen Anteilen an PI positiven Zellen, wurden für MDCK Zellen erhalten (Daten nicht gezeigt).

Abb. 3.4 fasst die Ergebnisse der Durchflusszytometrie hinsichtlich der prozentualen Verteilung PI positiver A549 und MDCK Zellen zusammen. Wie sich zeigt, wirkt der Extrakt erst ab einer Konzentration von 50 % (v/v) zytotoxisch auf A549 und MDCK Zellen. Dieser Effekt tritt jedoch erst nach 48 Stunden Inkubation ein. Über 70 % der A549 und MDCK Zellen sind nach 24 stündiger Behandlung mit 50 % (v/v) Extrakt noch PI negativ und daher lebend. Nach 48 stündiger Inkubation mit 50 % Extrakt liegt der Anteil PI- positiver MDCK Zellen um ungefähr 35 % höher als bei A549 Zellen, so dass MDCK Zellen offensichtlich empfindlicher auf den Extrakt reagieren, als A549 Zellen. Extraktkonzentrationen von 10 %, 20 %, 25 % (v/v) wirken kaum zytotoxisch auf die Zellen; über 80 % der Zellen sind nach der 48 stündigen Inkubation PI-impermeabel und daher lebend. Die Ergebnisse der PI-Färbung stimmen somit mit den Befunden der morphologischen Untersuchung der Zellen (Abschnitt 3.1.1.) überein.

**A****B**

**Abb. 3.3.: Lebend-Tot Selektion von A549 Zellen durch Propidiumjodid (PI) Behandlung und anschließender Analyse mittels eines Durchflusszytometers (FACSCalibur™, BD Bioscience, USA).** Die Zellen wurden vor der PI Behandlung 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen (v/v) eines Kiefernholzextrakts bei 37°C inkubiert. Nach der Zellernte wurden 5 % (v/v) PI zur Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden anschließend hinsichtlich der Fluoreszenzstärke, des durch Anregung (488 nm) von PI emittierten Lichts (ungefähr 600 nm) und der Größe analysiert. A) Verteilung der analysierten Zellen hinsichtlich der Fluoreszenzstärke, B) Zusammensetzung einer Zellpopulation aus A nach Inkubation mit 50 % (v/v) des Kiefernholzextrakts hinsichtlich der Zellgröße und der Fluoreszenzstärke. Schwarz umrandetes Feld: definiertes Gate PI gefärbter (PI-positiver) Zellen. Pro Ansatz wurden  $10^4$  Zellen analysiert.



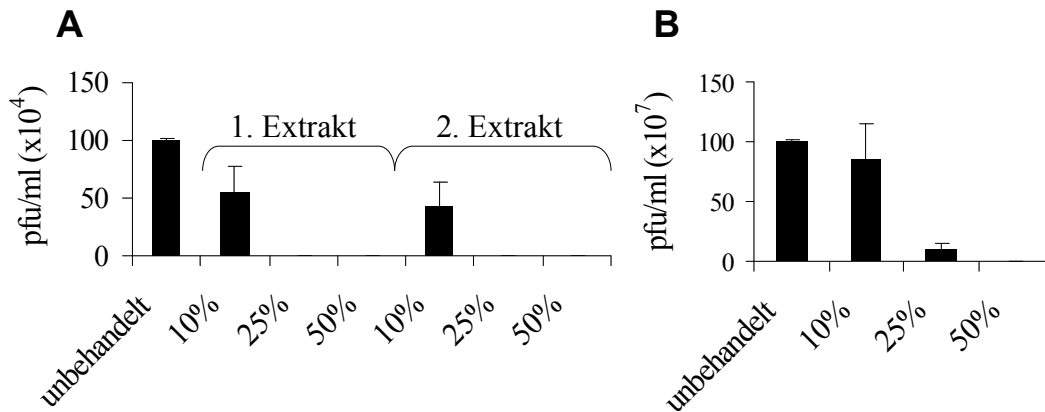
**Abb. 3.4.:** Prozentuale Verteilung Propidiumjodid (PI-) gefärbter (PI-positiver) A549 und Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Kiefernholzextrakts. A549 Zellen wurden 24h (A) und 48h (B) ebenso MDCK 24h (C) und 48h (D) in Medium mit der entsprechenden Konzentration (vol. %) eines Kiefernholzextrakts bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation mittels Durchflusszytometrie analysiert und der prozentuale Anteil PI-positiver Zellen an der Gesamtpopulation analysierter Zellen dargestellt. Pro Ansatz (*unbehandelt*, 10%, 20 % u.s.w.) wurden  $10^4$  Zellen analysiert.

## 3.2. Effekt der Extrakte auf die Replikation von Influenza A Virus

### 3.2.1. Reduktion der Virusvermehrung in MDCK Zellen

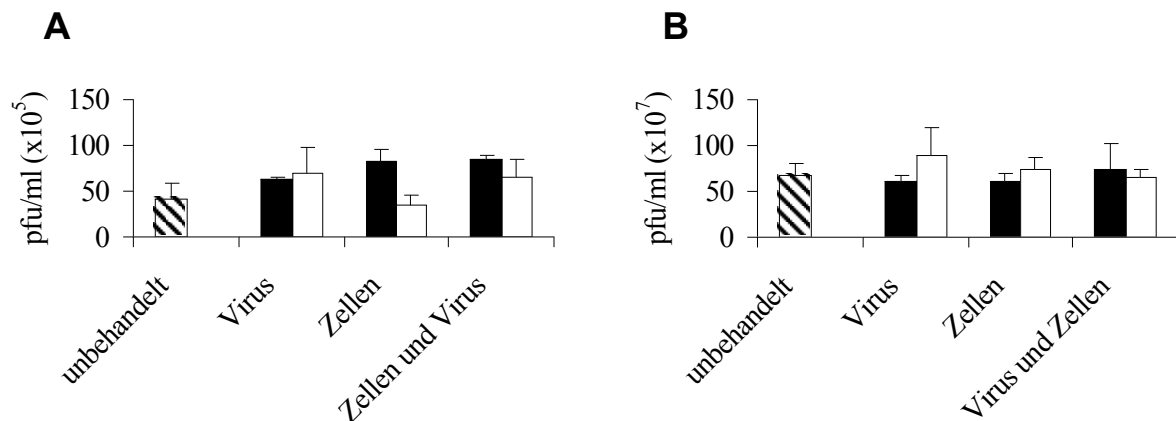
Es zeigte sich eine signifikante Reduktion replikationsfähiger Viruspartikel im MDCK Zell-Überstand, wenn die Zellen sowohl vor als auch nach der Infektion mit Extrakt behandelt wurden. So wurde der infektiöse PR8-Titer im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, nach einer Inkubation der Zellen mit Extraktkonzentrationen von 10 % (v/v) bereits reproduzierbar um 50 % reduziert, während Konzentrationen von 25 % (v/v) bereits zu einer >99% Reduktion führten (Abb.3.5 A). Die zweite Extraktcharge zeigte den gleichen Effekt.

Dagegen kam es nach einer FPV Inokulation erst ab einer Extraktkonzentration von 25 % (v/v) zu einer signifikanten Reduktion des infektiösen Virustiters von ungefähr 90 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 3.5 B).



**Abb. 3.5: Reduktion des infektiösen Virustiters in den Zellüberständen von Influenza A Virus infizierten MDCK Zellen nach Inkubation mit Kiefernholzextrakten.** A) Virustiter 30 Stunden nach einer Infektion mit Influenza A/Puerto-Rico/8/34 (MOI: 0.01 pfu/Zelle); B) Virustiter 36 Stunden nach einer Infektion mit dem fowl plague Virus (MOI: 0.005 pfu/Zelle). Die Zellen wurden vor und nach der Inokulation mit dem Virus, mit extraktenthaltigem Medium bei 37°C inkubiert. Das Medium der unbehandelten Zellen enthielt kein Extrakt. Extraktchargen 1 und 2 in A) unterscheiden sich hinsichtlich des Extraktionszeitpunkts, es handelt sich ansosnten um den gleichen Kiefernholzextrakt. In B) wurde der erste Extraktcharge A benutzt.

Eine zweistündige, getrennte Vorinkubation von Virus oder Zellen oder von Virus und Zellen mit 10 % und 20 % (v/v) Extrakt sowie die weitere 24 stündige Inkubation der Zellen nach der Inokulation, in Extrakt-freiem Medium, führte zu keiner signifikanten Reduktion des infektiösen Virustiters sowohl von FPV als auch PR8 (Abb. 3.6). Desweiteren lassen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Inkubationsbedingungen (Abb. 3.6) erkennen; weder die Vorinkubation des Virus noch die der Zellen vor der Inokulation, führte zu signifikanten Unterschieden in der Höhe des infektiösen Virustiters.



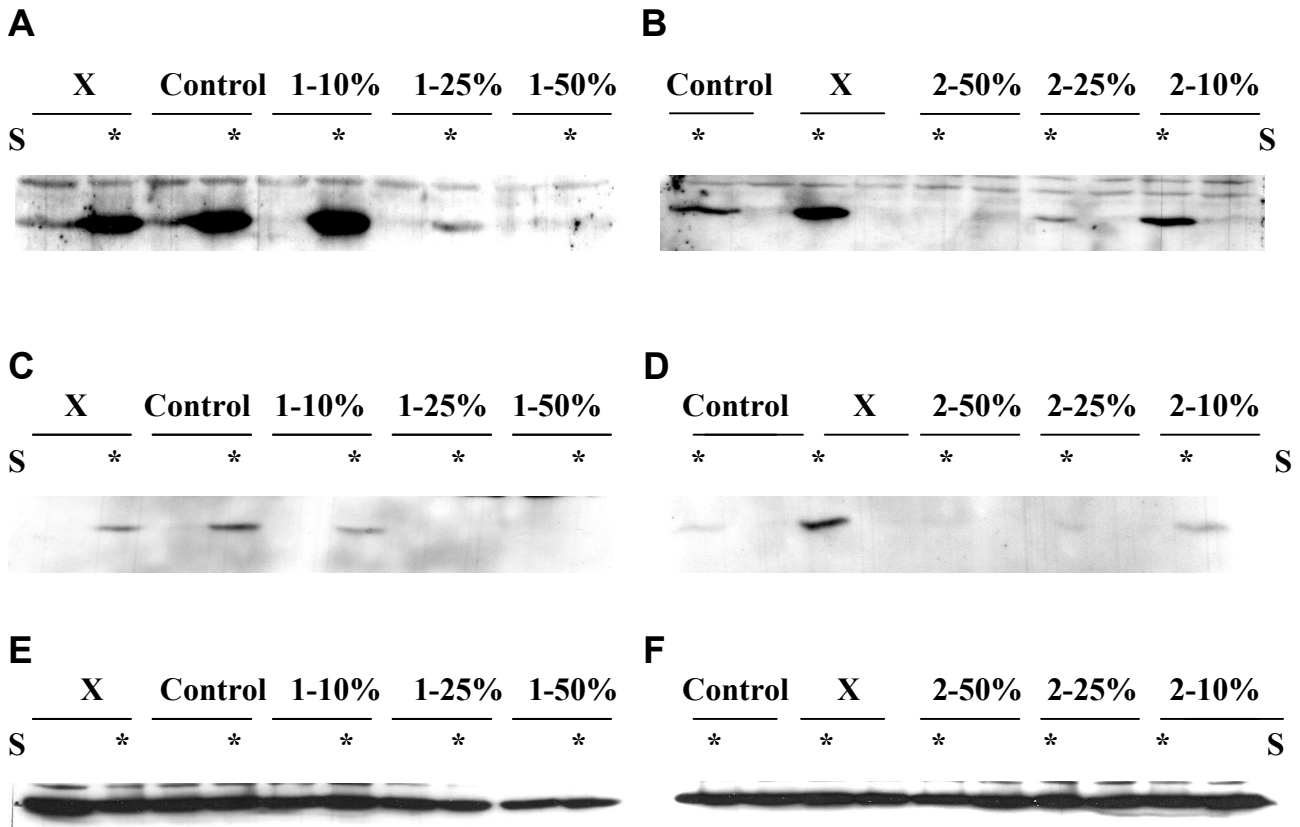
**Abb. 3.6:** Effekte einer zweistündigen Vorinkubation von Influenza A Virus und MDCK Zellen mit 10 vol. % (■) und 20 vol. % (□) eines Kiefernholzextrakts auf den Virustiter. Gezeigt ist der Virustiter des Zellüberstands, 24 Stunden nach einer Infektion mit Influenza A/Puerto Rico/8/34; MOI: 0.01 pfu/Zelle (A) und dem fowl plague Virus; MOI: 0.005 pfu/Zelle (B). Während der Vorinkubation wurde entweder nur das Virus (*Virus*) oder nur die Zellen (*Zellen*) oder sowohl das Virus, als auch die Zellen (*Zellen und Virus*) vor der Infektion mit den entsprechenden Konzentrationen des Extrakts inkubiert. Das Virus wurde auf Eis und die Zellen bei 37° C vorinkubiert. Nach der Infektion, erfolgte die weitere Inkubation ohne Extrakt. Die unbehandelten Zellen wurden sowohl während der Vorinkubationszeit, als auch danach, mit Extrakt-freiem Medium inkubiert.

### 3.2.2. Reduktion der intrazellulären viralen Proteinmenge

Durch Western Blots (Abb. 3.7) konnte gezeigt werden, dass das Nucleoprotein (55 kDa, Abb.3.7 A und B), und das Matrixprotein (28 kDa<sup>4</sup>, Abb. 3.7 B und C) von PR8 nach einer Inkubation der MDCK Zellen mit 50 % (v/v) der Kiefernholzextrakte, auf nicht mehr detektierbare Mengen reduziert wurde, während die Menge des zellulären Proteins ERK2 (Abb. 3.7 D und E) unbeeinflusst blieb.

Bereits 25 % (v/v) der Kiefernholzextrakte führten zu einer signifikanten Reduktion der NP Menge im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Das Matrixprotein konnte dagegen bereits bei 25 % (v/v) nicht mehr detektiert werden.

<sup>4</sup> Modrow et al. 2003



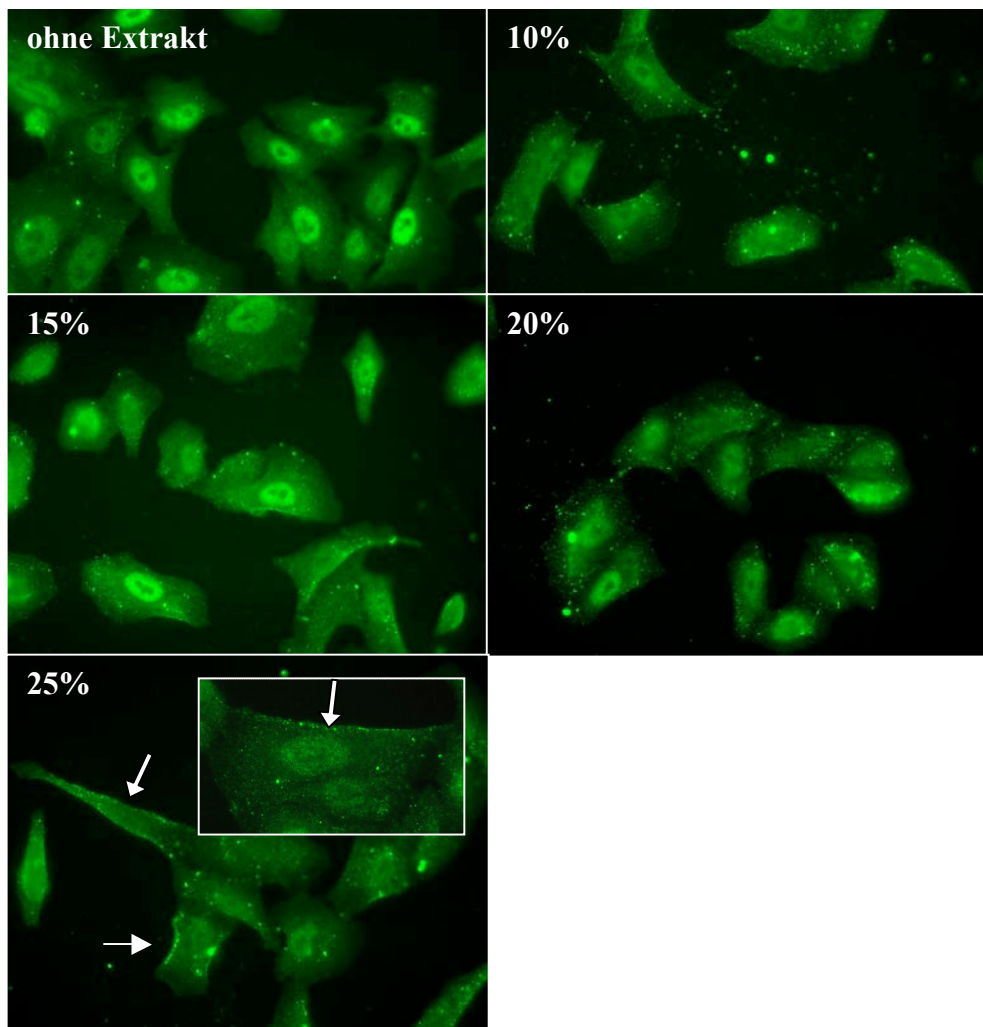
**Abb. 3.7: Nachweis des Nucleoproteins (A, B) und des Matrixproteins (C, D) von Influenza A/Puerto-Rico/8/34 (PR8) in Zelllysaten von Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen, sechs Stunden nach der Inokulation mit PR8 (MOI: 5 *pfu* pro Zelle). Zur Überprüfung einer gleichmäßigen Proteinbeladung des Gels wurde das zelluläre Protein ERK2 detektiert (E und F). Die Proteine wurden mit den in Tab. 2.2.1 genannten Antikörpern nachgewiesen. PR8-infizierte MDCK Zellen (\*), wurden 30 Minuten vor der Infektion und für 6 Stunden danach mit den angezeigten Konzentrationen % (v/v) eines Kiefernholzextrakts und eines Kontrollextrakts (Control) bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Die unbehandelten Zellen (X) wurden vor und nach der Infektion mit Extrakt-freiem Medium inkubiert. Es wurden zwei Kiefernholzextraktechargen, „1-x %“ und „2-x %“, eingesetzt, die sich hinsichtlich des Extraktionszeitpunkts unterschieden. S: Molekulargewichtsstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Deutschland), Angaben in kDa.**

### 3.2.3. Lokalisierung des viralen Nucleoproteins in A549 Zellen

In einer Immunfluoreszenzfärbung ist es möglich, das Nucleoprotein sowohl als neu gebildetes Protein im Kern einer infizierten Zelle als auch assoziiert mit den infektiösen Viruspartikeln nachzuweisen. Das FPV Nucleoprotein trat als neu gebildetes Protein bei den unbehandelten A549 Zellen am deutlich im Zellkern auf (Abb. 3.7). Dagegen waren die Zellkerne und das Zytoplasma der Zellen, die mit 25 % (v/v) des Kiefernholzextrakts behandelt wurden, deutlich schwächer gefärbt. Das NP konnte in diesem Fall vermehrt auf der Zelloberfläche detektiert werden, wobei es sich hier um NP innerhalb von Viruspartikeln

handelt (Abb.3.7, Pfeile). Dies deutet darauf hin, dass die Viren in diesem Versuchsansatz nicht effizient in die Zelle eindringen können.

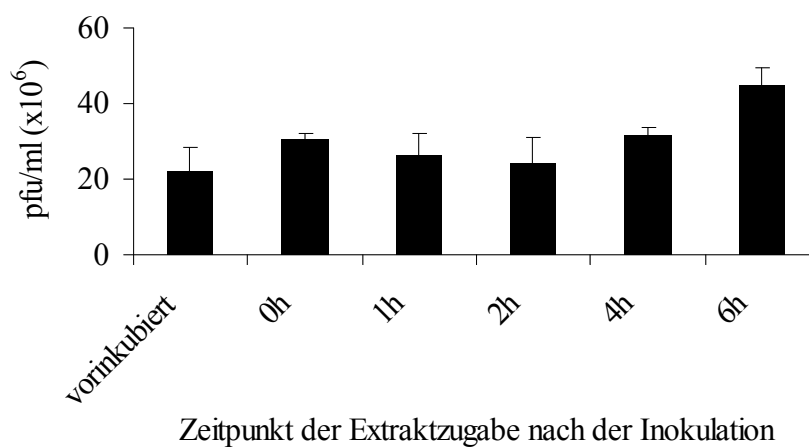
Weniger deutliche Unterschiede in der Färbung der Zellen zeigten sich nach einer Inkubation mit 10 %, 15 % oder 20 % (v/v) Extrakt. Nach einer Inkubation mit 10 % und 15 % (v/v) Extrakt waren die Zellkerne und das Zytoplasma immer noch stark gefärbt, während die Färbung der Zellkerne bei 20 % (v/v) Extrakt nur geringfügig schwächer war.



**Abb. 3.7: Immunfärbung des fowl plague Virus (FPV) Nucleoproteins (NP).** A549 Zellen wurden 30 Minuten vor einer Infektion mit FPV (MOI: 200 *pfu*/Zelle) und für eine Stunde nach der Infektion mit einem Kieferholzextrakt in den angegebenen Konzentrationen (Vol. %) bei 37° C inkubiert. Die unbehandelten Zellen wurden mit Extrakt-freiem Medium inkubiert Die Detektion erfolgte durch Blaulicht Anregung (~488 nm) eines Fluorescein-5-isothiocyanat konjugierten anti-Maus Antikörpers aus der Ziege, der gegen einen primären anti-NP Antikörper aus der Maus gerichtet war und grünes Licht (~520nm) emittierte. Die Pfeile markieren die Stellen, an denen sich das Nucleoprotein in Viruspartikeln auf der Zelloberfläche angereichert hat. Alle Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Umkehrmikroskop bei 400-facher Vergrößerung gemacht.

### 3.2.4. *Time of addition*-Kinetik

Wurde der Kiefernholzextrakt (25 % (v/v)) bis zu zwei Stunden nach einer Inokulation mit FPV zu den MDCK Zellen gegeben, betrug der Virustiter der Nachkommenviren zwischen  $2 \times 10^7$  und  $3 \times 10^7$  pfu pro ml. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Höhe des Virustiters, wenn der Extrakt zu früheren Zeitpunkten zu den Zellen gegeben wurde (Abb. 3.8.). Wurde der Extrakt erst nach vier Stunden oder sechs Stunden nach der Inokulation zugefügt, kam es dagegen zu einem signifikanten Anstieg des Virustiters auf bis zu  $4 \times 10^7$  pfu pro ml.



**Abb. 3.8: *Time of addition* –Kinetik.** MDCK Zellen wurden mit dem fowl plague Virus (FPV) inokuliert (MOI: 0.1 pfu/Zelle). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation wurde ein Kiefernholzextrakt in einer Endkonzentration von 25% (v/v) zugesetzt. Acht Stunden nach der Inokulation wurde die Anzahl der infektiösen Viruspartikel (*plaque forming units*; pfu) in den Zellüberständen bestimmt. In einem Vergleichsansatz wurden die Zellen 30 Minuten vor der Inokulation mit dem Extrakt inkubiert. Die weitere Inkubation erfolgte ebenfalls in Extrakt-haltigem Medium. In dem „0h“-Ansatz wurde unmittelbar nach der Inokulation der Extrakt zugegeben.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Antivirale Eigenschaften der untersuchten Kiefernkernelholzextrakte

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Zell-Viabilität zeigen, dass Extraktkonzentrationen bis zu 50 % (v/v) innerhalb von 48 Stunden keine signifikanten zytotoxischen Effekte auf A549 Zellen haben. Eine 48 stündige Inkubation mit 50 % (v/v) Extrakt ist dagegen für die Mehrzahl der MDCK Zellen toxisch (80 % PI positive Zellen). Die beobachteten Effekte der Extrakte auf die Virusreplikation (Reduktion des infektiösen Virustiters und Reduktion der viralen Proteinmenge), sollten daher im Falle von A549 Infektionen mit Influenza A Virus, nicht auf zytotoxischen Effekten der Extrakte basieren, während bei MDCK Zellen die antiviralen Effekte bei 50 % (v/v) Extrakt zumindest teilweise auch auf einen cytotoxischen Effekt der Extrakte zurückgeführt werden müssen.

Es konnte mit Hilfe der Plaque Assay Experimente gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Extrakts während Infektion, entscheidend für die beobachtete Reduktion des infektiösen Titers *in vitro* ist. Wurden die Zellen oder das Virus mit den Extrakten vorinkubiert und anschließend in extraktfreiem Medium inkubiert, führte dies zu keiner signifikanten Reduktion des Titers. Offensichtlich kommt es während der zweistündigen Vorinkubation mit 10 % oder 20 % (v/v) Extrakt auch zu keiner Stimulation der Zellen, die prophylaktisch eine Infektion mit PR8 oder FPV verhindert.

Ob sich die Wirkung des Extrakts gegen das Virus oder gegen zelluläre Funktionen während der Replikation richtet konnte in dieser Untersuchung nicht geklärt werden. Andere Experimente mit Pflanzenextrakten oder gereinigten Polyphenolen deuten auf eine spezifische Inhibierung zellulärer Funktionen während der Virusreplikation hin (Palamara et al. 2005). Andererseits könnte auch ein unspezifischer Mechanismus zu einer Reduktion des Virustiters führen. So, wurde in diesem Zusammenhang über Tee-Polyphenole berichtet, die im Falle einer Influenza A Virusinfektion, ähnlich wie Immunglobuline wirken und die viralen Oberflächenproteine agglutinieren, so dass die Viruspartikel nicht mehr an die Zellen adsorbieren konnten und dadurch nicht von den Zellen internalisiert wurden (Nakayama et al. 1993). Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse der NP Immunfärbung gestützt, die darauf hindeuten, dass die FPV Partikel durch einen 25 % (v/v) Kiefernholzextrakt am Eintritt in die Zellen gehindert werden und offensichtlich auf der Zelloberfläche zurückbleiben.

Möglicherweise sind hierfür, ebenso wie im Fall der Tee-Polyphenole, die Polyphenole in den Kiefernholzextrakten verantwortlich.

Mit Hilfe der Western Blots konnte gezeigt werden, dass die Kiefernholzextrakte die intrazelluläre Menge an PR8 Nucleoproteinen und Matrixproteinen reduzieren. Ob die Reduktion auf eine spezifische Inhibition der viralen Proteinsynthese, oder eine generelle Beeinträchtigung der Endocytose zurückzuführen ist, bleibt unklar. Nimmt man an, dass der Extrakt die Internalisierung von PR8 inhibiert (wie vermutlich auch im Falle von FPV), so ließe sich die Reduktion der viralen Proteinmenge auf die geringere Anzahl internalisierter Viruspartikel zurückführen. Die Inhibition ist demnach bei 50 % Extrakt so stark, dass sich im Western Blot keine viralen Proteine mehr nachweisen lassen.

Die Ergebnisse der *Time of addition*-Kinetik zeigen, dass eine Extraktzugabe in der frühen Phase des FPV Replikationszyklus (in den ersten zwei Stunden), zu einer stärkeren Reduktion des infektiösen Virustiters führt, als zu spätern Zeitpunkten. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass der Replikationsprozess schon früh durch den Extrakt inhibiert wird und bestätigt die Befunde die bereits mit einem anderen polyphenolreichen Extrakt, ebenfalls bei einem Influenza A Geflügelvirus erhalten wurden (Serkedjieva und Hay 1998). Eventuell sind hierfür Polyphenole in den Kiefernholzextrakten verantwortlich, die möglicherweise durch die Bindung an ungespaltenes HA, dessen Spaltung, die für die Adsorption notwendig ist, inhibieren. Der Replikationsprozess wäre damit schon früh, auf der Ebene der Adsorption, inhibiert.

## 4.2. Ausblick

Versuche mit einem polyphenolreichen Pflanzenextrakt aus *Geranium sanguineum*, der durch immunmodulatorische Eigenschaften zu einer Verringerung des Virustiters und der Sterblichkeitsrate während einer Influenzainfektion bei Mäusen führte (Ivanova et al. 2005), zeigen, dass neben den hier vorgestellten antiviralen Eigenschaften eines Pflanzenextrakts *in vitro* auch *in vivo* polyphenolreiche Extrakte antivirale Eigenschaften zeigen. Vor diesem Hintergrund könnten antiviral wirkende Pflanzenextrakte oder daraus gereinigte Verbindungen, eine Möglichkeit in der Therapie gegen Wirkstoff-resistente Influenzaviren darstellen und ebenso eine Alternative für Grippe-Patienten sein, die eine Unverträglichkeit gegenüber herkömmlichen, synthetischen, antiviralen Medikamenten zeigen.

Da Pflanzenextrakte allgemein eine Vielzahl verschiedenster Verbindungen darunter auch Polyphenole (Tannine, Flavonoide, Catechine, Proanthocyanidine) beinhalten, ist es nicht möglich, die beobachteten antiviralen Effekte in dieser Untersuchung einer einzelnen

Verbindung aus dem Kiefernholzextrakt zuzuordnen. Da es sich um einen polyphenolreichen Extrakt handelt, liegt die Vermutung nahe, dass der antivirale Effekt auf Polyphenole zurückzuführen ist. Zur Aufklärung des antiviralen Mechanismus, könnten daher Untersuchungen, mit gereinigten Polyphenolen beitragen, wie bereits mit Resveratrol gezeigt (Palamara et al. 2005). Insbesondere kinetische Untersuchungen mit gereinigten Polyphenolen könnten erste Hinweise ergeben, auf welcher Ebene und wie Polyphenole auf die Replikation von Influenzaviren wirken.

Ogleich in dieser Studie ein antiviraler Effekt der Kiefernholzextrakte in Konzentrationen gezeigt werden konnte, die offensichtlich nicht zell-schädigend waren, so ist doch das „pharmakologische“ Fenster sehr gering. Bereits in einer 2-fach höheren Konzentration zeigten die Extrakte erste negative Wirkungen auf die Zellen. In der normalen Medikamentenentwicklung wird hier ein Faktor 10-100 gewünscht.

Um weitergehende Rückschlüsse ziehen zu können ist es nötig, den hier in Zellkultur gezeigten antiviralen Effekt auch im Tiermodell zu bestätigen, wobei aufgrund der benötigten Konzentrationen ausschließlich an eine lokale Anwendung im Respirationstrakt zu denken ist (Spray, Inhalation). Auch eine genaue Definition der wirksamen Inhaltsstoffe wäre wünschenswert.

## 5. LITERATUR

Buchholz, U., Haas, W., Guignard, A., Leitmeyer, K., Sagebiel, D. (2005). Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Influenza in der Saison 2004/05. *Epidem. Bull. Robert Koch-Institut* 33:295-306

Che, C.T. (1991). Plants as a source of potential antiviral agents. *Econ. Med. Plant Res.* 5:167-251

Ivanova, E., Toshkova, R., Serkedjieva, J. (2005). A plant polyphenol-rich extract restores the suppressed function of phagocytes in influenza virus-infected mice. *Microbes and Infection* 5:391-398

Ludwig, S., Planz, O., Pleschka, S., Wolff, T. (2003). Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy?. *Trends in Molecular Medicine* 9(2):46-52

Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. (2003). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Nakayama, M., Suzuki, K., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y., Shimamura, T. (1993). Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res.* 21:289-99

Palamara, A.T., Nencioni, L., Aquilano, K., De Chiara, G., Hernandez, L., Cozzolino, F., Circolo, M.R., Garaci, E. (2005). Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *J Infect Dis.* 191:1719-29.

Serkedjieva, J., Hay, A.J. (1998). In vitro anti-influenza virus activity of plant preparation from *Geranium sanguineum* L.. *Antiviral Research* 37:121-130

Tumpey, T.M., Basler, C.F., Aguilar, P.V., Zeng, H., Solorzano, A., Swayne, D.E., Cox, N.J., Katz, J.M., Taubenberger, J.K., Palese, P., Garcia-Sastre, A. (2005). Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 310(5745):77-80