

Aus dem

Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie
der Viruskrankheiten
Sektion für Molekulare Virologie

Antivirale Aktivität humaner Defensin-Derivate

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Pohlmann, Justus

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schindler

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. J. Lang

Tag der Disputation: 05.04.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis	2
1 Einleitung.....	7
1.1 Defensine	7
1.1.1 Struktur, Klassen und Vorkommen	7
1.1.2 Biologische Funktion.....	9
1.1.3 Mechanismen antiviraler Aktivität	10
1.1.4 Defensinfragmente	12
1.2 HCMV.....	13
1.2.1 Struktur und Aufbau.....	13
1.2.2 Zelltropismus und virales Entry.....	16
1.2.3 Reproduktionszyklus.....	18
1.2.4 Epidemiologie und Pathogenese der HCMV-Infektion.....	20
1.2.5 Diagnostik und klinische Manifestation	20
1.2.6 Therapie	22
1.3 Fragestellung	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Zelllinien	25
2.1.2 Viren	26
2.1.3 Peptide	27
2.1.4 Antikörper	27
2.1.5 Reagenzien, Kits und Enzyme.....	28
2.1.6 Nährmedien	30
2.1.7 Puffer und Lösungen	31
2.1.8 Klonierungsmaterialien (Primer, Enzyme, Puffer).....	32
2.1.9 Plasmide.....	32
2.1.10 guideRNA.....	33
2.1.11 Geräte	34
2.1.12 Software	34

2.2	Methoden	35
2.2.1	Zellkultur	35
2.2.2	Herstellung und Titration von HCMV-stocks	36
2.2.3	Infektionsassays mit HCMV	37
2.2.4	Versuche zur Bestimmung der Lokalisation und des molekularen Ziels von HD5 (1-9).....	40
2.2.5	Infektionsassay mit SARS-CoV2	43
2.2.6	Infektionsassays mit HIV	43
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Verkürzte Defensinderivate ohne Aktivität gegenüber HCMV	46
3.2	HD5(1-9) weist antivirale Aktivität über längere Zeiträume auf	50
3.3	HD5(1-9) ist in Zellkulturmedium bei 37°C stabil und zeigt nach Präinkubation antivirale Aktivität	51
3.4	Verlängerter <i>time of addition</i> -Assay bestätigt Entry-Hypothese	52
3.5	Kein quantifizierbarer Effekt von HD5(1-9) auf die Ausbreitung einer HCMV-Infektion.....	54
3.6	Targetidentifizierung durch biotinylierte Peptide.....	56
3.6.1	Biotinyliertes HD5(1-9) weist eine vergleichbare Wirksamkeit zu HD5(1-9) auf.....	56
3.6.2	Identifizierung molekularer Targets von HD5(1-9) mittels Massenspektrometrie	58
3.6.3	HCMV-Infektion von Target-KO-Zellen	60
3.6.4	Lokalisation von HD5(1-9) in HFF.....	63
3.7	Hinweis auf Interaktion zwischen Heparin und HD5(1-9)	65
3.8	HD5(1-9) inhibiert die Infektion mit HCMV auf Caco2-Zellen	66
3.9	Keine Aktivität von HD5(1-9) gegen SARS-CoV2	68
3.10	Mögliche Verstärkung der HIV-Infektion von CD4+-T-Zellen durch HD5(1-9)	69
4	Diskussion	72
4.1	Wirkspezifität von HD5(1-9) gegenüber HCMV	72
4.2	HD5(1-9) bleibt über eine Woche hinaus stabil und ist antiviral aktiv ..	73
4.3	Verlängerter <i>time of addition</i> -Assay bestätigt Entry-Hypothese	75

Inhaltsverzeichnis

4.4	Nähere Untersuchungen des Wirkmechanismus von HD5(1-9) bei der Blockierung des HCMV-Eintritts in die Zielzelle	76
4.5	Hinweise auf Interaktion von HD5(1-9) und Heparansulfat als Schlüssel zum Wirkmechanismus von HD5(1-9).....	78
4.6	Caco-2-Zellen als Modell der antiviralen Aktivität von HD5(1-9)	81
4.7	HD5(1-9) ist inaktiv gegenüber SARS-CoV2.....	82
4.8	HD5(1-9) könnte infektionssteigernd gegenüber HIV wirken.....	83
5	Zusammenfassung	85
6	Literaturverzeichnis.....	86
7	Erklärung zum Eigenanteil	99
8	Danksagung.....	100

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Systematik humaner Defensine
- Abb. 2: Aufbau eines HCMV-Partikels
- Abb. 3: Struktur des HCMV-Genoms
- Abb. 4: Attachment und Entry von HCMV
- Abb. 5: Aktivität der verkürzten Peptidderivaten von HD5(1-9)
- Abb. 6: Präzipitatbildung der verkürzten Peptidderivate bei Lösung in PBS
- Abb. 7: Antivirale Aktivität von HD5(1-9) bei 7-tägiger Inkubation
- Abb. 8: Aktivität von HD5(1-9) nach Präinkubation
- Abb. 9: Erweiterter *time of addition*-Assay mit HD5(1-9)
- Abb. 10: Wirkung von HD5(1-9) auf die Ausbreitung einer HCMV-Infektion
- Abb. 11: Linkerstruktur der biotinylierten Peptide
- Abb. 12: Vergleichbare Aktivität der biotinylierten Peptidderivate
- Abb. 13: Ergebnisse der Massenspektrometrie
- Abb. 14: Knockout-Effizienz der verschiedenen Konstrukte in ARPE-19
- Abb. 15: Infektionsraten der *Knockout-ARPE-19*
- Abb. 16: Visualisierung der biotinylierten Peptide auf HFF
- Abb. 17: Abschwächung der Wirkung von HD5(1-9) und Heparin bei gleichzeitiger Inkubation
- Abb. 18: Aktivität von HD5(1-9) gegen HCMV auf CaCo2
- Abb. 19: Keine antivirale Aktivität von HD5(1-9) gegen SARS-CoV2
- Abb. 20: Effekt von HD5(1-9) auf die HIV-Infektionsraten von primären T-Zellen
- Abb. 21: Untersuchung einer stimulatorischen Wirkung von HD5(1-9) auf T-Zellen

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	engl. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> ; akutes Immunschwächesyndrom
ARPE-19	engl. <i>arterial retinal pigmented epithelium</i> ; arterielle retinale Pigmentepithelzelllinie
Assay	Versuch
CaCo2	engl. <i>cancer of colon cells</i> ; Kolonkarzinom-Zelllinie
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> ; Unterscheidungsgruppen
CMV	Cytomegalievirus
CRISPR-Cas9	engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> ; Mechanismus zur Genomeditierung
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DE	engl. <i>delayed early</i> ; verzögert früh
<i>dense bodies</i>	dichte Körperchen/Vesikel
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> ; Zellkulturmedium
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
EGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i> ; verstärkt grün fluoreszierendes Protein
<i>Entry</i>	Eintritt
Env-protein	engl. <i>envelope protein</i> ; Hüllprotein
EXT1	Exostin-1
EXT2	Exostin-2

Abkürzungsverzeichnis

FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorter</i> ; durchflusszytometrisches Verfahren
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> ; fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung/Gramm
GALT	engl. <i>gut-associated lymphoid tissue</i> ; mit dem Gastrointestinaltrakt assoziiertes lymphatisches Gewebe
guideRNA	engl. <i>guide ribonucleic acid</i> ; zielgeleitete Ribonukleinsäure
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HBD	humane(s) beta-Defensin(e)
HCMV	engl. <i>human cytomegalovirus</i> ; humanes Zytomegalievirus
HD	humanes Defensin
HFF	engl. <i>human foreskin fibroblasts</i> ; humane Vorhautfibroblasten (Zelllinie)
HIV	engl. <i>human immunodeficiency virus</i> ; humanes Immundefizienzvirus
HNP	engl. <i>human neutrophil peptide</i> ; humanes Neutrophilen- Peptid
H ₂ O	Wasser
IC ₅₀	engl. <i>inhibitory concentration 50</i> ; Konzentration der 50%igen Inhibition
IE	engl. <i>immediate early</i> ; unmittelbar früh
Ig	Immunglobulin
IRL	engl. <i>internal repeat long</i> ; lange interne Wiederholung

Abkürzungsverzeichnis

IRS	engl. <i>internal repeat short</i> ; kurze interne Wiederholung
ITGA5	Integrin alpha5
ITGB1	Integrin β 1
IU	engl. <i>infectious units</i> ; infektiöse Einheiten
KO	engl. <i>knock-out</i> ; Ausschalten
<i>late</i>	spät
LB	engl. <i>lysogeny broth</i> ; Bakteriennährmedium
<i>live cell imaging</i>	Bildgebung lebendiger Zellen
LRP1	engl. <i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
min	Minute
mg	Milligramm
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> ; zentrale Oberflächenproteinkomplexe für immunologische Vorgänge
ml	Milliliter
<i>mock</i>	experimentelle unbehandelte Kontrolle
MOI	engl. <i>multiplicity of infection</i> ; Multiplizität der Infektion
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> ; kodierende Ribonukleinsäure
NEB10	klonierungskompetente Escherichia coli
ng	Nanogramm
NIEP	engl. <i>noninfectious enveloped particles</i> ; nicht infektiöse umhüllte Partikel
NK	natürliche Killer(-zellen)
nm	Nanometer

Abkürzungsverzeichnis

NRP2	Neuropilin 2; membranständiges Protein
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR α	engl. <i>platelet derived growth factor receptor alpha</i> ; plättchenabgeleiteter Wachstumsfaktorrezeptor α
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PNK	Polynukleotidkinase
rpm	engl. <i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SARS-CoV	engl. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i> ; schweres akutes Atemwegssyndrom verursachendes Coronavirus
SD	engl. <i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SiR	Silikon-Rhodamin
<i>stock</i>	engl. für „Vorrat“; Aliquot mit Virus, das für Experimente verwendet werden kann
<i>time of addition</i>	Zeitpunkt der Zugabe
TRL	engl. <i>terminal repeat long</i> ; lange endständige Wiederholung
TRS	engl. <i>terminal repeat short</i> ; kurze endständige Wiederholung

Abkürzungsverzeichnis

UL	engl. <i>unique long</i> ; spezifisch lang
<i>uncoating</i>	Prozess der Entmantelung
US	engl. <i>unique short</i> ; spezifisch kurz
V	Volt
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> ; gefäßabgeleiteter endothelialer Wachstumsfaktor
<i>well</i>	isolierte räumliche Einheit zur Reaktionsdurchführung
WT	Wildtyp
XYLT2	Xylosyltransferase 2
YFP	engl. <i>yellow fluorescent protein</i> ; gelb fluoreszierendes Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar

1 Einleitung

1.1 Defensine

Unter der Bezeichnung „Defensine“ werden zahlreiche Peptide zusammengefasst, die von verschiedenen Lebewesen gebildet werden (Ganz et al., 1994). Sie sind Effektoren eines wirkungsvollen Mechanismus der angeborenen Immunität mit einem sehr breiten Wirkspektrum, welches sich von verschiedenen Arten von Bakterien und Pilzen bis hin zu Viren erstreckt (Ganz et al., 2003).

1.1.1 *Struktur, Klassen und Vorkommen*

Defensine zeichnen sich durch eine hohe Abundanz an Cysteinen in ihrer Primärstruktur aus (Selsted et al., 1985). Außerdem weisen sie als kationische Peptide eine positive Gesamtladung auf. Charakteristisch für ihre Struktur sind intramolekulare Disulfidbrücken, welche sich zwischen den Cysteinresten ausbilden und zur Konformation der Gesamtmoleküle in einer β -Faltblattstruktur beitragen (Hill et al., 1991).

Die Defensine der Säugetiere werden in 3 Klassen unterteilt, die α -, β - und θ -Defensine (siehe Abb.1). Diese Unterteilung erfolgt nach Unterschieden in der Position der Cysteine und der Ausbildung der Disulfidbrücken. Während die α -Defensine Cysteinbrücken zwischen den Cysteinresten 1 und 6, 2 und 4 sowie 3 und 5 ausbilden, entstehen bei β -Defensinen Disulfidbrücken der Cysteine 1 und 5, 2 und 4 sowie 3 und 6 (Selsted et al., 1989; Tang et al., 1993). Die θ -Defensine zeichnen sich dagegen durch eine zirkuläre Struktur aus, welche sich aus den Cysteinpaarungen 1 und 6, 2 und 5 sowie 3 und 4 ergibt (Tang et al., 1999). Insbesondere die Positionen der Cysteine in den verschiedenen Defensinsequenzen sind zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert, was auf ihre Wichtigkeit für die Struktur und Funktionalität der Gesamtpeptide schließen lässt (Kagan et al., 1994).

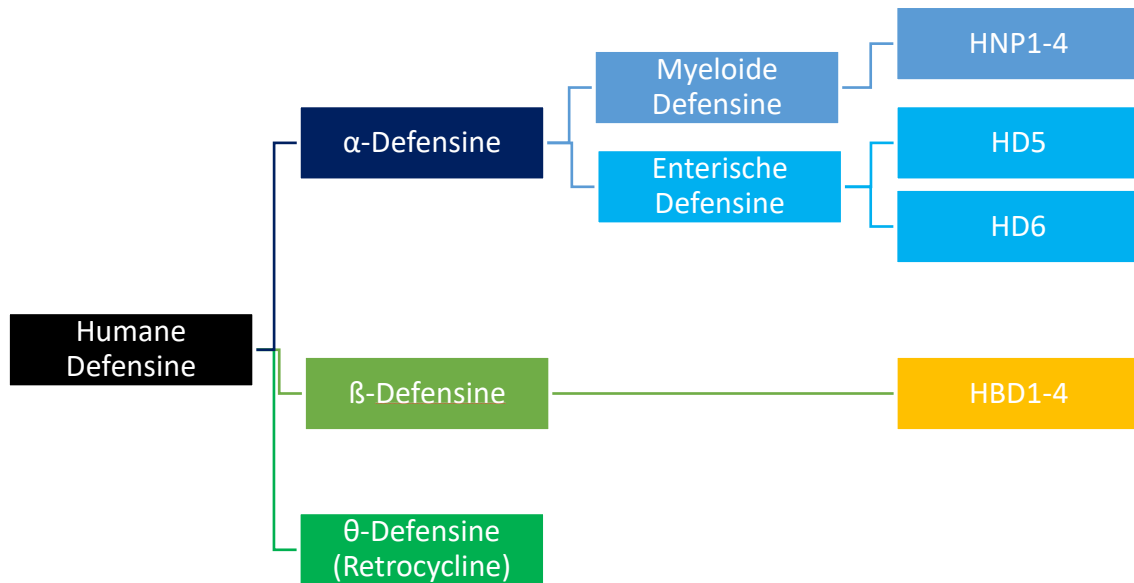


Abbildung 1: Systematik humaner Defensine

Nach strukturellen Gesichtspunkten erfolgt eine Gliederung der humanen Defensine in α -, β - und θ -Defensine.

Zu den humanen α -Defensinen werden die Peptide HNP1-4, die initial in den Granula der neutrophilen Granulozyten lokalisiert wurden und als *human neutrophil peptides* (HNPs) bezeichnet werden, gezählt. Diese Peptide machen etwa 5-7% des Gesamtproteinanteils neutrophiler Granulozyten aus (Ganz et al., 1985). Des Weiteren gehören die sogenannten humanen Defensine HD5 und HD6 zur Gruppe der α -Defensine. Sie wurden zunächst in den Paneth-Zellen lokalisiert (Porter et al., 1997). Bei diesen handelt es sich um merokrine Drüsenzellen, die sich vor allem am Boden der Lieberkühn'schen Krypten im Ileum und Jejunum finden (Paneth, 1887). Einige α -Defensine werden als Propeptide translatiert und noch intrazellulär in ihre wirksame Form gespalten (Valore and Ganz, 1992). Im Falle von HD5 erfolgt eine Sekretion des Propeptids mit folgender extrazellulärer Spaltung durch Trypsin (Ghosh et al., 2002). Neben dem bereits beschriebenen Vorkommen wurden verschiedene α -Defensine unter anderem in weiteren an der Immunabwehr beteiligten Zellen wie Monozyten oder NK-Zellen nachgewiesen. Das Vorkommen von HD5 wurde auch im weiblichen Genitaltrakt beschrieben (Quayle et al., 1998) und vereinzelt in Epithelien des Nasen-Rachen-Raums nachgewiesen (Frye et al., 2000).

Zu den humanen β -Defensinen zählen die Peptide HBD (= human beta defensin) 1-4. Diese werden hauptsächlich von verschiedenen Epithelzellen, vor allem im Urogenital- und dem respiratorischen System gebildet (Valore et al., 1998; Zhao et al., 1996). Des Weiteren sind auch Vorkommen in der menschlichen Haut beschrieben (Harder et al., 1997).

Die θ -Defensine werden *in vivo* beispielsweise in Rhesus-Makaken exprimiert (Tang et al., 1999). Eine korrespondierende mRNA findet sich im menschlichen Knochenmark, jedoch findet aufgrund eines Stop-Codons in der Sequenz keine Expression auf Proteinebene statt (Nguyen et al., 2003).

Den α - und β -Defensinen ist gemein, dass sie einen gemeinsamen Genlocus aufweisen, der auf ein gemeinsames evolutionäres Vorläufermolekül schließen lässt und die strukturellen Ähnlichkeiten begründet (Liu et al., 1997). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass die Defensine aus zwei Überfamilien hervorgegangen sind, welche das Disulfidmuster festlegen, sodass die Begriffe „cis-“ und „trans-Defensine“ vorgeschlagen werden (Shafee et al., 2016).

1.1.2 Biologische Funktion

Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften sind Defensine dazu prädestiniert, Poren in Membranen zu bilden (Kagan et al., 1990). Über diesen Mechanismus üben sie eine direkte Toxizität unter anderem gegen verschiedenste Arten von Bakterien und auch Pilze aus (Lehrer et al., 1989; Selsted et al., 1985).

Weitere beschriebene antibakterielle Mechanismen sind eine Interaktion mit der Zellwandsynthese oder die Neutralisation von Toxinen (Xu et al., 2020). Neben ihrer direkten antimikrobiellen Aktivität gelten Defensine außerdem als Signalmoleküle in der Initiation einer Immunantwort. So weisen α -Defensine beispielsweise eine chemotaktische Aktivität für Monozyten und weitere Immunzellen wie naive T-Zellen sowie dendritische Zellen auf (Territo et al., 1989; Yang et al., 2000). Auch werden verschiedene Signalkaskaden durch Defensine angestoßen, die zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion und Immunantwort führen (Yang et al., 1999).

Einige Defensine wie beispielsweise HNP1-4 werden von ihren Zellen konstitutiv exprimiert und gebildet. Gleichzeitig ist eine Induktion der Defensinexpression

und -sekretion unter anderem bei einer Inflammation beschrieben (Panyutich et al., 1993; Ayabe et al., 2000). Interferon- γ (IFN- γ) reguliert dabei beispielsweise die Sekretion der Paneth-Zell-Defensine. (Farin et al., 2014). Diskutiert wird zudem eine mitogene und möglicherweise heilungsfördernde Wirkung von Defensinen (Steinstraesser et al., 2008). Neben der Bedeutung der Defensine als Moleküle der antimikrobiellen Immunantwort wird ihre Rolle in der Tumorgenese und -suppression diskutiert. Es sind sowohl Induktion als auch Suppression verschiedener Defensine in Tumorgewebe beschrieben (Jin and Weinberg, 2019).

1.1.3 Mechanismen antiviraler Aktivität

Humane Defensine weisen ein breites, aber mechanistisch unterschiedliches antivirales Wirkspektrum auf. Eine direkte antivirale Aktivität gegenüber dem Herpes Simplex-Virus 1 wurde bereits früh beschrieben. Das Aktivitätslevel variiert deutlich zwischen den unterschiedlichen Defensinen und getesteten Viren. Insbesondere für HNP-1 wird eine breite antivirale Aktivität postuliert, welche am ehesten auf einer direkten Bindung an virale Partikel mit folgender Inaktivierung beruht. Die antivirale Aktivität ist hierbei von Temperatur, pH-Wert und Zugabezeitpunkt abhängig (Daher et al., 1986).

Gegenüber HIV-1 zeigen sich die myeloiden α -Defensine als potente Inhibitoren einer Infektion. Mechanistisch werden neben einer Interaktion mit dem viralen Env-Protein sowie den zellulären Rezeptoren auf funktioneller Ebene auch eine Hemmung der Virusaufnahme beschrieben. (Demirkhanyan et al., 2012)

Für die enterischen α -Defensine HD5 und HD6 werden hingegen proinfektiöse Eigenschaften gegenüber HIV-1 beschrieben. Diese werden vor allem über eine Steigerung der viralen Bindung an die Zelle mit den Defensinen als Mediator begründet (Rapista et al., 2011).

Mit Retrocyclin wurde ein auf der Sequenz der θ -Defensine basierendes Peptid künstlich hergestellt, das *in vitro* eine HIV-1 Infektion unterbindet (Cole et al., 2002). Mechanistisch wird analog zu den myeloiden α -Defensinen eine Blockade des Env-protein vermittelten Entry angenommen. Da eine Wirksamkeit auch

gegenüber mutierten HIV-1-Stämmen nachgewiesen wurde, gelten Retrocycline als eine potentielle Leitsubstanz der antiretroviralen Therapie (Wood et al., 2013).

Ebenfalls wird unter anderem auf Ebene des viralen Entry das Influenza-A-Virus von verschiedenen Defensinen gehemmt (Holly et al., 2017).

Auch gegenüber unbehüllten Viren weisen Defensine antivirale Eigenschaften auf. Die α -Defensine blocken die Infektion mit humanen Papillomviren, aber auch von Adenoviren oder Polyomaviren. Hierfür ist eine direkte Bindung der Defensine an Viruspartikel ausschlaggebend (Holly et al., 2017). Im Fall von humanen Papillomaviren wird das Uncoating und die Freisetzung aus dem Endosom unterbunden und die viralen Partikel zwar internalisiert, jedoch nicht intrazellulär freigesetzt (Wiens and Smith, 2017).

Neben direkten Effekten der Defensine gegenüber Viren spielen verschiedene indirekte Mechanismen in der körpereigenen antiviralen Immunantwort eine Rolle. In ihrer Funktion als Chemokine locken sie Immunzellen (insbesondere Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen) an den Ort ihrer Sekretion (Grigat et al., 2007). Ebenfalls wird die Induktion von Cytokinen durch Defensine als ein Faktor der indirekten antiviralen Aktivität beschrieben (Holly et al., 2017). Insbesondere die Aktivierung und Degranulierung von Mastzellen durch verschiedene Defensine und ihre Rolle in der antiviralen Immunantwort wird diskutiert. Mehrere Mechanismen der Aktivierung von Immunzellen durch Defensine sind ebenfalls beschrieben. So wird beispielsweise die Apoptose von neutrophilen Granulozyten durch HNP-1 und HBD-3 gehemmt (Nagaoka et al., 2012). Neben den bereits beschriebenen proinflammatorischen Wirkungen werden auch antiinflammatorische Eigenschaften beschrieben, die eine Regulationsfunktion bei einer Immunantwort nahelegen (Brook et al., 2016).

Defensine werden bei viralen Infektionen vermehrt gebildet. Dies ist besonders für verschiedene β -Defensine gezeigt, beispielsweise bei Infektion mit Rhinoviren (Proud et al., 2004).

Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Wirkung von Defensinen im Sinne einer Verstärkung einer vorbestehenden Immunantwort, beispielsweise durch eine

erhöhte Bildung und Ausschüttung neutralisierender Antikörper gegen Adenoviren im Mausmodell (Gounder et al., 2016).

Bezüglich der enterischen Defensine ist relevant, dass sie die Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflussen können und dadurch indirekt einen Einfluss auf die Suszeptibilität für virale Infektionen nehmen können (Bevins et al., 2011).

Aufgrund beschriebener Eigenschaften werden die Defensine als mögliche Leitsubstanzen für antivirale oder allgemein antiinfektiöse Therapeutika angesehen. Neben Versuchen einer topischen Applikation in verschiedenen Tiermodellen (Hazrati et al., 2006; Brandt et al., 2007; Cole et al., 2010) gehen Ansätze vor allem in Richtung der Synthese von defensin-ähnlichen Peptiden oder einer speziesübergreifenden Anwendung der Defensine.

1.1.4 Defensinfragmente

Die enterischen Defensine HD5 und HD6 sind nach Sekretion durch die Paneth-Zellen im Dünndarm einem proteolytischen Milieu ausgesetzt. Hierbei konnte für HD5 gezeigt werden, dass das Peptid über seinen Abbau aus dem sekretierten Propeptid in die aktive Form hinaus weiter verdaut wird. Dabei entstehen zahlreiche Peptidfragmente, die in Teilen selbst eine antimikrobielle Aktivität gegenüber verschiedenen pathogenen Bakterienstämmen aufweisen. Insbesondere das Nonapeptid HD5(1-9) weist dabei eine vergleichbare Aktivität mit dem Volllängenpeptid HD5 auf und ist dabei gegen verschiedenste Bakterienstämme wirksam. Für HD6 dagegen konnte kein proteolytischer Abbau gezeigt werden. (Ehmann et al., 2019). Eine mögliche Erklärung ist, dass HD6 zu einer intermolekularen Ausbildung von Nano-Netzen neigt, was eine extrazelluläre Stabilität von HD6 vermitteln könnte (Chu et al., 2012).

Für verschiedene Fragmente von HD5 konnte eine starke Inhibition einer Infektion mit humanen Zytomegalieviren (HCMV) *in vitro* gezeigt werden. Eine nähere Charakterisierung zeigt insbesondere für das Peptid HD5(1-9) eine potente Inhibition der HCMV-Infektion in verschiedenen Zielzellen des Virus. Ebenso werden verschiedene klinische HCMV-Isolate von HD5(1-9) inhibiert. Gleichzeitig bleibt die Zellviabilität in den getesteten Konzentrationen erhalten. Mechanistische Studien weisen dabei auf eine reversible Blockade des viralen

Attachments an oder den Eintritt in die Zelle hin, sodass diese vor einer Penetration des Virus geschützt bleibt. Zudem wurden Aminosäuren in der Primärstruktur identifiziert, die eine Schlüsselfunktion für die antivirale Aktivität einnehmen (Böffert et al., 2020).

1.2 HCMV

Das humane Zytomegalievirus ist ein humanpathogenes Virus aus der Familie der *β-Herpesviridae*. Synonym wird die Bezeichnung humanes Herpesvirus 5 verwendet (Roizman et al., 1981). Die Bezeichnung „Zytomegalievirus“ leitet sich vom zytopathischen Effekt ab, der sich bei Infektion verschiedener Zelllinien mit HCMV *in vitro* zeigt. Hierbei kommt es zu einer Volumenzunahme des Zytoplasmas mit einem Verlust der ursprünglichen Zellform bis hin zur Ablösung der Zellen von ihrer Matrix und Lyse.

1.2.1 Struktur und Aufbau

Wie bei den anderen humanpathogenen Herpesviren handelt es sich bei HCMV um ein behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus. Das virale Genom wird dabei von einem Kapsid umgeben, welches in das Tegument eingebettet ist. Die Lipiddoppelschicht-Hülle ist mit zahlreichen Proteinkomplexen durchsetzt (Liu and Zhou, 2007).

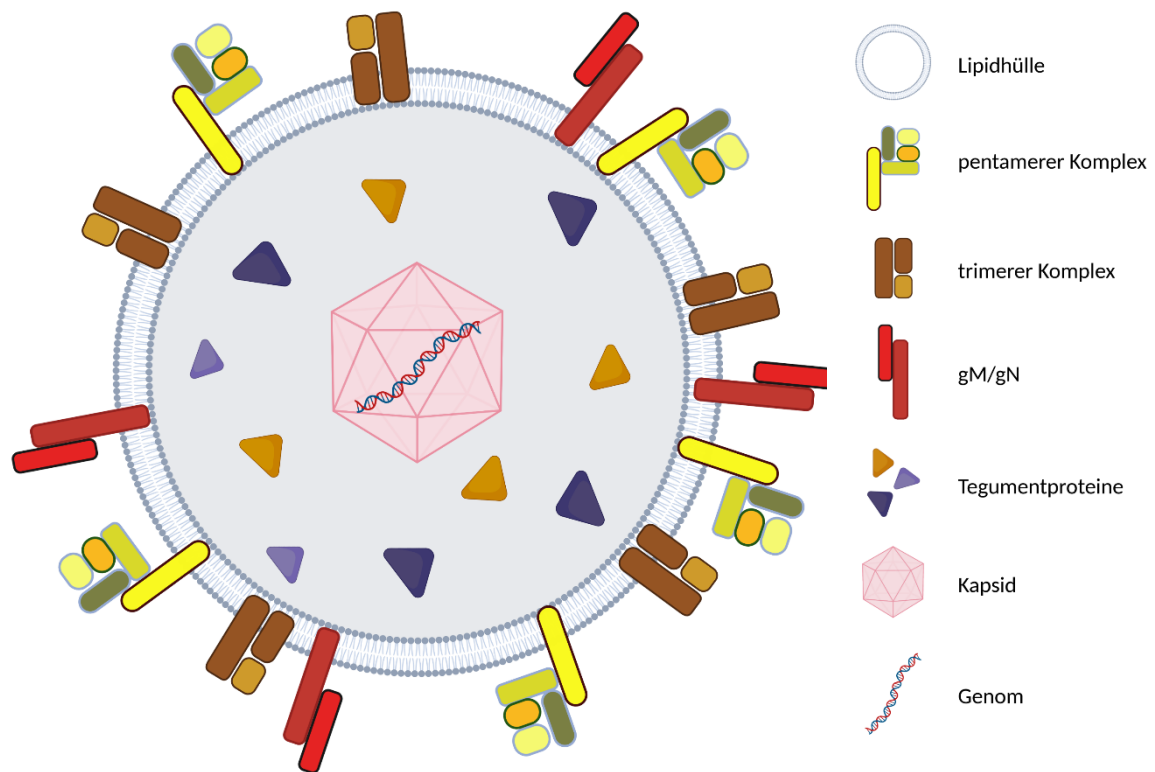


Abbildung 2: Aufbau eines HCMV-Partikels

Die virale DNA wird von einem Kapsid, dem Tegument sowie einer Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinkomplexen umgeben.

Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Mit insgesamt gut 235000 Basenpaaren hat HCMV das größte Genom aller humanpathogenen Viren (Dolan et al., 2004). Das Genom enthält bis zu 165 proteincodierende Gene in über 200 offenen Leserastern, welche nach ihrer Lokalisation im Genom benannt und nummeriert sind. Innerhalb des linearen Genoms werden die Abschnitte UL und US von den Abschnitten IRL und IRS separiert. An den Enden des Genoms finden sich die Abschnitte TRL und TRS (Crough and Khanna, 2009).



Abbildung 3: Struktur des HCMV-Genoms

Flankiert von den endständigen Regionen TRL und TRS befinden sich die codierenden Regionen UL und US. Diese werden durch die Abschnitte IRL und IRS voneinander getrennt.

Die virale DNA befindet sich in einem icosaedrischen Kapsid, das einen Durchmesser von etwa 130 nm hat. Die Proteine MCP, Tri1, Tri2 und SCP bilden

insgesamt 60 asymmetrische Komplexe, welche in ihrer Gesamtheit die Kapsidstruktur bilden. Da es das gesamte virale Genom einschließt, ist das Kapsid einem hohen Druck ausgesetzt. Zusätzlich wird das Kapsid durch das Tegumentprotein pp150 stabilisiert und gleichzeitig in das virale Tegument eingebettet. Das Tegument bezeichnet die Struktur zwischen Kapsid und Virushülle. Durch pp150 wird sie zum Kapsid hin konzentriert und netzartig geordnet. (Dai et al., 2013; Yu et al., 2017).

Das Tegument enthält zahlreiche Proteine, die vor allem für die Infektion von Zielzellen sowie den Zusammenbau und die Ausschleusung neu gebildeter Viruspartikel relevant sind. Diese werden bei der Infektion neben dem Kapsid und dem darin enthaltenen viralen Genom im Zytoplasma der Zielzelle freigesetzt. Unter anderem sind die Tegumentproteine ppUL97 und pp71 für eine effektive Replikation der viralen DNA notwendig (Baldick et al., 1997; Kaleijta, R., 2008). Hervorzuheben ist zudem die immunmodulatorischen Funktionen verschiedener Tegumentproteine. Diese sind für Pathogenität und Immunevasion von HCMV von zentraler Bedeutung. Das Protein pp65 vermindert beispielsweise die MHC-abhängige Expression eigener immunogener Proteine auf der Zelloberfläche (Gilbert et al., 1996) und setzt durch Interaktion mit dem NKp30-Rezeptor die NK-Zytotoxizität herab (Arnon et al., 2005). Außerdem verringert es die Ausschüttung von Typ I Interferonen. (Biolatti et al., 2018). Durch die immunmodulatorische Funktion sind zahlreiche Tegumentproteine für die Pathogenität und Immunevasion von HCMV von zentraler Bedeutung.

HCMV-Virionen werden von einer Lipiddoppelschicht umgeben, in welche zahlreiche virale Glykoproteine eingebettet sind. Diese bilden verschiedene Proteinkomplexe, welche zentrale Funktionen im Zelltropismus und Entry vermitteln. Vor allem relevant sind dabei die Proteinkomplexe gCI, gCII und gCIII. gCI bildet sich als ein Homodimer des Proteins gB. gCII besteht aus den Glykoproteinen gM und gN. gCIII setzt sich aus gH und gO zusammen. (Davison and Bhella, 2007). Aufgrund ihrer exponierten Lage werden die Glykoproteine, insbesondere gB als Targetstrukturen für die Impfstoffentwicklung gegen HCMV gesehen. (Anderholm et al., 2016).

HCMV kann in Laborstämmen und klinische Isolate unterschieden werden. Erstere neigen dazu Mutationen zu entwickeln, welche die Replikationsfähigkeit *in vitro* begünstigen. Gleichzeitig können sie dabei *in vivo* relevante Eigenschaften verlieren, was beispielsweise in einem eingeschränkten Zelltropismus resultiert (Wilkinson et al., 2015).

1.2.2 Zelltropismus und virales Entry

Das humane Zytomegalievirus zeichnet sich durch einen außergewöhnlich breiten Zelltropismus aus. Dies trägt erheblich zum variablen klinischen Erscheinungsbild einer HCMV-Infektion bei. (Gerna et al., 2019). Neben Epithel- und Endothelzellen befällt das Virus Fibroblasten als typische zelluläre Komponente des Bindegewebes. Des Weiteren gehören glatte Muskelzellen, sowie myeloide Zellen zu den Zielzellen des Virus. Nahezu in allen humanen Geweben finden sich HCMV-permissive Zelltypen (Sinzger et al., 2008). Durch die Infektion von Monozyten ist die Fähigkeit gegeben, über den Blutstrom im Organismus zu disseminieren. In ausdifferenzierten Makrophagen kann schließlich eine aktive Replikation stattfinden (Ibanez et al., 1991). Fibroblasten und glatte Muskelzellen bieten durch ihre weite Verbreitung im menschlichen Körper die Möglichkeit einer effektiven Replikation. Insbesondere die Infektion von Epithelien und Endothelzellen kann in Abhängigkeit der Lokalisation die klinische Manifestation einer Infektion bestimmen. Neben der Dissemination kommt der Ausbreitung durch direkte Zell-zu-Zell-Übertragung eine entscheidende Rolle zu (Digel et al., 2006).

Unter Bezugnahme auf die in der Arbeit verwendeten Zellkultursysteme ist hervorzuheben, dass eine Freisetzung von infektiösen HCMV-Partikeln in den Überstand erfolgen kann und auch auf diesem Weg eine Infektionsausbreitung stattfindet (Yamane et al., 1983).

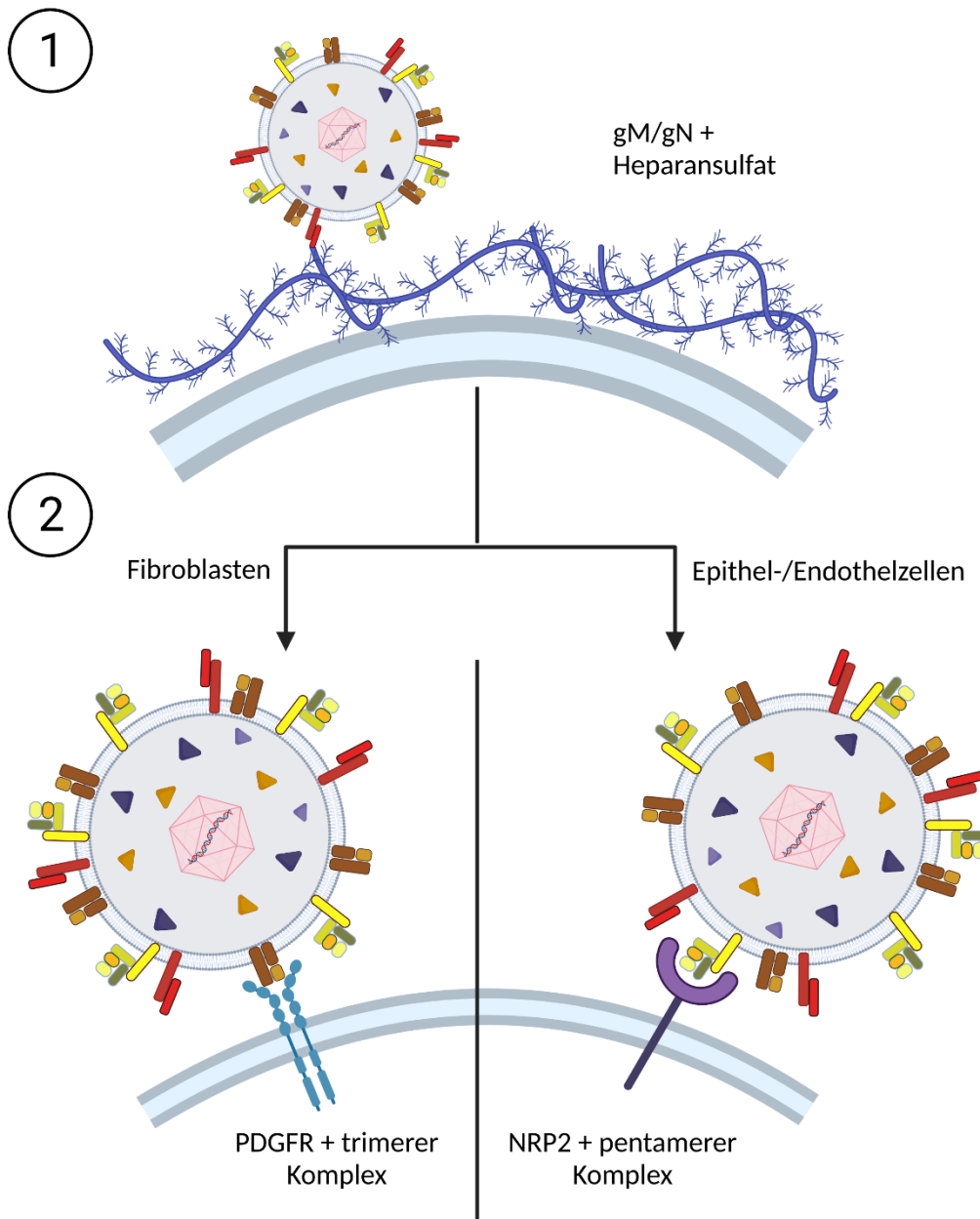


Abbildung 4: Attachment und Entry von HCMV

Nach initialer Bindung an Heparansulfat mittels gM/gN erfolgt ein zellspezifischer Entry-Mechanismus: In Fibroblasten wird dieser über den trimeren Oberflächenkomplex durch die Bindung an PDGFR α vermittelt. Für Epithel- und Endothelzellen ist die Interaktion des pentameren Komplexes mit NRP2 (Neuropilin 2) ausschlaggebend.

Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Nach derzeitigem Stand wird der Zelltropismus über verschiedene zelluläre Oberflächenmoleküle mit Rezeptorfunktion für virale Proteinkomplexe vermittelt. Initial kommt es zur Bindung des viralen Oberflächenkomplexes gM/gN mit zellulären Proteoglykanen, insbesondere Heparansulfat (Kari and Gehrz, 1992;

Compton et al., 1993). Dieser Schritt ist kinetisch reversibel und stellt am ehesten eine Konzentrierung von Virionen auf der zellulären Oberfläche dar. Anschließend wurden verschiedene Mechanismen identifiziert, die zum Entry des Virus in die Zielzelle führen können: Über den heterotrimeren Oberflächenkomplex gH/gL/gO bindet HCMV insbesondere in Fibroblasten (Vanarsdall et al., 2011) an PDGFR α (Kabanova et al., 2016; Wu et al., 2017). Anschließend erfolgt die Aufnahme in die Zelle pH-unabhängig über eine Makropinocytose. (Hetzenecker et al., 2016).

Die Proteine gH und gL bilden mit den viralen Glykoproteinen UL128, UL130 und UL131 den sogenannten pentameren Komplex. Dieser vermittelt insbesondere den Tropismus gegenüber epithelialen und endothelialen Zellen (Wang and Shenk, 2005). Als Zielrezeptor für den pentameren Komplex wurde Neuropilin-2, ein membranständiges Protein, das bereits als Rezeptor für verschiedene Wachstumsfaktoren, unter anderem für VEGF (Soker et al., 1998), charakterisiert war, identifiziert (Martinez-Martin et al., 2018). Im Anschluss an die Bindung wird das Virus dann mittels Endozytose pH-abhängig aufgenommen und in der Zelle freigesetzt.

Von entscheidender Bedeutung für die Penetration der Zielzelle ist außerdem das virale Protein gB, welches die Membranfusion vermittelt. (Wille et al., 2013).

Weitere zelluläre Rezeptoren, welche Attachment und Entry von HCMV in die Zielzelle vermitteln, werden diskutiert, unter anderem OR14I1, ein Geruchsrezeptor des olfaktorischen Epithels, oder verschiedene Integrine (E et al., 2019; Feire et al., 2004).

Die Entry-Rezeptoren von HCMV stellen Ansatzpunkte in der Entwicklung neuer antiviraler Wirkstoffe dar, beispielsweise über die Blockade der Rezeptoren mit ihren natürlichen Liganden (Stegmann et al., 2017).

1.2.3 Reproduktionszyklus

Nach erfolgtem Eindringen des Virions in die Zelle erfolgt der Transport des Nukleokapsids zum Zellkern entlang der zellulären mikrotubulären Struktur. (Ogawa-Goto et al., 2003). Gleichzeitig regulieren verschiedene

Tegumentproteine die zelluläre Immunantwort und steuern die initiale Genexpression (Beltran et al., 2014). Diese findet in verschiedenen Phasen statt, welche sich wie folgt klassifizieren lassen: Insbesondere in den ersten 2 Stunden nach Infektion findet die Expression der sogenannten IE (immediate early)-Gene statt. Diese kodieren unter anderem für die Proteine IE1 und IE2 und dienen als Transkriptionsaktivatoren. Im Folgenden werden vermehrt auch DE (delayed early-)Gene (bis 24 h nach Infektion) und late-Gene (ab 24 h nach Infektion) transkribiert. Diese beinhalten einerseits zahlreiche virale Strukturproteine. Andererseits wird die zelluläre Umgebung moduliert und so beispielsweise die Apoptose inhibiert und der Zellzyklus kontrolliert (Stinski, 1978; Stinski and Meier, 2007; White and Spector, 2007; Anders et al., 2007).

Die *de novo* Assemblierung von Nukleokapsiden beginnt nach Translation der Kapsidproteine im Zytoplasma. Oligomere werden zurück in den Nukleus transportiert und dort zu fertigen Kapsiden mit darin verpackter DNA zusammengesetzt. Nach Ausschleusung aus dem Zellkern werden die Kapside dann in einem Zwischenkompartiment von endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat umschlossen. Durch diesen Prozess wird das Virus umhüllt. In die Virusmembran sind hiernach die viralen Oberflächenproteine inkorporiert, welche zuvor am Golgi-Apparat glykosyliert wurden. Abschließend erfolgt die Ausschleusung der Virionen mittels Exozytose an der Zellmembran (Gibson, 2008; Crough and Khanna, 2009; Schauflinger et al., 2013). Neben der Exozytose vollständiger Viruspartikel ist auch die Ausschleusung von NIEPs und dense bodies beschrieben. Letztere bestehen aus der viralen Hülle und Tegumentproteinen, insbesondere pp65, enthalten aber weder Kapsid noch DNA. NIEPs hingegen sind durch das Vorhandensein von Hülle, Tegument und einem Kapsid, das keine virale DNA enthält, gekennzeichnet (Irmieri and Gibson; 1983).

Neben dem bisher beschriebenen lytischen Infektionszyklus, der durch die Produktion und Ausschleusung neuer Virionen gekennzeichnet ist, gibt es die Form der latenten Infektion. Hierbei findet allenfalls eine sehr geringe Transkription viraler DNA statt. Diese wird von viralen Faktoren und dem umgebenden zellulären Milieu reguliert und beispielsweise über

Histonmodifikationen vermittelt (Murphy et al., 2002; Goodrum et al., 2012). Im Detail ist die Latenz in hämatopoietischen Vorläuferzellen und Monozyten beschrieben (von Laer et al., 1995). Bei einer Veränderung des zellulären Mikromilieus, wie sie beispielsweise bei immunsuppressiver Therapie des Wirts eintreten kann, besteht die Möglichkeit einer Reaktivierung. Dabei tritt HCMV von der latenten Infektion in eine lytische Infektion ein.

1.2.4 *Epidemiologie und Pathogenese der HCMV-Infektion*

Die Infektion mit dem humanen Zytomegalievirus ist weltweit verbreitet mit einer Durchseuchungsrate von 45-100%. Diese hängt neben der geografischen Lage auch vom sozioökonomischen Status der Stichprobe ab (Cannon et al., 2010). Eine Übertragung des Virus erfolgt von Mensch zu Mensch. Häufige Übertragungswege sind dabei Schmierinfektionen, bei denen das Virus unter anderem über Speichel, Urin, Blut, Muttermilch sowie Samenflüssigkeit und Vaginalsekret übertragen werden kann. Für die kongenitale CMV-Infektion ist die diaplazentare Übertragung von Mutter auf Fetus von zentraler Relevanz (Britt, 2007).

Man nimmt an, dass etwa 0,2-0,5% aller lebend geborenen Kinder in Deutschland mit CMV infiziert sind. Auch weltweit stellt eine CMV-Infektion damit die häufigste konnatale Infektionserkrankung dar (Kenneson and Cannon, 2007; Buxmann et al., 2017).

Grundsätzlich ist eine Ansteckung mit HCMV in jedem Alter möglich, wenngleich die Primärinfektion häufig schon im Kindesalter stattfindet. (Griffiths et al., 2015).

1.2.5 *Diagnostik und klinische Manifestation*

Für den Nachweis einer Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Die Detektion mittels PCR weist das virale Genom direkt nach und bietet die Möglichkeit der Quantifizierung der Viruslast. Diese korreliert mit dem Schweregrad einer HCMV-Erkrankung (Natori et al., 2018). Ein weiterer direkter Virusnachweis ist die Detektion des pp65-Antigens. Eine Kultivierung auf Fibroblasten oder ähnliche Zellkultursystemen ist ebenso möglich wie eine Biopsie betroffener Organe mit immunhistochemischem Nachweis einer CMV-Infektion. In Gewebeproben zeigen sich regelmäßig

typische „Eulenaugenzellen“, welche sich als Riesenzellen mit Einschlusskörperchen im Zellkern beschreiben lassen.

Ein Nachweis von Antikörpern gegen HCMV lässt einen Rückschluss auf die zeitliche Lokalisation einer Infektion zu: IgM-Antikörper lassen sich in der Regel nur bei einer Primärinfektion nachweisen, IgG-Antikörper dagegen nur mit zeitlichem Abstand zur Primärinfektion. Daher können IgG-Antikörper ohne erhöhtes IgM als Zeichen einer zurückliegenden Infektion gedeutet werden.

Zudem weisen zahlreiche Tests HCMV-spezifische T-Lymphozyten nach (Rogers et al., 2020).

Eine Infektion mit HCMV verläuft für immunkompetente Individuen in aller Regel mild bis asymptomatisch. Es kann dabei zu klassischen Infektionssymptomen wie erhöhten Temperaturen bis Fieber, Appetitsverlust oder Abgeschlagenheit kommen. Diese treten typischerweise nach einer Inkubationszeit von 4-6 Wochen auf und remittieren spontan nach etwa 2 Wochen. Durch die Etablierung einer latenten Infektion besteht die Möglichkeit einer Reaktivierung der Infektion, die unter anderem während einer immunsuppressiven Therapie auftritt. Insbesondere nach Organtransplantation, allogener Stammzelltransplantation oder Immunschwäche (wie sie beispielsweise im Stadium AIDS einer HIV-Infektion auftritt) stellt HCMV eine ernsthafte Bedrohung dar. Es kann zu Entzündungen zahlreicher Organsysteme kommen, wie Ösophagitis, Hepatitis, Colitis, Retinitis oder Pneumonitis (Griffiths et al., 2015). Letztere weist trotz antiviraler Therapie eine Letalität von 30-50% auf (Travi und Pergam, 2014). Zur Verbesserung des Outcomes der Patienten wird in der Transplantationsmedizin der Serostatus und die Viruslast überwacht und gegebenenfalls eine antivirale Prophylaxe oder frühzeitige Therapie durchgeführt (Kotton et al., 2018).

Von zentraler Bedeutung ist HCMV in der pränatalen Medizin und der Geburtshilfe. Eine intrauterine CMV-Infektion kann zu vielfältigen und mitunter schwerwiegenden Einschränkungen des Neugeborenen führen, auch wenn diese bei Geburt noch nicht sichtbar sind. Es kommt beispielsweise zu Schädigungen des Gehörs mit Schwerhörigkeit bis hin zum Hörverlust, Wachstumsretardierung und geistigen Beeinträchtigungen. Die Gefahr für das

Kind steigt dabei, wenn die Übertragung von HCMV im ersten Trimester der Schwangerschaft stattfindet (Buxmann et al., 2017).

1.2.6 Therapie

Aufgrund des milden Verlaufs ist bei Immunkompetenten in der Regel keine spezielle antivirale Therapie notwendig. Zur Therapie einer schweren HCMV-Infektion sind verschiedene Wirkstoffe zugelassen: Ganciclovir und sein Prodrug Valganciclovir, Letermovir, Cidofovir sowie Foscarnet. (Britt und Prichard, 2018). Die Gabe von (Val)-Ganciclovir stellt dabei die bevorzugte Therapie dar. Das Pharmakon wirkt dabei durch eine Inhibition der Elongation viraler DNA (Biron et al., 1985). Zur Aktivierung muss Ganciclovir mehrfach phosphoryliert werden, initial durch die virale Kinase UL97. Durch Resistenzmutationen von unter anderem UL97 kann es zu einem Wirkverlust von Ganciclovir kommen, der mit gesteigerter Morbidität und Mortalität der Patienten einhergeht (Fisher et al., 2017). Relevante Nebenwirkungen sind vor allem hämatologische Erscheinungen wie Neutropenie, Thrombozytopenie oder Anämie.

Letermovir hemmt die Verpackung viraler DNA in das Kapsid. Auch gegen Letermovir kann es jedoch zu Resistenzmutationen (UL56 und UL89) kommen, Für die Transplantation von hämatopoietischen Stammzellen wurde Letermovir als potent in der Prophylaxe einer CMV-Infektion charakterisiert (Marty et al., 2017).

Cidofovir stellt ein Nukleotidanalogen dar, welches ähnlich wie Ganciclovir zu einem Abbruch der Synthese viraler DNA führt. Limitationen erfährt Cidofovir neben Resistenzmutationen vor allem durch seine Nephrotoxizität sowie die Notwendigkeit der intravenösen Applikation.

Foscarnet ist ein Pyrophosphat-Analogen, das die Aktivität der viralen DNA-Polymerase herabsetzt. Mutationen unter anderem in UL54 können die Wirksamkeit herabsetzen (Gregg et al., 2014). Auch weist Foscarnet eine relevante Nephrotoxizität auf.

Für die kongenitale HCMV-Infektion besteht keine zugelassene Therapie. Genannte Pharmaka sind aufgrund ihrer Nebenwirkungen nicht in der Schwangerschaft zugelassen. Diskutiert wird, ob die Gabe von

Hyperimmunglobulinen gegen HCMV in der Schwangerschaft nach erfolgter Primärinfektion der Mutter einen protektiven Effekt auf das Kind haben (Kagan et al., 2018). Eine Primärprophylaxe im Sinne einer Impfung gegen HCMV, welche ebenfalls die hohe Seroprävalenz eindämmen könnte, ist ebenfalls nicht vorhanden.

Insgesamt besteht nach wie vor Handlungsbedarf in der Entwicklung neuer Therapieoptionen gegenüber HCMV. Dieser ergibt sich vor allem aus den Resistenzentwicklungen gegenüber vorhandenen Pharmaka und aus der klinischen Relevanz der HCMV-Infektion bei Neugeborenen sowie Transplantationspatienten.

1.3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die antivirale Aktivität von HD5(1-9) gegenüber HCMV näher zu charakterisieren. Da eine deutliche Inhibition der Infektion erst in Konzentrationen von über 50 μ M gezeigt werden konnte, sollten mögliche Peptidvariationen getestet werden, um eine Steigerung der antiviralen Aktivität zu untersuchen. Konkret wurde hierbei die Primärstruktur von HD5(1-9) n- und c-terminal verkürzt und die antivirale Aktivität der resultierenden Peptide evaluiert.

Ein weiteres Ziel war die genauere Untersuchung, wie die antivirale Aktivität des Peptids vermittelt wird. Die bisherige Datenlage weist am ehesten auf eine Interaktion mit der Zelloberfläche als wahrscheinlichsten Mechanismus hin (Böffert et al., 2020). Mittels biotinylierten Peptidderivaten sollten Experimente zur Charakterisierung möglicher Bindungspartner sowie zur Lokalisation des Peptids durchgeführt werden.

Ein weiteres Ziel bestand in der Fragestellung, ob HD5(1-9) auch gegenüber anderen Viren, insbesondere gegenüber SARS-CoV2, eine antivirale Wirkung aufweist.

Ziel der Arbeit war es eine Optimierung von HD5(1-9) bezüglich des Wirkprofils zu erreichen, um eine mögliche *in vivo* - Anwendung realistischer erscheinen zu

lassen. Außerdem sollte der Mechanismus der Infektionsinhibition aufgeklärt und virale oder zelluläre Zielstrukturen von HD5(1-9) identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Name	Beschreibung	Hersteller
HFF	engl. <i>human foreskin fibroblasts</i> ; primäre Fibroblasten aus der Vorhaut männlicher Neugeborener; adhärenzte Zelllinie	ATCC (#SCRC-1041)
ARPE19	engl. <i>arterial retinal pigmented epithelium cells</i> ; arterielle pigmentierte Epithelzellen der Retina eines 19-jährigen Mannes; adhärenzte Zelllinie	ATCC (#CRL2302)
CaCo2	engl. <i>cancer colon cells</i> ; immortalisierte Zelllinie aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom; adhärenzte Zelllinie	ATCC (#HTB-37)
HEK/293T	engl. <i>human embryonal kidney cells</i> ; embryonale Nierengewebszellen, welche künstlich mit dem großen T-Antigen des SV40-Virus sowie den adenoviralen Genfragmenten E1A und -B transformiert wurde; adhärenzte Zelllinie	ATCC (#CRL3216)
CD4+ T-Zellen	Durch Isolierung aus Forschungsblutproben mit angereicherten Leukozyten gesunder Blutspender*innen gewonnene primäre CD4- exprimierende T-Zellen; Suspensionszellen	Zentrum für klinische Transfusionsmedizin (Tübingen)
ITGB1-KO-ARPE-19	mittels lentiviraler Transduktion modifizierte ARPE-19, die ITGB1 nicht mehr exprimieren	diese Arbeit

LRP1-KO-ARPE-19	mittels lentiviraler Transduktion modifizierte ARPE-19, die LRP1 nicht mehr exprimieren	diese Arbeit
NEB10 beta	Kompetente Escherichia coli	NEB (#C3019I)

2.1.2 Viren

Name	Beschreibung	Referenz
HCMV-TB40/E-WT	Endotheliotroper HCMV-Virusstamm	Sinzger et al. (1999) Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Sinzger, Ulm
HCMV-TB40/E-delUL16-EGFP	Endotheliotroper HCMV-Virusstamm, exprimiert EGFP anstelle von UL16	Digel et al. (2006) Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Sinzger, Ulm
icSARS-CoV2-mNG	Rekombinanter SARS-CoV-2 mit Expression von mNeonGreen	World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses (WRCEVA), UMTB, Galveston, United States (University of Texas Medical Branch)

2.1.3 Peptide

Name	Aminosäuresequenz
HD5(1-9)	ATCYCRTGR
HD5(2-9)	TCYCRTGR
HD5(3-9)	CYCRTGR
HD5(1-8)	ATCYCRTG
HD5(1-7)	ATCYCRT
HD5(1-9)-bio	n-terminal biotinyliertes HD5(1-9)
HD5(3-9)-bio	n-terminal biotinyliertes HD5(3-9)

Alle Peptide wurden von JPT Peptide Technologies GmbH hergestellt. Die Peptide wurden in 0,01% Essigsäure in Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

Für den Versuch zur Bestimmung der IC50 der verkürzten Defensinderivate (siehe 3.1) wurden die Peptide in 0,01% Essigsäure in PBS gelöst.

2.1.4 Antikörper

Name	Konjugat	Spezies	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
antiHCMV IE1 and IE2	-	Maus	1:1000	#ab53495	abcam
Anti-N-sulfated heparan sulfate Purified	-	Maus	1:200	GRP10467	GRP
CD29 Antibody, REAfinity	PE	rekombinant hergestellt	1:50	#130-118-194	Miltenyi
CD49e Antibody, REAfinity	PE	rekombinant hergestellt	1:50	#130-110-590	Miltenyi

Material und Methoden

CD91 Antibody, REAfinity	PE	rekombinant hergestellt	1:50	#130-111- 412	Miltenyi
Goat anti mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 514	Alexa Fluor 514	Ziege	1:2000	#A-31555	Thermo Fisher
Goat anti mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 594	Alexa Fluor 594	Ziege	1:2000	#A-11005	Thermo Fisher
HIV-1 core antigen-FITC, KC57	FITC	Maus	1:50	#6604665	Beckman Coulter
PE Mouse anti-human CD25	PE	Maus	1:5	#555432	BD Bioscience s
PE Mouse anti-human CD69	PE	Maus	1:20	#310906	Biolegend
Streptavidin AlexaFluor 514	Alexa Fluor 514	-	1:200	#S-32353	Thermo Fisher

2.1.5 Reagenzien, Kits und Enzyme

Name

Accutase

Aceton

Agar

Agarose

Hersteller

Sigma-Aldrich (#A6964)

Appllichem (#A1582)

Thermo Fisher (#30391023)

Lonza (#50004L)

Material und Methoden

Ampicillin	Applichem (#A2942)
Biocoll	Biochrom (#L6115)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Applichem (#A3906)
Dulbecco's MEM (DMEM)	Thermo Fisher (#61965059)
Essigsäure (HAc)	Merck (#100063)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (#E1510)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (#E-5134)
Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies (#10500)
Hefeextrakt	Roth (#2363.3)
Heparin	Sigma-Aldrich (#H3149)
Hoechst 33342	Thermo Fisher (#62249)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich (#P8041)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (#104873)
Leucoagglutinin PHA-L (PHA)	Sigma-Aldrich (#2769)
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem (#A2942,5000)
Nichtessenzielle Aminosäuren (NEAA)	Life Technologies (#11140035)
OptiMEM TM	Thermo Fisher (#31985062)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth (#0335.2)
Pepton	Thermo Fisher (#211677)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom (#A2213)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher (#14190144)
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences (#23966.1)
Puromycin	Sigma-Aldrich (P8833)
Rekombinantes humanes IL-2	StemCell (#78036.1)
RosetteSep Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail	StemCell (#15062)
SiR-DNA	TebuBio (#SC007)
Tris Base	Sigma-Aldrich (#T-1503-1kg)
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Biochrom (#L2153)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (#D9542)

2.1.6 Nährmedien

Zelltyp	Zusammensetzung
ARPE-19 und HFF	DMEM + 5% FKS + 100µg/ml Penicillin/Streptomycin
Caco2	DMEM + 10% FKS + 100µg/ml Penicillin/Streptomycin + 1% NEAA
CD4+ T-Zellen	RPMI + 10% FKS + 100µg/ml Penicillin/Streptomycin
KO-ARPE-19	DMEM + 5% FKS + 100µg/ml Penicillin/Streptomycin + 1µg/ml Puromycin
KO-Caco2	DMEM + 10% FKS + 100µg/ml Penicillin/Streptomycin + 1% NEAA + 6µg/ml Puromycin
293T	DMEM + 10% FKS + 100µg/ml Penicillin/Streptomycin

2.1.7 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
DAPI-stock-Lösung	2 mg DAPI + 1 ml PBS
FACS-Puffer	50 ml PBS + 500 µl FKS
Heparin stock (2mg/ml)	20mg Heparin + 10 ml PBS
LB-Agar	5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Pepton 20 g Agar Mit dH ₂ O bis zu 1l auffüllen, anschließend Autoklavieren
LB-Medium	5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Pepton Mit dH ₂ O bis zu 1l auffüllen, anschließend Autoklavieren
PBS (10x)	26,8mM KCl 14,7mM KH ₂ PO ₄ 1,37M NaCl 81mM Na ₂ HPO ₄ mit 5 M NaOH auf einen pH von 7,4 bringen, im Anschluss mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
PHA stock (1mg/ml)	1 ml PHA + 1 ml PBS
0,01% Essigsäure in Wasser	5 µl HAc + 50 ml H ₂ O
0,8% Agarose	1,6g Agarose + 198,4 ml TAE (1x)
1x TAE-Puffer	20 ml 50x TAE-Puffer + 980 ml dH ₂ O
4% PFA	100 ml PBS + 4 g PFA bei 55°C über 4h im Wasserbad auflösen und bei -20°C lagern

50x TAE-Puffer	241g Tris Base (2M) 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (0,05M) Mit dH2O bis zu 1 l auffüllen
80% Aceton in Wasser	20 ml Aceton + 5 ml H2O

2.1.8 Klonierungsmaterialien (Primer, Enzyme, Puffer)

Name	Hersteller
ddH2O	Promega
Esp3I	Thermo Fisher
Fast AP	Thermo Fisher
Fast digest buffer	Thermo Fisher
PureYield TM Plasmid Midiprep System	Promega
NucleoSpin R Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
T4 ligation buffer	Thermo Fisher
T4 PNK	Thermo Fisher
T4 DNA ligase	Thermo Fisher
1kb plus DNA ladder	Life technologies

2.1.9 Plasmide

Name	Beschreibung	Hersteller
lentiCRISPRv2	Lentivirales Rückgrat mit Cas9,	Addgene #98290
puro	Puromycinresistenz	
pBR-NL43 wt	HIV-1, mit X4-Tropismus	Rücker et al., 2004
pMD2G	Exprimiert Hülle des vesikulären Stomatitis-Virus	Addgene #12259
pSIV-vpr-vpx+	Vpx enthaltende virusähnliche Partikel	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Thomas Gramberg, Erlangen

psPAX2	lentivirales Packaging-Plasmid	Addgene #12260
pWPXLd	EGFP exprimierendes Plasmid	Addgene #12258
pVSV-G	Glycoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus	Addgene #138479

2.1.10 *guideRNA*

Konstrukt	Sequenz (obere Reihe-vorwärts, untere Reihe-rückwärts)
ITGA5-1	caccgCCGCGTCTAAGTTGAAGCCC aaacGGGCTTCAACTTAGACGCGGc
ITGA5-2	caccgGTCTGTTCCCGGCCGGTAAA aaacTTTACCGGCCGGGAACAGACc
ITGB1-1	caccgATACAAGCAGGGCCAAATTG aaacCAATTTGGCCCTGCTTGTATc
ITGB1-2	caccgAGCTTACCTGCACGCGCCAC aaacGTGGCGCGTGCAGGTAAGCTc
ITGB1-3	caccgCGTTCTTGCAGTAAGATTTG aaacCAAATCTTACTGCAAGAACGc
LRP1-1	caccgCCATCACACCTACGAGCACG aaacCGTGCTCGTAGGTGTGATGGc
LRP1-2	caccgAGCTCGTCGACAGCAAGATT aaacAATCTTGCTGTGACGAGCTc
LRP1-3	caccgCGTCTGTCTGTGGATCGGGC aaacGCCCGATCCACAGACAGACGc
XYLT2-1	caccgCAAGGCCGTTTATCACGAGC aaacGCTCGTGATAAACGGCCTTGc
XYLT2-2	caccgACCCCAAGTGCGAGATCGT aaacACGATCTCGCACTTGGGGGTc
EXT1-1	caccgGGTAGTACGAACAATCCTCC aaacGGAGGATTGTTCTACTACc

EXT1-2	caccgCGTTATGGACGTGATATAAG aaacCTTATATCACGTCCATAACGc
EXT2-1	caccgTAGTCCTCACCTACGACCGA aaacTCGGTTCGTAGGTGAGGACTAc
EXT2-2	caccgTCCGTGATGTGCCGGTTGTT aaacAACAACCGGCACATCACGGAc
EXT2-3	caccgTCTCAGACAGTGACTACTAC aaacGTAGTAGTCACTGTCTGAGAc

Alle *guide*RNA-Konstrukte wurden von der Firma metabion international AG hergestellt.

2.1.11 **Geräte**

Cytation3 multiplate reader	Biotek
MACSQuant VYB	Miltenyi
NanoDrop TM 1000	Thermo Fisher

2.1.12 **Software**

Software	Hersteller
Corel Draw X7	Corel
Endnote 20	Clarivate Analytics
FlowLogic 8	Inivai
GraphPad Prism 9	GraphPad
Gen5 3.10	Biotek
ImageJ 1.53	Wayne Rasband, National Institute of Health
Microsoft Office 2019	Microsoft Corporation

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

HFF und ARPE-19 wurden in DMEM mit 5% FCS und 1% Penicillin und Streptomycin kultiviert. Bei Konfluenz von über 90% wurden die HFF im Verhältnis 1:2, die ARPE-19 im Verhältnis 1:4 gesplittet. Die Ablösung der Zellen erfolgte nach Abnahme des Mediums und Waschung mit PBS durch Zugabe von Trypsin. In einer T175-Zellkulturflasche wurde mit 2ml Trypsin gearbeitet, in einer T75 mit 1ml Trypsin. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Ablösung. Bei noch nicht erfolgter oder nicht vollständiger Ablösung der Zellen wurde die Inkubationszeit verlängert. Die HFF wurden in den Passagen 18-36 verwendet.

Caco2 wurden in DMEM mit 10% FCS, 1% Penicillin und Streptomycin sowie 1% NEAA kultiviert. Bei Konfluenz von über 90% wurden die Zellen im Verhältnis 1:8 gesplittet. Die Ablösung erfolgte nach Waschung mit PBS mittels Zugabe von Accutase und Inkubation von 5-10 Minuten bei 37°C.

293T wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin und Streptomycin kultiviert. Bei Konfluenz von über 90% wurden die Zellen im Verhältnis 1:8 gesplittet. Die Ablösung der Zellen erfolgte mittels mechanischer Kraftanwendung.

Leukozytenangereicherte Forschungsblutproben wurden in anonymisierter Form vom Zentrum für klinische Transfusionsmedizin Tübingen bereitgestellt. Das Einverständnis der Spender zur Verwendung ihrer Blutproben für Forschungszwecke ist eingeholt und ein Ethikvotum lag vor (Projektnummer 612/2020A). 10ml Blut wurden mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. Nach Zugabe des *RosetteSep Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail* (1,5ml für 10ml Blut) und Inkubation von 20 Minuten bei RT erfolgte die Schichtung über 20ml Ficoll. Nach Zentrifugation (45min bei 2200rpm und RT, mit ausgeschalteter Bremse) erfolgte die Abnahme der Leukozytenschicht und zweimalige Waschung mit PBS. Im Anschluss wurden die Zellen gezählt und in Zellkulturmedium resuspendiert.

Die Zählung aller Zelltypen erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer.

2.2.2 Herstellung und Titration von HCMV-stocks

Zur Herstellung eines HCMV-stocks wurde eine T175-Zellkulturflasche 70-90% konfluenter HFF verwendet. Nach Abnahme des Mediums wurde 1ml HCMV-Suspension und 4ml Medium zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation erfolgte die Zugabe von weiteren 15ml Medium. Im Verlauf wurde bei klarem zytopathischem Bild, frühestens aber nach 6 Tagen, der Überstand aus der Zellkulturflasche abgenommen. Nach Zentrifugation von 10min bei 3200 g zur Pelletierung von Zelldebris wurde der Überstand aliquotiert und für weitere Experimente bei -80°C gelagert.

Der Titer eines Virus beschreibt die Anzahl infektiöser Partikel pro Volumen [IU/ml]. Zur Titration wurden je 12 wells mit 10.000 HFF auf einer 96-well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und das zu titrierende Virus in einer Verdünnungsreihe mit einem Zielvolumen von 100µl/well zugegeben. Durch den Vorgang des Einfrierens und Wiederauftauens findet eine signifikante Reduktion der Viruslast statt. Daher muss die Titration eines Vorrat-stocks, der gefroren gelagert wird, ebenfalls mit einem wiederaufgetauten Aliquot durchgeführt werden, da es ansonsten zu einer Verfälschung der Werte kommt. Nach zwei Stunden wurden 100µl Medium zu den wells hinzugegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 100µl 80% Aceton in Wasser für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Im Anschluss wurden 100µl einer 1:1000-Verdünnung des IE1/2-Ak in PBS zugegeben und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 100µl einer 1:2000-Verdünnung des ALEXAFluor514 oder ALEXAFluor594 in PBS zugegeben und für 45-60 Minuten bei 37°C inkubiert. Eine nukleäre Gegenfärbung erfolgte mit je 100µl einer 1:20000-Verdünnung von DAPI in PBS für 8 Minuten bei Raumtemperatur. Zwischen den Schritten wurden die wells dreimal mit je 200µl PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Mikroskopie im Cytation3. Dabei wurden Bilder mit den Kanälen DAPI und YFP beziehungsweise Texas Red aufgenommen. Mittels der automatisierten Zellzählfunktion wurde die Anzahl der Zellen mittels der DAPI positiven Nuklei

bestimmt. Die Anzahl der virusinfizierten Zellen wurde mittels der YFP-positiven Nuklei aufgrund der IE-Genexpression nach HCMV-Infektion bestimmt. Im Anschluss wurden die Infektionsraten wie folgt bestimmt:

$$\text{absolute Infektionsrate} = \frac{\text{Anzahl der Signale (YFP)}}{\text{Anzahl der Signale (DAPI)}}$$

Zur Titerberechnung wurden diejenigen wells miteinbezogen, die eine Infektionsrate zwischen 30 und 70% aufwiesen. Die Berechnung des Titers erfolgt mit folgender Formel:

$$\text{Titer [infektiöse Einheiten/ml]} = \frac{((- \ln(1 - \text{Infektionsrate})) * \text{Zellzahl})}{\text{Virusvolumen im well}}$$

Die MOI ist ein experimenteller Rahmenparameter. Sie bildet ein Verhältnis der Gesamtzellzahl und der Gesamtzahl infektiöser Partikel. Eine MOI von 1 bedeutet, dass die Zahl der infektiösen Partikel der Zellzahl genau entspricht. Die MOI berechnet sich ausgehend von der Infektionsrate wie folgt:

$$\text{MOI} = (-\ln(1 - \text{Infektionsrate}))$$

Zur Titration wurden technische Triplikate verwendet.

2.2.3 Infektionsassays mit HCMV

2.2.3.1 Klassischer Infektionsassay mit HCMV

Es wurden je 10.000 Zellen in 200µl pro well auf einer 96-well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen experimentspezifisch mit Peptiden behandelt und infiziert. Einzelheiten sind im Folgenden aufgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Abnahme des Mediums von den Zellen wurden diese durch Zugabe von je 100µl 80% Aceton in H₂O zu den wells für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Es erfolgte eine dreimalige Waschung mit je 200µl PBS pro well. HCMV-infizierte Zellen wurden mittels einer Antikörperfärbung gegen IE-HCMV-Proteine detektiert. Dazu wurde der Erstantikörper (antiHCMV IE1 and IE2) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS mit einem Volumen von 100µl pro

well zugegeben und für 90min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaliger Waschung mit je 200µl PBS pro well wurde als Zweitantikörper ALEXAFluor 514 in einem Volumen von 100µl pro well in einer 1:2000-Verdünnung in PBS zugegeben und für 45-60min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter dreimaliger Waschung mit 200µl PBS erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne unter Verwendung einer 1:20.000-Verdünnung von DAPI in PBS mit dem Volumen von 100µl pro well für 8min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die wells erneut dreimalig mit je 200µl PBS gewaschen, nach dem 3. Waschschritt wurde das PBS auf den Zellen belassen. Es erfolgte eine Visualisierung in den Kanälen DAPI und YFP im Cytation3. Zur Auswertung wurden die absoluten Infektionsraten berechnet indem die Zahl der YFP-positiven Zellkerne durch die Zahl der DAPI-positiven Zellkerne dividiert wurde. Eine Normalisierung erfolgte zur Infektionskontrolle, welche nur HCMV-infiziert wurden, aber nicht mit Peptid behandelt wurden. Die Ergebnisse wurden mittels Microsoft Excel berechnet und mit GraphPad Prism grafisch dargestellt.

2.2.3.2 Bestimmung der IC50 der Defensinderivate

Die Bestimmung der IC50, also der Konzentration eines Stoffes bei welcher 50% seiner Wirkung auftritt, wurde mit HFF und ARPE-19 durchgeführt. Die IC50 wurde für die verkürzten Derivate des Referenzpeptids HD5(1-9) bestimmt.

HFF und ARPE-19 wurden am Tag nach dem Aussäen mit einer 1:2-Verdünnungsreihe der Defensinderivate in Zellkulturmedium (5% FCS + 1% P/S) mit dem Startpunkt 100µM behandelt. Die getesteten Konzentrationen waren somit 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM, 6,25µM und 3,125µM. Im Anschluss an die Peptidzugabe wurden die Zellen mit dem HCMV-Stamm TB40E WT infiziert. Als MOI wurden dabei 0,3 für HFF und 4 für ARPE-19 verwendet. Die unterschiedlichen MOIs sind in der verschiedenen Suszeptibilität der Zellkultursysteme für eine HCMV-Infektion begründet. Fixierung und Färbung erfolgte nach dem Infektionsstandardprotokoll.

2.2.3.3 time of addition-Assays

In den Versuchen wurden 5 verschiedene Zeitverhältnisse in der Zugabe des Defensinderivats HD5(1-9) und HCMV getestet. Als Zellkultursystem wurden

HFF verwendet. Die Zugabe des Virus erfolgte somit 3h und 6h nach Defensinzugabe sowie 3h und 6h vor Defensinzugabe. Als Kontrolle wurde die gleichzeitige Zugabe verwendet. Die getesteten Konzentrationen waren 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M und 3,125 μ M. 2 Tage nach Infektion wurden alle Zellen gleichzeitig anhand des Standardprotokolls fixiert und gefärbt (siehe 2.2.3.1).

2.2.3.4 *Ausbreitungssassay*

In den Ausbreitungssassays wurde die Wirkung von HD5(1-9) im Vergleich zu HD5(3-9) auf die Ausbreitung einer bereits bestehenden HCMV-Infektion bestimmt. Dazu wurden HFF mit einer niedrigen MOI (0,15) für 2h mit HCMV TB40EdelUL16 EGFP infiziert und im Anschluss HD5(1-9) beziehungsweise HD5(3-9) in den Konzentrationen 100 μ M, 75 μ M und 50 μ M zugegeben. Zur Visualisierung der Infektionsausbreitung wurden die Zellen mittels SiR-DNA gefärbt. Dieser wurde in einer 1:1000-Verdünnung dem Zellkulturmedium zugegeben. Am selben Tag erfolgte eine Referenzaufnahme in den Kanälen Texas Red und YFP im Cytation3. An den folgenden Tagen erfolgte jeweils eine Visualisierung der Infektionsausbreitung. Eine Fixierung der Zellen und anschließende IE-HCMV-Kontrollfärbung wurde bei fortgeschrittener Infektionsausbreitung (überwacht durch das EGFP exprimierende Virus, das infizierte Zellen im YFP-Kanal des Cytations sichtbar macht) durchgeführt. Aufgrund leicht variierender Geschwindigkeiten der Infektionsausbreitung fand die Fixierung in den Replikaten an Tag 7, 9 und 10 nach Infektion statt.

Während der Infektionsausbreitung wurde die Infektionsrate aus dem Verhältnis der YFP-positiven Signale zu den Texas Red-positiven Signalen im Cytation bestimmt. Die abschließende Fixierung und Färbung erfolgte analog zum Standardprotokoll (siehe 2.2.3.1).

2.2.3.5 *Langzeitstabilität von HD5(1-9)*

HD5(1-9) wurde in Zellkulturmedium bei einer Konzentration von 200 μ M für 7 Tage bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde es in den Konzentrationen 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M und 3,125 μ M auf HFF getestet. Parallel dazu wurde nicht vorinkubiertes HD5(1-9) als Kontrollpeptid in denselben

Konzentrationen getestet. Nach 2 Tagen erfolgte die Färbung anhand des Standardprotokolls (siehe 2.2.3.1).

2.2.3.6 Aktivität von HD5(1-9) bei längerer Infektionsdauer

HD5(1-9) und HD5(3-9) wurden in den Konzentrationen 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM, 6,25µM und 3,125µM auf HFF getestet. Anstelle einer Fixierung und Färbung nach 2 Tagen erfolgte diese nach 7 Tagen anhand des Standardprotokolls (siehe 2.2.3.1).

2.2.4 Versuche zur Bestimmung der Lokalisation und des molekularen Ziels von HD5 (1-9)

2.2.4.1 Antivirale Aktivität der biotinylierten Defensinderivate

Die antivirale Aktivität der biotinylierten Defensinderivate wurde vor weiteren Versuchen auf HFF getestet. Dabei wurden die biotinylierten Derivate HD5(1-9)-biotinyliert sowie HD5(3-9)-biotinyliert in den Konzentrationen 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM, 6,25µM und 3,125µM gegen HD5(1-9) und HD5(3-9) jeweils ohne Biotinylierung getestet. Es wurde der HCMV-Stamm TB40EdelUL16EGFP verwendet. Die Auswertung der Anzahl infizierter Zellen erfolgte mittels initialer Messung der YFP-positiven Signale im Cytation. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100µl 80% Aceton in Wasser für 5min bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert und eine nukleäre Gegenfärbung mit je 100µl einer 1:20.000-Lösung von DAPI in PBS für 8min bei Raumtemperatur vorgenommen. Im Anschluss erfolgte die Messung der DAPI-positiven Signale im Cytation3. Zur Berechnung der Infektionsraten wurden die YFP-positiven Signale auf die DAPI-positiven Signale bezogen.

2.2.4.2 Biotin-Interaktions-Screening

Je 1,5 Millionen HFF wurden in eine T75-Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Abnahme des Mediums und eine halbstündige Inkubation von je 3 Millionen HFF mit je 500µl 100µM HD5(1-9)-biotinyliert oder HD5(3-9)-biotinyliert pro Zellkulturflasche. Im Anschluss erfolgte die Ablösung der Zellen mittels Zugabe von 2ml Trypsin pro Flasche. Die Zellen wurden für

5min bei 300g zentrifugiert und in einem Lysepuffer mit drei verschiedenen Phosphataseinhibitoren für 30min auf Eis lysiert. Die weitere Probenverarbeitung erfolgte in der Proteomics Core Facility der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen durch Frau Katrin Junger und Herrn Karsten Boldt. Hierbei wurden die Zellsuspension bei 4°C und 10000g für 10min zentrifugiert. Nach Durchführung eines Bradford-Assays wurden 10-20µg des Gesamtproteins mittels Streptavidinsäulen gefiltert und enzymatisch verdaut. Nach Aufreinigung erfolgte eine Charakterisierung der biotin-enhaltenden Proteine mittels Massenspektrometrie. Eine Auswertung erfolgte mittels mehrerer Parameter: Lokalisation an der Plasmamembran, Anreicherung des Zielproteins bei HD5(1-9)-biotinyliert im Vergleich zu HD5(3-9)-biotinyliert und vorbekannte Rolle im HCMV-Entry.

2.2.4.3 Generierung von Knockout-Zellen

Um den Einfluss folgender Zielproteine auf die HCMV-Infektionsrate zu untersuchen, wurden für folgende Ziele mittels CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) *guide*RNA-Sequenzen zum nachfolgenden Knockout mittels CRISPR-Cas9 ausgewählt: ITGA5, ITGB1, LRP1, XYLT2, EXT1 und EXT2.

Klonierung der gRNA in das lentivirale Plasmid:

5µg lentiCRISPRv2 (Sanjana et al., 2014) wurden mittels Esp3I für 30min bei 37°C verdaut. Zum Aufschluss wurde der Verdau für 45min bei 100V in 0,8% Agarose aufgetrennt. Die DNA des verdauten Plasmids wurde mit dem *NucleoSpin R Gel and PCR Clean-up-Kit* nach Anweisung des Herstellers extrahiert. Die DNA-Sequenzen wurden mittels T4 PNK für 30min bei 37°C sowie für 5min bei 95°C mit anschließendem Temperaturabfall von 0,1°C/s bis 25°C angelagert. Anschließend wurde mittels T4Ligase das Plasmidrückgrat mit den angelagerten Oligo-Sequenzen für 30min bei Raumtemperatur verbunden.

Transformation:

Zur Transformation wurden 25µl NEB10 beta mit 20µl Ligationmix für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 2-minütige Hitzeschocktransformation bei 42°C, gefolgt von erneuten 2min auf Eis. Nach

Zugabe von 100µl LB-Medium wurde der Mix anschließend für 1h bei 37°C und 700 Schütteleinheiten/min inkubiert. Es wurden im Anschluss 50µl auf Ampicillin (100µg/ml) selektiven Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelkolonien wurden mit einer Pipettenspitze in 50ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Bakterien mit 4000 Umdrehungen/min für 15min pelletiert und die DNA mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System extrahiert.

Sequenzierung:

Eine Bestätigung der Klonierung mittels Sequencing erfolgte nach Zugabe von 5µM des entsprechenden Primers zu 500ng der extrahierten DNA in einem Gesamtvolumen von 10µl (aufgefüllt mit ddH₂O) durch die Firma eurofins.

Lentivirale Transduktion:

Je 500.000 293T-Zellen pro well wurden in einer 6-well Platte ausgesät. 24h später wurde das Medium durch 1,5ml serum-freies DMEM pro well ersetzt. Pro Bedingung wurden 3µg der Plasmid-DNA mit 9µg PEI in 200µl Opti-MEM vermischt und nach 15min Inkubation bei RT tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Nach 4h erfolgte ein Wechsel des Mediums zu 2ml 293T-Medium pro well. 24-36h später erfolgte die Abnahme des Überstands und Aufreinigung durch Zentrifugation bei 3200g für 10min.

Die Zielzellen (ARPE-19, HFF und Caco2) wurden 24h vor Infektion mit den Lentiviren zu je 200.000 (HFF) bzw. 300.000 (ARPE-19 und Caco2) im 6-well Format ausgesät. Zur Infektion wurden je 1ml des lentiviralen Überstands zusammen mit 1ml Zellkulturmedium zu den Zielzellen gegeben. Nach 24h erfolgte ein Wechsel zum Selektionsmedium mit Puromycin.

2.2.4.4 Experimente zur Lokalisation von HD5(1-9) mittels Mikroskopie

Je 2500 HFF wurden pro well auf einer schwarzen 96-well-Platte mit Folienboden ausgesät. 24h später wurden diese mit HD5(1-9)-biotinyliert und HD5(3-9)-biotinyliert in der Konzentration von 100µM für 1h behandelt. Nach Abnahme des Mediums erfolgte eine Fixierung mit 2% PFA in PBS für 10min bei 37°C. Im Anschluss wurde für 1h mit einer 1:200-Verdünnung von Streptavidin-

AlexaFluor514 inkubiert und anschließend mit je 200µl PBS pro well gewaschen. Danach erfolgte eine Kernfärbung mit 1:20000-Verdünnung von DAPI in PBS für 8min. Nach erneuter Waschung erfolgte die Visualisierung mit 40-facher Vergrößerung am Cytation mit den Kanälen DAPI und YFP.

2.2.5 Infektionsassay mit SARS-CoV2

10.000 CaCo2-Zellen wurden in 200µl Zellkulturmedium auf einer 96-well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit HD5(1-9) sowie HD5(3-9) in den Konzentrationen 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM, 6,25µM und 3,125µM behandelt. Im Anschluss wurde SARS-CoV2 mNeonGreen in einer 1:3000-Verdünnung zugegeben und für 48h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Abnahme des Überstands erfolgte eine Fixierung mit 2% PFA in PBS für 10min bei 37°C. Zur Färbung der Zellkerne wurde die PFA-Lösung mit 1:10000 Hoechst33342 versetzt. Nach Abnahme des PFA erfolgte eine zweimalige Waschung mit PBS und die Platte wurde bei 4°C gelagert. Die Visualisierung mit den Kanälen DAPI und YFP erfolgte am folgenden Tag im Cytation3. Die Auswertung erfolgte analog zu den HCMV-Infektionsassays (siehe 2.2.3.1).

2.2.6 Infektionsassays mit HIV

2.2.6.1 klassischer Infektionsassay

Zur Virusproduktion wurden pro 2ml Virusüberstand 600.000 293T-Zellen in einer 6-well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abgenommen und durch 1ml serumfreies DMEM ersetzt. Es erfolgte die Transfektion von NL43WT-DNA mittels PEI. Dabei wurden pro well 3µg DNA und 9µg PEI verwendet. Nach 4h wurde der Überstand abgenommen und durch 293T-Medium ersetzt. 36h später erfolgte die Abnahme des viralen Überstands. Dieser wurde durch Zentrifugation mit 3200g für 10min von Zelltrümmern bereinigt. Für die Infektion wurden je 1 Million CD4+ T-Zellen in 1ml Zellkulturmedium pro well ausgesät. Es erfolgte eine Stimulation mit einer

Endkonzentration von 1:1000 PHA und 1:1000 IL-2. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von HD5(1-9) und HD5(3-9) in den Konzentrationen 100µM und 10µM. Als Kontrolle wurde 0,01% Essigsäure in Wasser verwendet. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des viralen Überstands (500µl pro well), sodass eine 1:3 Verdünnung resultiert. Es erfolgte eine Spinokulation über 45min mit 800g bei 37°C gefolgt von einer Inkubation von 96h bei 37°C. Dann wurden die Zellen abgenommen, durch Zentrifugation (5min bei 500g) vom Zellkulturmedium befreit sowie einmalig mit 500µl PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch 10minütige Inkubation in 2% PFA bei 37°C. Im Anschluss erfolgte die zweimalige Waschung mit PBS mit 1% FCS, jeweils mit Zentrifugation (5min, 500g).

Zur FACS-Färbung wurden die Proben in eine 96 u-well-Platte überführt. Nach Zentrifugation (5min, 500g) und Verwerfen des Überstands wurden die Zellen für 1h bei 4°C in 50µl einer 1:20-Verdünnung mit PE Mouse anti-human CD69 gefärbt. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift mit FACS-Puffer. Zur Permeabilisation erfolgte die Resuspension in 100µl FACS-Puffer mit 0,1% Triton für 7min bei Raumtemperatur. Nach Waschung mit FACS-Puffer erfolgte eine halbstündige Inkubation in PBS mit 10% FCS bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen erneut gewaschen und mit 50µl einer 1:50-Verdünnung des p24-FITC-Antikörpers in FACS-Puffer für 1h bei 4°C gefärbt. Zum Schluss erfolgte ein erneuter Waschschrift und die anschließende Analyse mittels FACS.

2.2.6.2 Untersuchung einer stimulatorischen Wirkung von HD5(1-9)

Es wurden je $1 \cdot 10^6$ CD4+ T-Zellen in 1ml Zellkulturmedium pro well auf einer 12-well-Platte ausgesät. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1µl IL-2 zu den Zellen. Die Versuchszellen wurden zusätzlich mit 100µM HD5(1-9) behandelt, die Kontrollen mit entweder 1µl PHA in Zellkulturmedium oder Essigsäure. Nach 1, 2 und 3 Tagen wurden die Zellen durch Zentrifugation (5min bei 500g) vom Zellkulturmedium befreit sowie einmalig mit 500µl PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch 10-minütige Inkubation in 2% PFA bei 37°C. Im Anschluss erfolgte die zweimalige Waschung mit PBS mit 1% FCS, jeweils mit Zentrifugation (5min, 500g). Anschließend erfolgte eine Färbung für CD69 (PE mouse anti-human CD69) in einer 1:20-Verdünnung für 1h bei 4°C. Ebenfalls erfolgte eine Färbung

für CD25 (PE mouse anti-human CD25) in einer 1:5-Verdünnung für 1h bei 4°C.
Die Auswertung erfolgte mittels FACS.

3 Ergebnisse

3.1 Verkürzte Defensinderivate ohne Aktivität gegenüber HCMV

Aufgrund der bekannten antiviralen Aktivität von HD5(1-9) gegenüber HCMV wurden verkürzte Peptidderivate getestet um zu überprüfen, ob die antivirale Aktivität verbessert werden kann oder Änderungen der Peptidsequenz die antivirale Aktivität negativ beeinflussen. Diese umfassten n- und c-terminale Deletionen von 1 respektive 2 Aminosäuren ausgehend von HD5(1-9) (siehe 2.1.3). Die insgesamt 4 Derivate (HD5(2-9), HD5(3-9), HD5(1-8) und HD5(1-7)) wurden im Vergleich zu HD5(1-9) als Positivkontrolle in einer 1:2-Verdünnungsreihe von 100µM absteigend auf HFF als Modellzielzelle für Fibroblasten sowie ARPE-19 als Modellzielzelle für Epithelien getestet.

Die Infektion mit HCMV wird bei 100µM HD5(1-9) auf HFF nahezu vollständig gehemmt, auf ARPE-19 deutlich vermindert. In den getesteten Konzentrationen unter 50µM weist HD5(1-9) keine antivirale Aktivität mehr auf. Sämtliche verkürzten Derivate weisen überhaupt keine antivirale Aktivität in den getesteten Konzentrationen auf (siehe Abb.5). Eine Infektion mit HCMV wird nicht gehemmt und die Infektionsraten sind in jeder Konzentrationsstufe auf dem Niveau der Infektionskontrolle. Die antivirale Aktivität wird durch die Modifikationen im Sinne einer Verkürzung der Primärstruktur des Referenzpeptids vollständig aufgehoben. Dies lässt sich analog auf HFF sowie auf ARPE-19 beobachten.

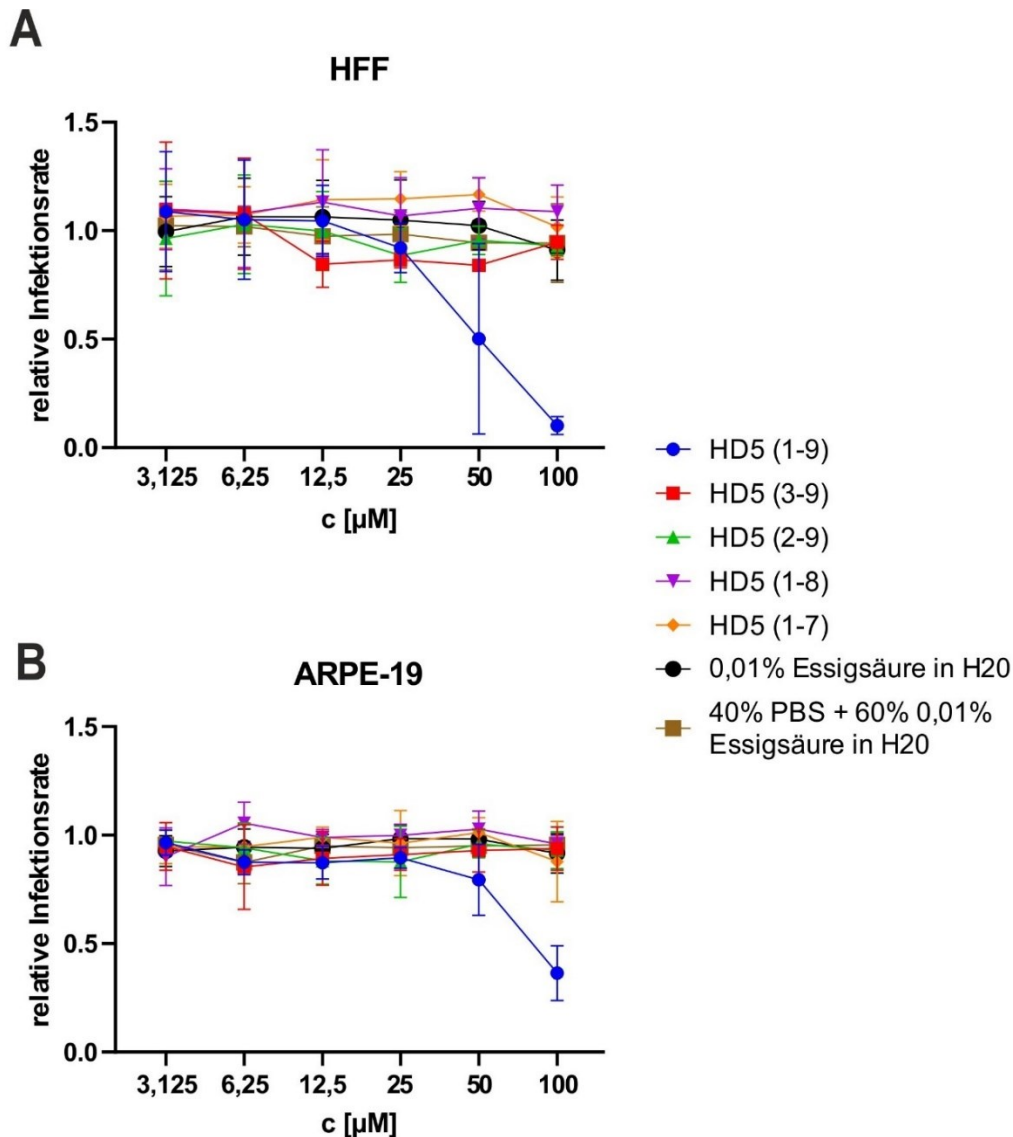


Abbildung 5: Aktivität der verkürzten Peptidderivate von HD5(1-9)

HFF (A) und ARPE-19 (B) wurden in den Konzentrationen 100µM bis 3,125µM mit HD5(1-9) sowie den verkürzten Derivaten behandelt. Im Anschluss erfolgte die Infektion mit HCMV TB40E WT mit einer MOI von 0,2 (HFF) und 4 (ARPE-19). Nach 40 Stunden wurden die Zellen fixiert und auf HCMV IE1/2 und DAPI gefärbt. Aufnahmen erfolgten am Cytation3 multiplate reader. Die Berechnung der relativen Infektionsraten erfolgte durch Normalisierung zu HCMV-infizierten unbehandelten Zellen. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten (n=3) und die entsprechende Standardabweichung (SD).

In diesem Teilversuch wurde für die Defensinderivate eine Mischung von 40% PBS und 60% 0,01% Essigsäure in Wasser als Lösungsmittel verwendet. Für HD5(1-9) wurde wie in den weiteren Versuchen nur 0,01% Essigsäure in Wasser verwendet. Dies ist dadurch begründet, dass die Peptidderivate initial in PBS

gelöst worden waren. In einem Aktivitätsscreening stellte sich heraus, dass die Derivate HD5(1-7) und HD5(1-8) und zu deutlich geringeren Anteilen auch HD5(1-9) in Konzentrationen über 50µM zu einer Präzipitatbildung neigen. Dies macht eine vergleichbare Auswertung unmöglich, da einerseits Areale der wells und somit Zellen überlagert werden und nicht in die Auswertung einbezogen werden können und andererseits aufgrund der Präzipitatbildung eine homogene Verteilung des Peptids und eine mögliche Wirkung am Zielort verändert sein kann. Die Färbung der Präzipitate entstand am ehesten durch eine unspezifische Bindung des Zweitantikörpers ALEXAFluor514. Durch die Mischung des PBS mit 0,01% Essigsäure in Wasser konnte diese Präzipitatbildung zu größten Teilen aufgehoben werden. Letztlich weist die Präzipitation, welche nicht bei HD5(2-9) sowie HD5(3-9) auftrat, auf deutlich veränderte chemische Eigenschaften, welche durch die Verkürzungen der Moleküle hervorgerufen werden, hin. Das Experiment wurde in der beschriebenen Form insgesamt 3-mal für HFF sowie ARPE-19 unter Verwendung technischer Duplikate durchgeführt.

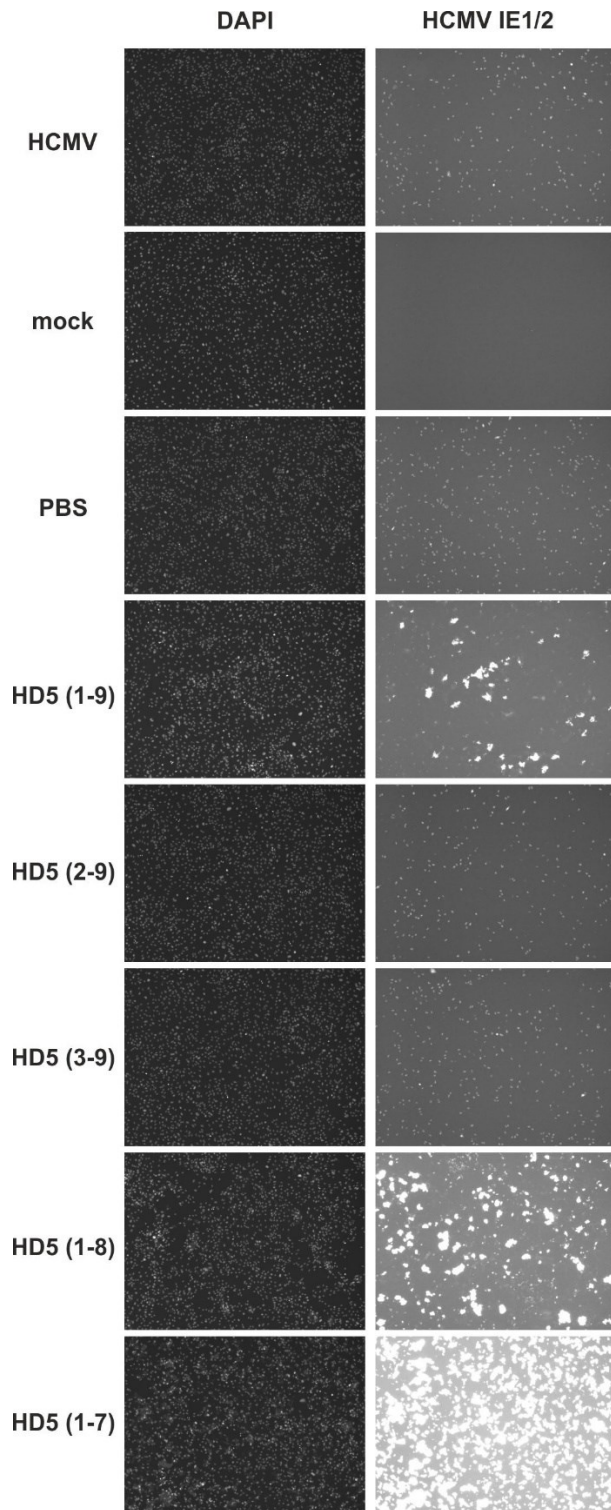


Abbildung 6: Präzipitatbildung der verkürzten Peptidderivate bei Lösung in PBS

ARPE-19 wurden mit den in PBS gelösten verkürzten Derivaten von HD5(1-9) in der Konzentration 150µM behandelt. Im Anschluss erfolgte die Infektion mit HCMV TB40E WT bei einer MOI von 4. Nach 40h wurden die Zellen fixiert und eine Färbung auf HCMV IE1/2 sowie DAPI durchgeführt. Aufnahmen erfolgten im Cytation3 multiplate reader. Es zeigt sich eine Präzipitatbildung in den mit HD5(1-7), HD5(1-8) und HD5(1-9). Diese nimmt bei geringeren Peptidkonzentrationen ab.

3.2 HD5(1-9) weist antivirale Aktivität über längere Zeiträume auf

Zur näheren Charakterisierung der antiviralen Eigenschaften von HD5(1-9) wurde eine Aktivitätstestung gegen HCMV mit einer 7-tägigen Inkubation durchgeführt. Es wurde evaluiert, ob sich die antiviralen Eigenschaften bei längerer Inkubationszeit im Vergleich ändern. Insbesondere stand im Fokus eine mögliche Aktivitätsabnahme beispielsweise durch Degradation des Peptids oder zunehmende Virusreplikation zu untersuchen.

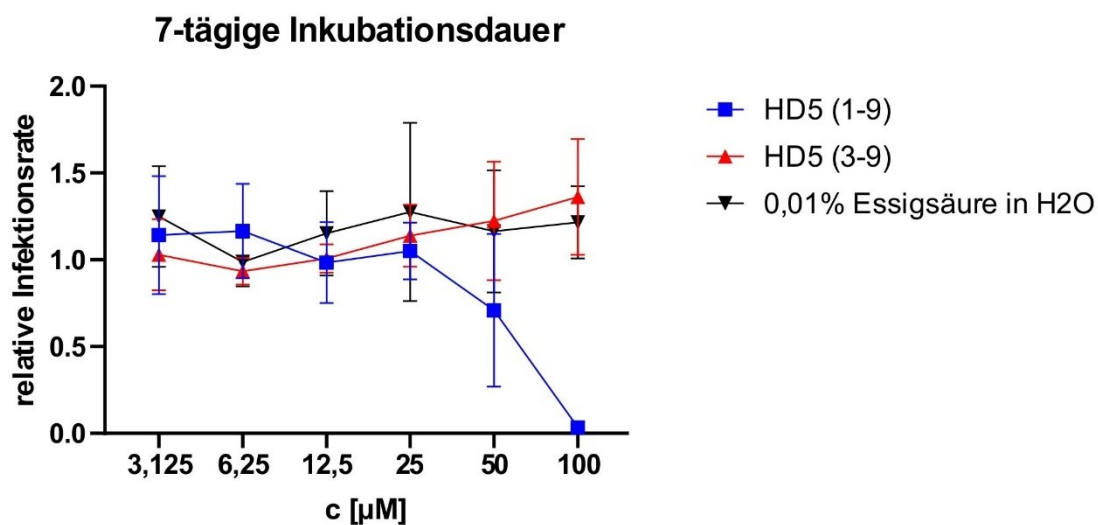


Abbildung 7: Antivirale Aktivität von HD5(1-9) bei 7-tägiger Inkubation

HFF wurden 7 Tage nach Behandlung mit HD5(1-9) und HD5(3-9) und Infektion mit HCMV TB40E WT (MOI =0,2) fixiert. Es erfolgte die Färbung auf IE1/2 und DAPI. Aufnahmen erfolgten am Cytation multiplate reader. Berechnung der relativen Infektionsrate durch Normalisierung zu unbehandelten HCMV-infizierten Zellen. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten (n=3) und die entsprechende Standardabweichung (SD).

Hierfür wurden HD5(1-9) und als Negativkontrolle HD5(3-9) auf HFF in einer 1:2-Verdünnungsreihe von 100µM absteigend getestet. Für HD5(1-9) ergibt sich eine nahezu vollständige Inhibition der Infektion bei 100µM. Bei 50µM zeigt sich eine Reduktion der Infektionsrate auf 71%. Für die weiteren getesteten Konzentrationen zeigt sich nach 7-tägiger Inkubation kein antiviraler Effekt. Trotz einer standardisierten MOI von 0,2 wurden sehr variable Infektionsraten erzielt (18,0%, 31,9% und 82,0%). Dennoch zeigt sich in allen Versuchen die klare Inhibition von HCMV bei einer HD5(1-9) Konzentration von 100µM und ein vergleichbarer Kurvenverlauf. Somit können die unterschiedlichen Infektionsraten als vernachlässigbar betrachtet werden.

Im Vergleich mit einem Infektionszeitraum von 40h (siehe. Abb.5) zeigt sich dabei keine wesentliche Aktivitätsveränderung. Die antivirale Aktivität von HD5(1-9) wird durch eine verlängerte Infektionsdauer nicht beeinflusst.

Das Experiment wurde dreimal unter Verwendung technischer Duplikate durchgeführt.

3.3 HD5(1-9) ist in Zellkulturmedium bei 37°C stabil und zeigt nach Präinkubation antivirale Aktivität

Zur Evaluation der Verwendbarkeit von HD5(1-9) in Experimenten mit längerer Infektionsdauer wurde die Aktivität nach Präinkubation in Zellkulturmedium gemessen. Dazu wurde das Peptid in einer Konzentration von 100µM bzw. 200µM für 7 Tage in Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss erfolgte die experimentelle Verwendung im Vergleich zur Standardlagerung bei -20°C in 0,01% Essigsäure in H₂O. Die Infektionsdauer betrug 40h.

Es zeigt sich ein ähnlicher Kurvenverlauf für die präinkubierte und nicht präinkubierte Bedingung. Für 100µM zeigt sich für die präinkubierte Bedingung eine relative Infektionsrate von 33,2%. Die nicht-präinkubierte Bedingung erreicht eine relative Infektionsrate von 17,5% (siehe Abb.8). Für 50µM wird in der Präinkubation eine relative Infektionsrate von 71,7% erreicht. Die nicht-präinkubierte Bedingung liegt mit 100,9% hier nahezu auf dem Wert der Infektionskontrolle. Alle weiteren getesteten niedrigeren Konzentrationen weisen in beiderlei Fällen keine antivirale Aktivität auf. Insgesamt ist anzunehmen, dass eine 7-tägige Präinkubation in Zellkulturmedium bei 37°C die Aktivität des Peptids allenfalls leicht modifiziert. Eine Degradation oder anderweitiger Aktivitätsverlust des Peptids in Zellkulturmedium ist über einen Zeitraum von 7 Tagen somit vernachlässigbar.

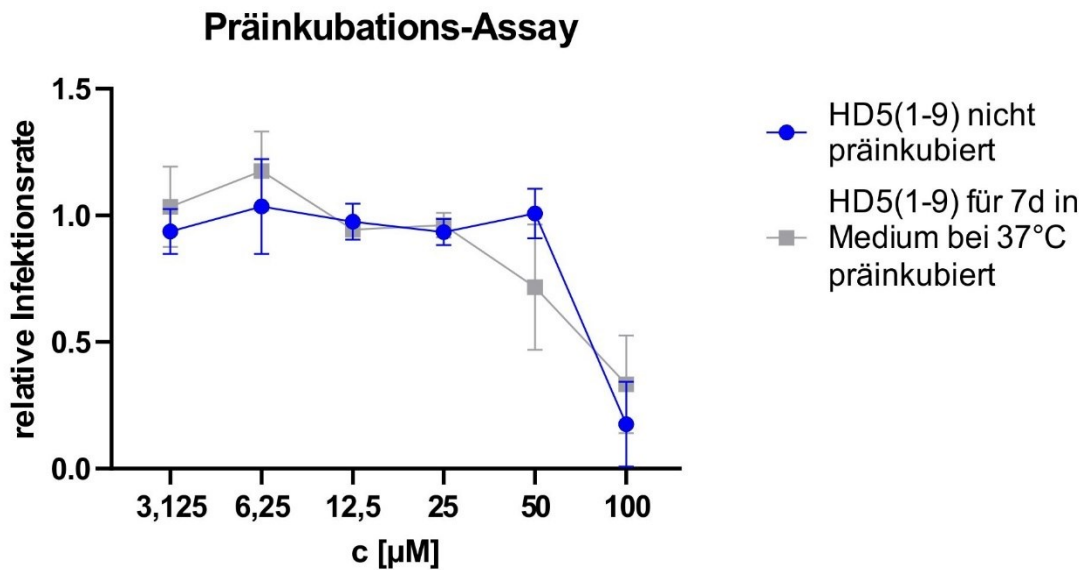


Abbildung 8: Aktivität von HD5(1-9) nach Präinkubation

HD5(1-9) wurde für 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss wurden HFF in den Konzentrationen von 100µM bis 3,125µM mit dem präinkubierten Peptid sowie dem nicht präinkubierten Peptid behandelt und bei einer MOI von 0,3 mit HCMV TB40E WT infiziert. Nach 40h erfolgte die Fixierung und Färbung auf IE1/2 und DAPI. Aufnahmen erfolgten am Cytation. Berechnung der relativen Infektionsrate durch Normalisierung zu unbehandelten HCMV-infizierten Zellen. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten (n=3) und die entsprechende Standardabweichung (SD).

Das Experiment wurde insgesamt 4-mal durchgeführt. Da es im ersten Versuch zu einer hohen Rate unspezifischer und falsch positiver Signale im YFP-Kanal des Cytation kam, wurde dieser nicht in die Auswertung einbezogen. Die Daten entstammen 3 Durchführungen jeweils in technischen Triplikaten.

3.4 Verlängerter *time of addition*-Assay bestätigt Entry-Hypothese

Zur Spezifizierung der antiviralen Eigenschaften von HD5(1-9) wurde ein verlängerter *time of addition*-Assay durchgeführt. Hierbei wurden die Zeitpunkte der Peptidzugabe wie folgt verändert: HD5(1-9) wurde zusätzlich zu den bereits in der Literatur beschriebenen Zugabezeitpunkten 3h vor und nach Infektion sowie der gleichzeitigen Zugabe auch 6h vor und 6h nach Infektion zugegeben. Auch wurden die Peptidkonzentrationen im Vergleich zu den vorigen Versuchen konstant gehalten.

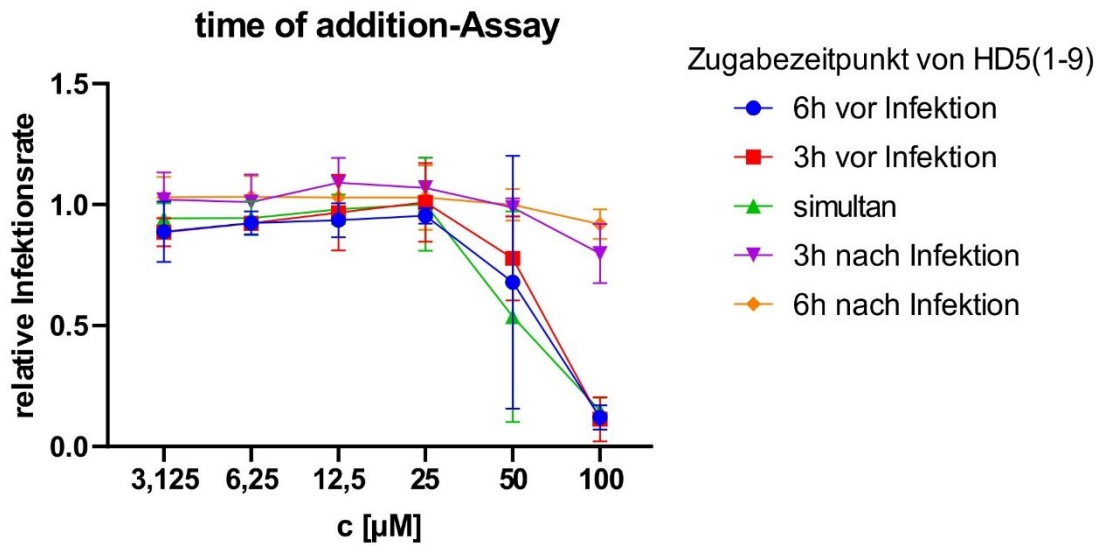


Abbildung 9: Erweiterter *time of addition*-Assay mit HD5(1-9)

HD5(1-9) wurde entweder 6h oder 3h vor Infektion, gleichzeitig mit HCMV TB40E WT (MOI =0,2) oder 3h und 6h nach Infektion in den Konzentrationen von 100μM bis 3,125μM zugegeben. Nach 40h erfolgte die Fixierung und Färbung auf IE1/2 und DAPI. Aufnahmen erfolgten am Cytation multiplate reader. Berechnung der relativen Infektionsrate durch Normalisierung zu unbehandelten HCMV-infizierten Zellen. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten (n=3) und die entsprechende Standardabweichung (SD).

Wird HD5(1-9) 3 oder 6 Stunden nach HCMV zur Zellkultur gegeben, ist die antivirale Aktivität bei 100μM nahezu aufgehoben: Bei Zugabe 3h nach Infektion beträgt die relative Infektionsrate im Mittel 79,9% im Vergleich zu 14,8% bei simultaner Zugabe. Bei der HD5(1-9)-Zugabe 6h nach Infektion liegt die relative Infektionsrate bei 91,9%. Für 50μM liegen die relativen Infektionsraten sowohl bei Zugabe 3h nach Infektion als auch der Zugabe 6h nach Infektion bereits bei 1 und es liegt damit keine antivirale Aktivität vor.

Für die Peptidkonzentrationen von 50 und 100μM zeigt sich eine vergleichbare antivirale Aktivität der folgenden Bedingungen: Zugabe 6h vor Infektion, Zugabe 3h vor Infektion und simultane Zugabe. Von 25μM abwärts zeigt sich für keine Bedingung eine antivirale Aktivität.

3.5 Kein quantifizierbarer Effekt von HD5(1-9) auf die Ausbreitung einer HCMV-Infektion

Es sollte die Wirkung von HD5(1-9) auf die Ausbreitung einer Infektion untersucht und visualisiert werden. Hierzu wurden HFF mit einer niedrigen MOI zunächst für 2h mit HCMV infiziert, bevor HD5(1-9) und als Negativkontrolle HD5(3-9) zugegeben wurden. Die Visualisierung erfolgte sowohl in Form eines live cell imaging über insgesamt 7-10 Tage nach Infektion bis in den verschiedenen Durchführungen eine ausreichende Zahl virusinfizierter Zellen durch ein YFP-Signal detektierbar waren als auch über eine Endpunktmessung durch Fixierung und Antikörperfärbung gegen HCMV IE1/2. Im live cell imaging wurde eine nukleäre Färbung mittels SiR-DNA durchgeführt, welche eine vergleichbare aber insgesamt ungenaue Bestimmung der Zellzahl zulässt. Die Infektionsausbreitung von HCMV erfolgt aufgrund der geringen Zahl initial infizierter Zellen bevorzugt durch Zell-zu-Zell-Infektion, sodass es zu einer Formation von infizierten Zellgruppen kommt, die sich mit zunehmender Zeit ausbreiten. Es zeigt sich eine bevorzugte Ausbreitung der Infektion in den Tagen 2-4 nach Infektion sowie 5-7 nach Infektion. Dies korreliert mit der Dauer, die ein kompletter HCMV-Infektionszyklus benötigt. Die infizierten Zellgruppen werden im Cytation detektiert, ermöglichen aber keine sichere Quantifizierung der Zahl tatsächlich infizierter Zellen. Daher wurde für die finale Auswertung die Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung gegen HCMV-IE1/2 und DAPI verglichen. Für eine MOI von 0,15 zeigt sich hierbei nach 9 bzw. 10 Tagen eine absolute Infektionsrate zwischen 17 und 34% in den verschiedenen Experimenten. Normalisiert zu mit Peptid unbehandelten und nur HCMV-infizierten Zellen zeigt sich für HD5(1-9) in der getesteten Konzentration von 75µM eine relative Infektionsrate von 1. Das bedeutet, dass die Zugabe von HD5(1-9) 2h nach Infektion mit HCMV keinen Effekt auf die folgende Ausbreitung einer Infektion hat. Für die Negativkontrolle HD5(3-9) ergibt sich in den Konzentrationen 75µM bzw. 100µM ebenfalls kein signifikanter inhibitorischer Effekt. Analog zu den time of addition-Versuchen zeigt sich, dass für die antivirale Wirkung des Peptids eine Anwesenheit bei Viruszugabe entscheidend ist.

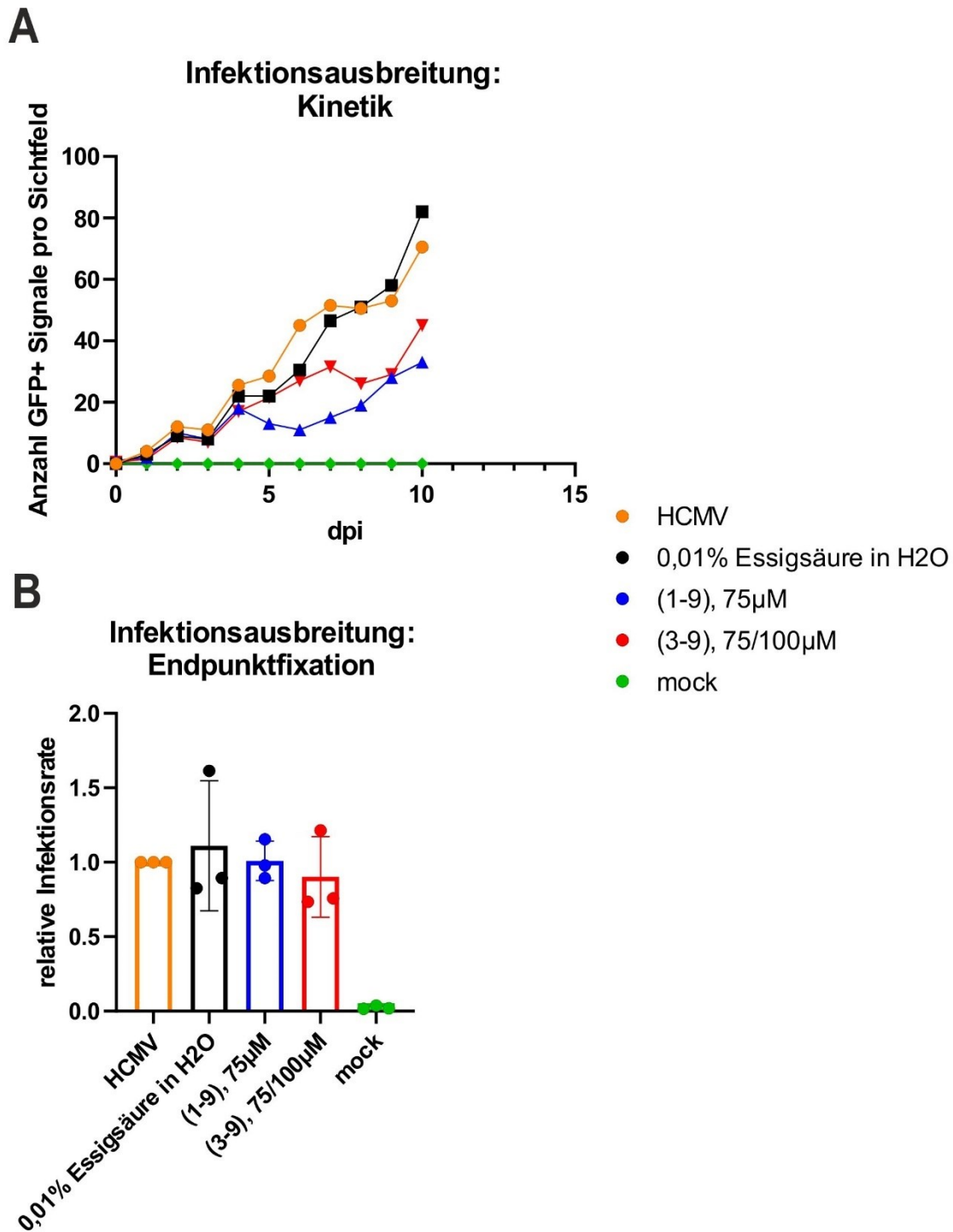


Abbildung 10: Wirkung von HD5(1-9) auf die Ausbreitung einer HCMV-Infektion
 HFF wurden für 2h mit einer MOI von 0,15 mit TB40E-delUL16-EGFP infiziert. Anschließend erfolgte die Zugabe von HD5(1-9) sowie HD5(3-9) in den Konzentrationen von 75µM bzw. 100µM. In den folgenden 9 bzw. 10 Tagen wurde die Infektionsausbreitung mittels GFP+ Zellen im Cytation überwacht. (A) Darstellung eines Replikats der Infektionsausbreitung im Verlauf des Experiments. Anschließend erfolgte die Fixierung und Färbung auf HCMV IE1/2 und DAPI (B). Aufnahmen wurden im Cytation gemacht. Gezeigt sind in (B) jeweils Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten (n=3) und die entsprechende Standardabweichung (SD).

3.6 Targetidentifizierung durch biotinylierte Peptide

3.6.1 *Biotinyliertes HD5(1-9) weist eine vergleichbare Wirksamkeit zu HD5(1-9) auf*

Zur näheren Untersuchung des Wirkmechanismus und möglicher Interaktionspartner wurden die Peptide HD5(1-9) sowie HD5(3-9) mit einer n-terminalen Biotinylierung versehen. Diese ist mittels einer Verbindungsstruktur an das Peptid gekoppelt.

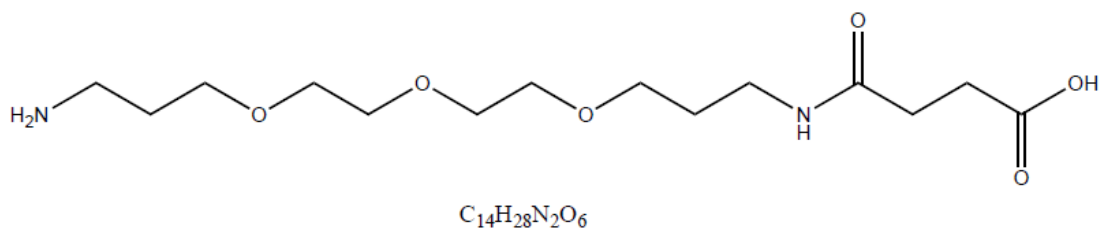


Abbildung 11: Linkerstruktur der biotinylierten Peptide

HD5(1-9) und HD5(3-9) wurden n-terminal mittels dargestellter Linkerstruktur mit Biotin verbunden.

Initial wurde getestet, ob die biotinylierten Peptide eine vergleichbare antivirale Aktivität aufweisen und in den Experimenten keine mikroskopisch sichtbare Zytotoxizität in den getesteten Konzentrationen aufweisen.

Bei Färbung mit IE1/2 sowie ALEXAFluor 514 zeigte sich eine deutliche unspezifische Signalgebung bei bio-HD5(1-9). Da eine Auswertung der Infektionsraten nicht möglich war, wurde der Virusstamm TB40EdeIUL16-EGFP verwendet. Hier zeigt sich für bio-HD5(1-9) in der Konzentration von 100 μ M eine Senkung der relativen Infektionsrate auf 17%. Für das Referenzpeptid HD5(1-9) zeigt sich bei dieser Konzentration eine vollständige Inhibition (siehe Abb.12). Eine ähnliche antivirale Aktivität von bio-HD5(1-9) kann daher angenommen werden. Zudem zeigen die behandelten Zellen keine Zeichen, die auf eine Toxizität des biotinylierten Derivats hinweisen. Die Zahl der pyknotischen Zellkerne, welche kennzeichnend für in Apoptose befindliche Zellen sind, erscheint nicht gesteigert. Auch die Morphologie der HFF zeigt sich weitgehend unverändert. Bei geringeren Konzentrationen zeigt weder HD5(1-9) noch bio-HD5(1-9) eine antivirale Aktivität. Die Zellmorphologie zeigt hier den für eine

HCMV-Infektion typischen zytopathischen Effekt mit einer gleichzeitigen Abrundung der Zellgrenzen und dem partiellen Verlust des Zellkontakts. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass bio-HD5(1-9) eine vergleichbare Aktivität mit HD5(1-9) aufweist und daher als Modell verwendet werden kann.

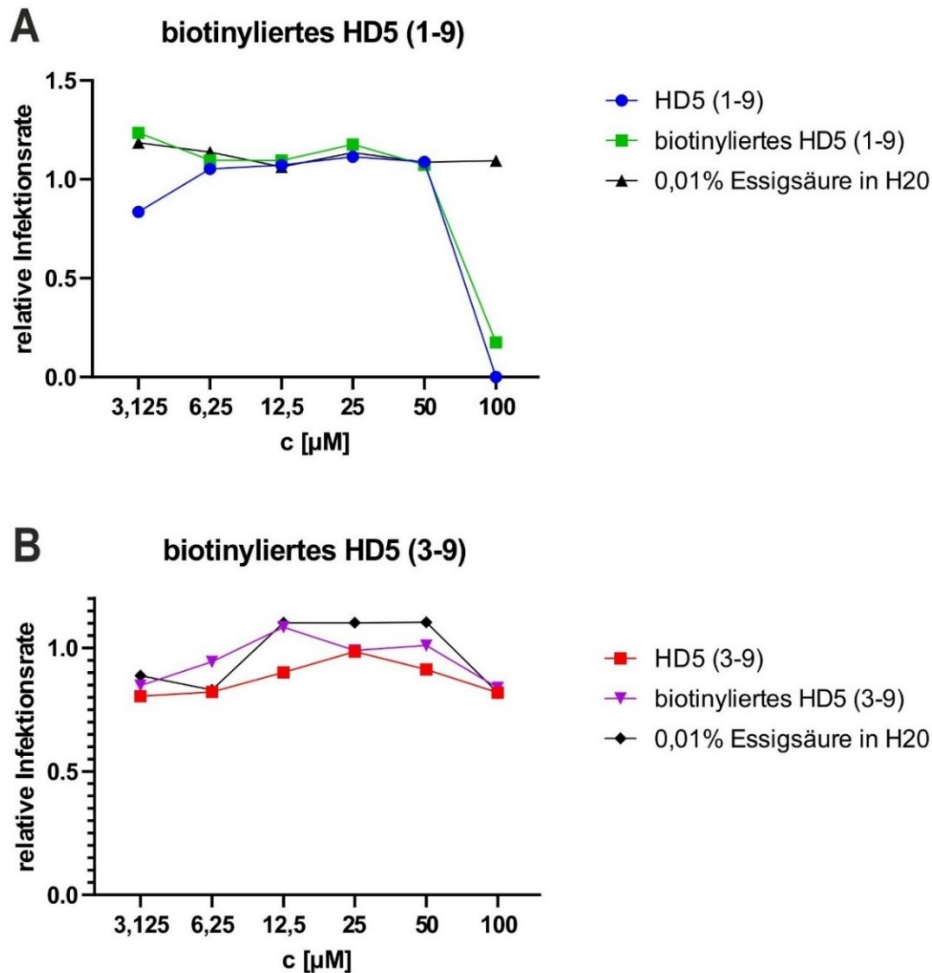


Abbildung 12: Vergleichbare Aktivität der biotinylierten Peptidderivate

Die mit einer Biotinylierung versehenen Peptidderivate wurden gegen HD5(1-9) und HD5(3-9) hinsichtlich ähnlicher antiviraler Potenz getestet. HFF wurden mit den Peptiden in den Konzentrationen von 100 μM bis 3,125 μM behandelt und nach Infektion mit HCMV TB40E WT für HD5(3-9) sowie HCMV TB40E Δ UL16EGFP für HD5(1-9) für 40h inkubiert. Für das biotinylierte HD5(1-9) wurde die Infektionsrate über eine initiale Quantifizierung GFP positiver Zellen und eine nachträgliche DAPI-Färbung bestimmt. Für das biotinylierte HD5(3-9) wurde eine Färbung auf HCMV IE1/2 sowie DAPI durchgeführt. Aufnahmen erfolgten am Cytation. Berechnung der relativen Infektionsrate durch Normalisierung zu unbehandelten HCMV-infizierten Zellen.

Für bio-HD5(3-9) zeigt sich wie bei HD5(3-9) keine Hemmung einer HCMV-Infektion. Gleichzeitig zeigen sich auch für bio-HD5(3-9) keine morphologischen Hinweise einer Zytotoxizität in den getesteten Konzentrationen.

Der Versuch zur antiviralen Aktivität mit den biotinylierten Defensinderivaten wurde einmalig durchgeführt.

3.6.2 Identifizierung molekularer Targets von HD5(1-9) mittels

Massenspektrometrie

HFFs wurden mit biotinyliertem HD5(1-9) und biotinyliertem HD5(3-9) inkubiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen abgelöst und nach Lyse einer massenspektrometrischen Analyse zugeführt mit dem Ziel, mögliche Liganden des biotinylierten HD5(1-9) zu charakterisieren. Mögliche Kandidaten wurden selektiert über eine Lokalisation an der Plasmamembran (als vermuteter Wirkort des Peptids) sowie über eine Anreicherung bei Behandlung mit HD5(1-9) im Gegensatz zu HD5(3-9). Nach erstmaliger Durchführung des Versuchs konnten ITGB1, ITGA5 und LRP1 als mögliche Ziele identifiziert werden. Insgesamt zeigten diese aber keine signifikante Anreicherung bei Behandlung mit biotinyliertem HD5(1-9) im Vergleich zum biotinylierten HD5(3-9). Der Versuch wurde 4-mal durchgeführt.

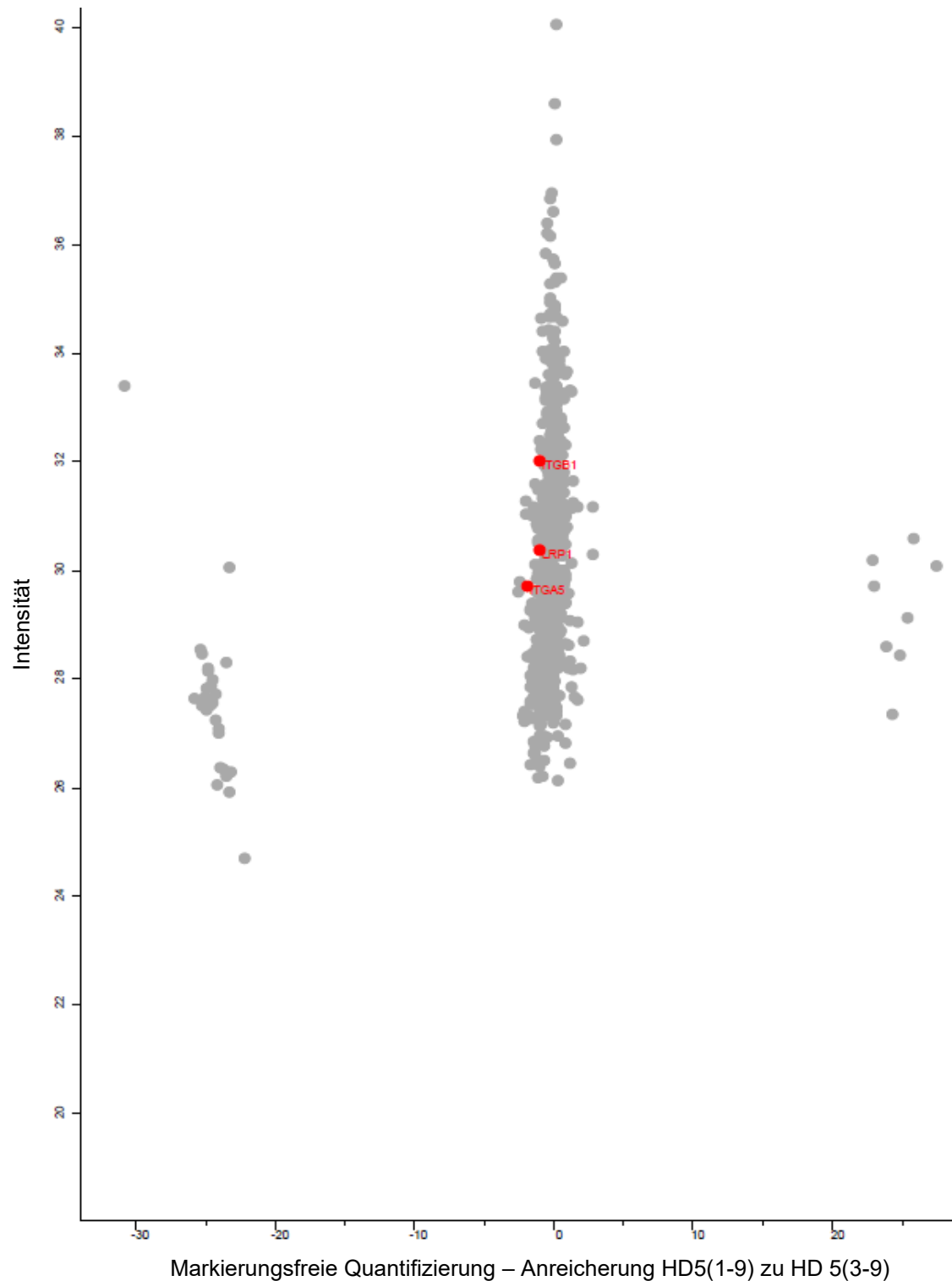


Abbildung 13: Ergebnisse der Massenspektrometrie

Darstellung von Signalintensität und Anreicherung von HD5(1-9) gegenüber HD5(3-9) der detektierten an biotin-gebundenen Proteine in der Massenspektrometrie. Hervorgehoben sind die membranständigen Zielproteine ITGA5, ITGB1 und LRP1 welche für die weitere Analyse ausgewählt wurden. Die Daten entstammen 4 Replikaten der Inkubation von biotinyliertem HD5(1-9) und HD5(3-9) auf HFF.

3.6.3 HCMV-Infektion von Target-KO-Zellen

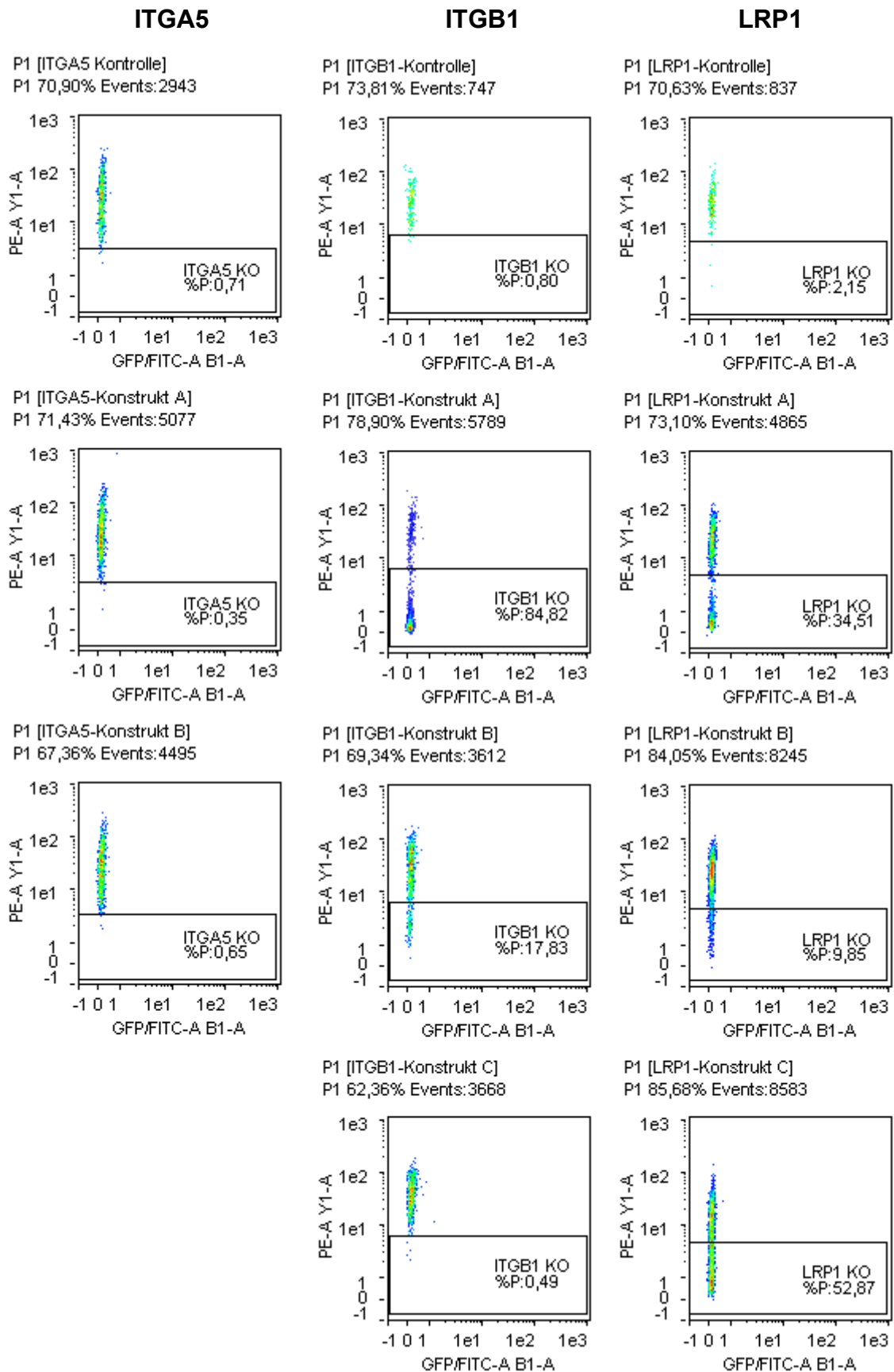
Für die folgenden in der massenspektrometrischen Analyse auftretenden Zielproteine wurden Knockout-Zellen generiert: ITGA5, ITGB1 und LRP1.

Zudem wurde der Abfolge des HCMV-Entry folgend auch auf Syntheseeenzyme für Heparansulfat (EXT1, EXT2 und XYLT2) abgezielt.

Sollten die beteiligten Proteine als Bindungspartner von HD5(1-9) fungieren, besteht die Möglichkeit, dass das Peptid auch seine antivirale Wirkung durch die Interaktion mit dem Protein ausübt. Ein Knockout des Proteins könnte dann ähnlich wie die Bindung von HD5(1-9) an das entsprechende Protein den Eintritt von HCMV in die Zielzelle blockieren und somit zu verringerten Infektionsraten führen

Für den Zelltyp der HFF erwies sich die Generierung von Knockout-Zellen als diffizil, da die Zellen nach Transduktion und Selektion kein suffizientes Wachstum zeigten. Für ARPE-19 konnte ein ITGB1-KO in knapp 85% der Zellen erreicht werden, für LRP1 konnte ein KO in knapp 53% der Zellen erreicht werden. Für ITGA5 wurde kein Knockout erreicht (siehe Abb. 14).

A



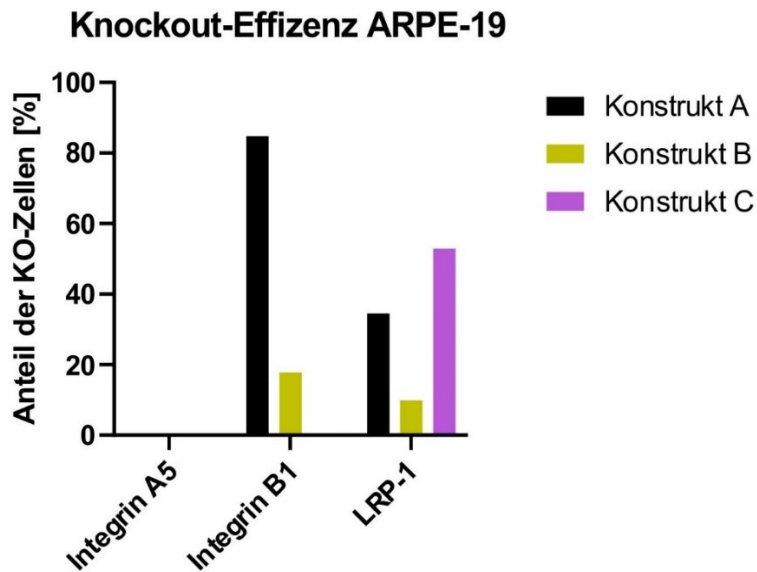
B

Abbildung 14: Knockout-Effizienz der verschiedenen Konstrukte in ARPE-19

Nach lentiviraler Transduktion der Ziel-RNA in ARPE-19 wurden die Zellen mittels Puromycin selektioniert. Anschließend erfolgte die Färbung mit PE-konjugierten Antikörpern gegen ITGA5, ITGB1 und LRP1. Die Quantifizierung erfolgte am MACSQuant VYB. (A) FACS-Plots mit Darstellung des Gating zur Bestimmung der Knockout-Effizienz. (B) Grafische Darstellung der Knockout-Effizienz für die verschiedenen Konstrukte

Für die Knockouts von Enzymen der Heparansulfatsynthese konnte keine klare Reduktion von Heparansulfat auf der Zelloberfläche gezeigt werden.

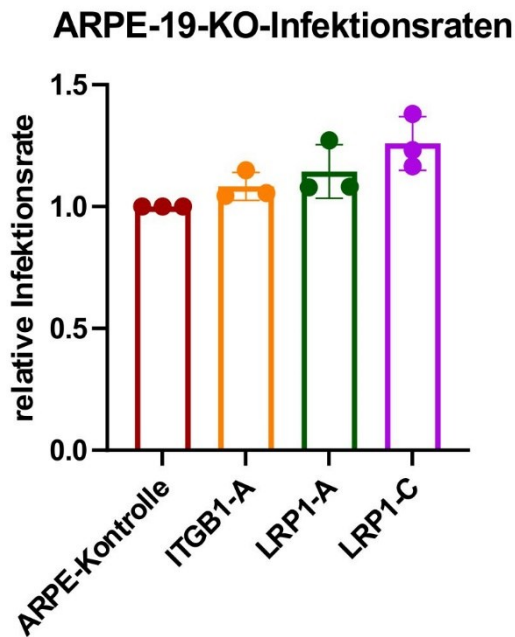


Abbildung 15: Infektionsraten der *Knockout-ARPE-19*

ARPE-19 mit ausgeknockten Zielproteinen und unbehandelte ARPE-19 wurden ausgesät und für mit HCMV TB40EdelUL16 EGFP (MOI=2) infiziert. Nach 24h erfolgte die Fixierung und Färbung auf HCMV IE 1/2 und DAPI. Aufnahmen erfolgten am Cytation. Die Berechnung der relativen Infektionsrate erfolgte durch Normalisierung zu den unbehandelten mit HCMV-infizierten ARPE (ARPE-Kontrolle). Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten (n=3) und die entsprechende Standardabweichung (SD).

Die Infektion der ARPE-KO-Zellreihen mit HCMV zeigte keine deutliche Reduktion der Infektionsraten. Für ITGB1 ergab sich im Mittel eine relative Infektionsrate von 1,08; für LRP1 lag sie bei 1,14 bzw. 1,26 (siehe. Abb.15). Es kann als sehr unwahrscheinlich gelten, dass diese beiden Proteine eine zentrale Rolle für den HCMV-Entry spielen.

3.6.4 Lokalisation von HD5(1-9) in HFF

Um der Verteilung und dem Wirkmechanismus von HD5(1-9) weiter auf den Grund zu gehen, wurden HFF mit dem biotinylierten HD5(1-9) sowie als Kontrollen dem biotinylierten HD5(3-9) und unbehandeltem HD5(1-9) inkubiert und im Anschluss mit gelabeltem Streptavidin gefärbt. Danach erfolgte die Analyse der HD5(1-9) Lokalisation mittels Mikroskopie.

Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Lokalisation zwischen den mit biotinyliertem HD5(1-9) behandelten und den mit biotinyliertem HD5(3-9)

behandelten HFFs. Bei den mit biotinyliertem HD5(1-9) behandelten Zellen zeigt sich eine saumartige Struktur, die die Nuclei umgibt. Diese ist zum Saumrand hin akzentuiert und zeigt teilweise linienähnliche Ausläufer, die mit der Zellkontur der HFFs korrelieren. Bei den mit biotinyliertem HD5(3-9) behandelten Zellen fehlen diese Strukturen nahezu komplett und es kommt nur sehr vereinzelt zu kleineren Signalaggregationen (siehe Abb.16).

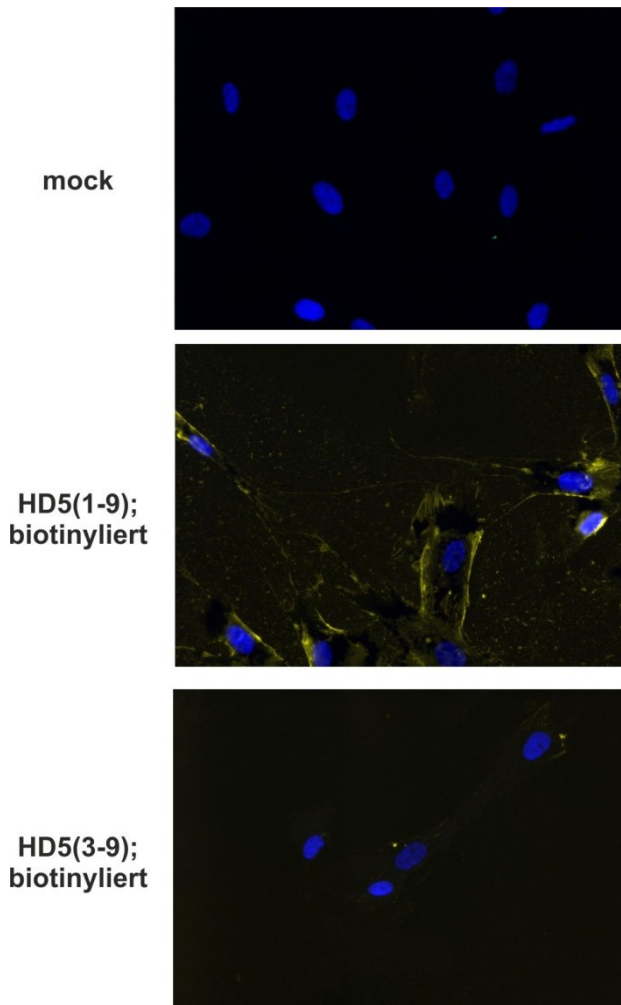


Abbildung 16: Visualisierung der biotinylierten Peptide auf HFF

HFF wurden für 1h mit HD5(1-9)-biotinyliert und HD5(3-9)-biotinyliert behandelt. Nach Abnahme erfolgte die Färbung mit Streptavidin-AlexaFluor514 für 1h und anschließende Visualisierung im Cytation multiplate reader in den Kanälen YFP und DAPI.

3.7 Hinweis auf Interaktion zwischen Heparin und HD5(1-9)

Zur näheren Untersuchung einer möglichen Wechselwirkung von Heparin und HD5(1-9) wurden HFF einzeln mit Heparin und HD5(1-9) sowie in Kombination mit beiden Substanzen behandelt und anschließend mit HCMV infiziert.

Für die einzelne Behandlung mit HD5(1-9) zeigt sich die vorbekannte Inhibition in Konzentrationen von 100µM sowie eingeschränkt von 50µM. Für die Behandlung mit Heparin zeigt sich eine klare Inhibition in Konzentrationen von 8µg/ml und höher, eine halbmaximale Inhibition bei etwa 2µg/ml sowie nahezu keine Inhibition der HCMV-Infektion bei 0,5µg/ml. In der Kombination beider Substanzen zeigt sich eine deutliche Senkung der antiviralen Potenz. Für 100µM HD5(1-9) und 16µg/ml Heparin ergibt sich eine relative Infektionsrate von 0,49. Ab 25µM HD5(1-9) und 4µg/ml Heparin zeigen sich relative Infektionsraten um 1, sodass kein antiviraler Effekt mehr nachweisbar ist (siehe Abb.17). HD5(1-9) und Heparin zeigen somit in Kombination keinen additiven antiviralen Effekt. Vielmehr schwächen sie ihre Wirkung im Vergleich zur jeweiligen Einzelsubstanz deutlich ab.

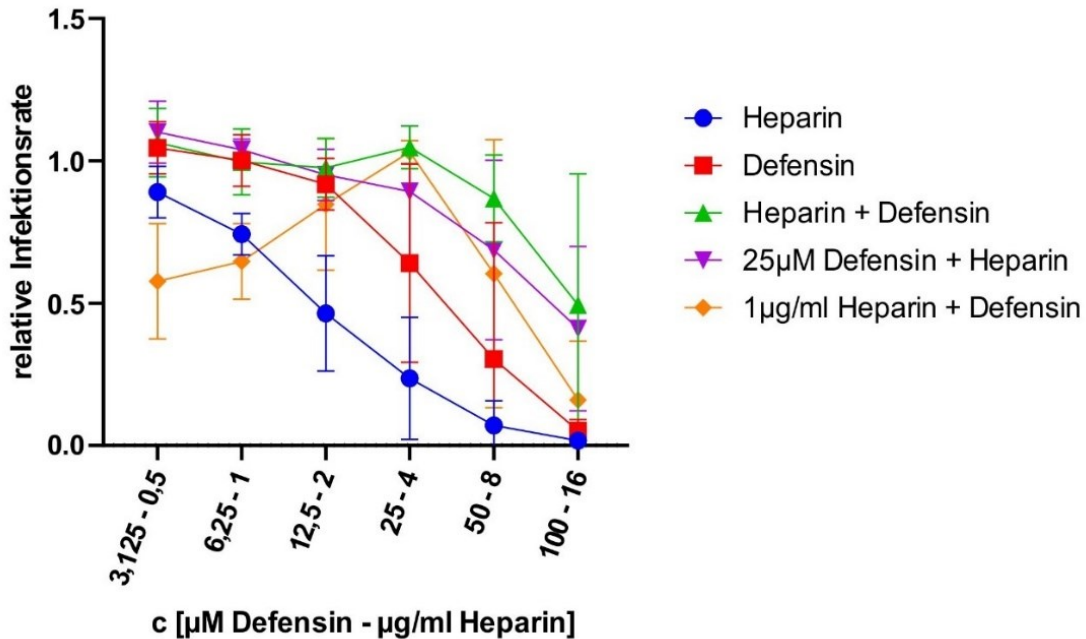
doppelte Inkubation: Heparin und HD5(1-9)

Abbildung 17: Abschwächung der Wirkung von HD5(1-9) und Heparin bei gleichzeitiger Inkubation

HFF wurden mit HD5(1-9) und Heparin in den oben genannten Konzentrationen behandelt und anschließend mit HCMV TB40EdeIUL16EGFP infiziert (MOI = 0,5). 24h nach Infektion erfolgte die Fixierung und Färbung auf HCMV IE 1/2 und DAPI. Aufnahmen erfolgten am Cytation. Berechnung der relativen Infektionsrate durch Normalisierung zu unbehandelten, HCMV-infizierten Zellen. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten (n=3) und die entsprechende Standardabweichung (SD).

3.8 HD5(1-9) inhibiert die Infektion mit HCMV auf Caco2-Zellen

Als weiteres Zellmodell zur Evaluation der antiviralen Aktivität von HD5(1-9) gegen HCMV wurden Caco2-Zellen verwendet. Diese können als Modell für das intestinale Epithel herangezogen werden. Da HD5(1-9) im menschlichen Organismus natürlicherweise in den Darmkrypten vorkommt, können Caco-2 als realitätsnahes Zellkulturmodell angesehen werden. Getestet wurden Konzentrationen von 100μM bis 3,125μM von HD5(1-9) und HD5(3-9) als Negativkontrolle.

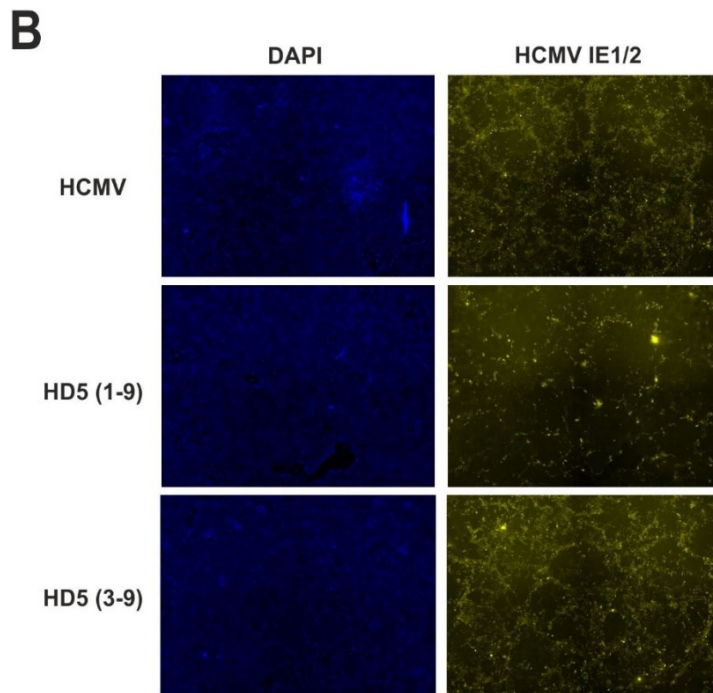
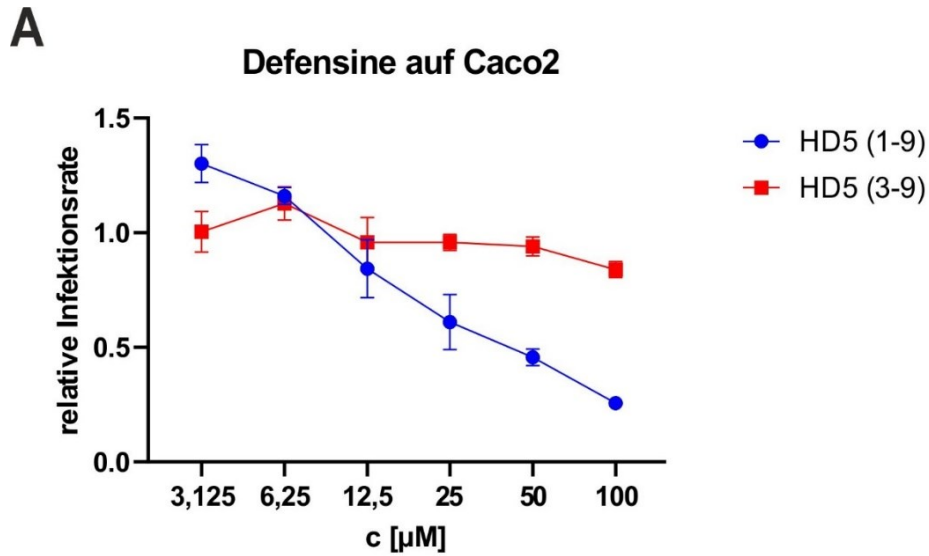


Abbildung 18: Aktivität von HD5 (1-9) gegen HCMV auf Caco2

Caco2 wurden mit HD5(1-9) und HD5(3-9) in Konzentrationen von 100μM bis 3,125μM behandelt und mit HCMV TB40E delUL16-EGFP mit einer MOI von 20 infiziert. 5 Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert und auf HCMV IE1/2 sowie DAPI gefärbt. Aufnahmen erfolgten im Cytation. (A) Relative Infektionsraten bei Normalisierung zu HCMV infizierten und nicht mit Peptid behandelten Caco2. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten (n=3) und die entsprechende Standardabweichung (SD). (B) Aufnahmen von nur HCMV behandelten Zellen (HCMV) und mit HD5(1-9) bzw. HD5(3-9) in der Konzentration von 100μM behandelten Zellen

Bei einer MOI von 20 ergaben sich für Caco2 Infektionsraten zwischen 16% und 36% 5 Tage nach einer Infektion mit HCMV TB40E delUL16EGFP. Für HD5(1-

9) zeigt sich eine dosisabhängige Inhibition der Infektion mit HCMV. In der Konzentration 100 μ M beträgt die relative Infektionsrate 25,7%. Für 50 μ M beträgt sie 45,7%, für 25 μ M 61,1% und für 12,5 μ M 84,4% (siehe Abb. 18, A). In niedrigeren Konzentrationen zeigt sich HD5(1-9) nicht wirksam in der Inhibition einer HCMV-Infektion. Für HD5(3-9) zeigt sich bei keiner der getesteten Konzentrationen eine antivirale Aktivität.

3.9 Keine Aktivität von HD5(1-9) gegen SARS-CoV2

HD5(1-9) wurde auf mögliche antivirale Aktivität gegenüber SARS-CoV2 in Konzentrationen von 100 μ M bis 3,125 μ M untersucht. Als Negativkontrolle wurde HD5(3-9) in denselben Konzentrationen verwendet.

Die Infektionsraten nach 48h Inkubation bewegten sich im Bereich von 11,2 bis 26,6%. Für die Konzentration von 100 μ M beläuft sich der Mittelwert der relativen Infektionsrate für HD5(1-9) auf 1,02 (siehe Abb. 19). Es findet somit in einer gegen HCMV antiviral aktiven Konzentration keine Hemmung einer Infektion mit SARS-CoV2 statt. Auch in den geringeren Konzentrationen bewegen sich die relativen Infektionsraten bei Behandlung der Zellen mit HD5(1-9) um den Wert 1. HD5(1-9) hat in den getesteten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Infektionsraten von Caco2 mit SARS-CoV2. Für HD5(3-9) zeigt sich für die Konzentration von 100 μ M im Mittel eine relative Infektionsrate von 0,70. Eine leichte antivirale Aktivität gegenüber SARS-CoV2 könnte anhand der vorliegenden Daten postuliert werden. Da aber geringere Konzentrationen analog zu HD5(1-9) mit der Infektionskontrolle vergleichbare Werte aufweisen, wurde dieser Befund nicht nachverfolgt.

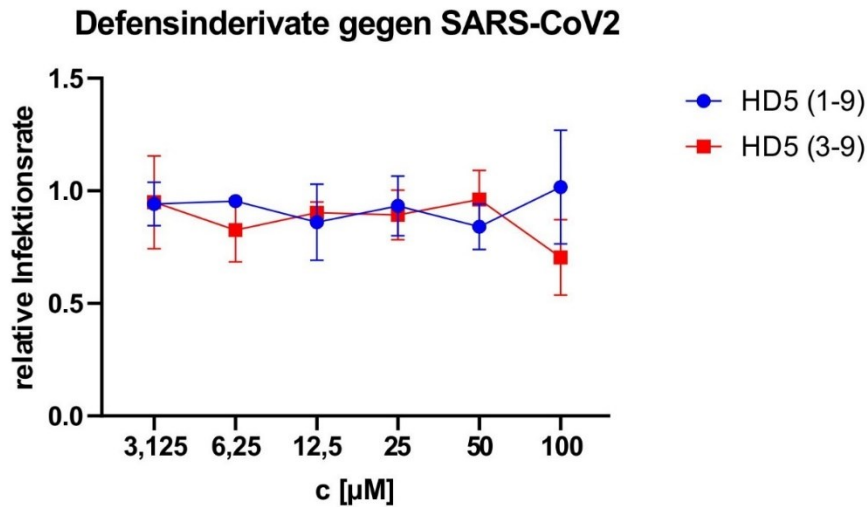


Abbildung 19: Keine antivirale Aktivität von HD5(1-9) gegen SARS-CoV2

Caco2-Zellen wurden mit HD5(1-9) und HD5(3-9) in Konzentrationen von $100\mu\text{M}$ bis $3,125\mu\text{M}$ behandelt und anschließend mit SARS-CoV2-mNeonGreen in einer 1:2000-Verdünnung infiziert. Nach 48h wurden die Zellen fixiert und mit Hoechst 33342 nukleär gefärbt. Aufnahmen erfolgten am Cytation. Die Berechnung der relativen Infektionsraten erfolgte durch Normalisierung zu unbehandelten mit SARS-CoV2 infizierten Zellen. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten ($n=3$) und die entsprechende Standardabweichung (SD).

Das Experiment wurde insgesamt dreimalig unter Verwendung technischer Duplikate durchgeführt.

3.10 Mögliche Verstärkung der HIV-Infektion von CD4+-T-Zellen durch HD5(1-9)

HD5(1-9) wurde auf eine Aktivität gegenüber HIV in humanen CD4+-T-Zellen in den Konzentrationen $100\mu\text{M}$ und $10\mu\text{M}$ getestet. Als Negativkontrolle wurde HD5(3-9) verwendet.

In der Konzentration von $100\mu\text{M}$ zeigt sich für HD5(1-9) im Mittel eine relative Infektionsrate von 1,32. Die Anwesenheit von HD5(1-9) geht also mit einer um etwa 32% gesteigerten Infektionsrate der T-Zellen einher (siehe Abb.20). Einschränkend ist zu beachten, dass die Standardabweichung in den 5 Replikaten beträchtlich ist. Für 2 Replikate zeigte sich nahezu eine Verdopplung der Infektionsrate, während die Infektionsrate der drei anderen Replikate im Wesentlichen im Bereich der Infektionskontrolle lag. Es ist zu berücksichtigen, dass die T-Zellen primären Ursprungs sind und aus dem Blut gesunder

Blutspender isoliert wurden. Jedes Replikat besteht aus T-Zellen eines anderen Spenders. Dies führt zu einer größeren Ergebnisvariabilität im Vergleich zur Arbeit mit klassischen Zellkultursystemen. In der Konzentration von 10µM zeigt HD5(1-9) keinen Effekt auf die Infektionsraten der T-Zellen. Gleiches gilt für HD5(3-9) in den beiden getesteten Konzentrationen (100µM und 10µM).

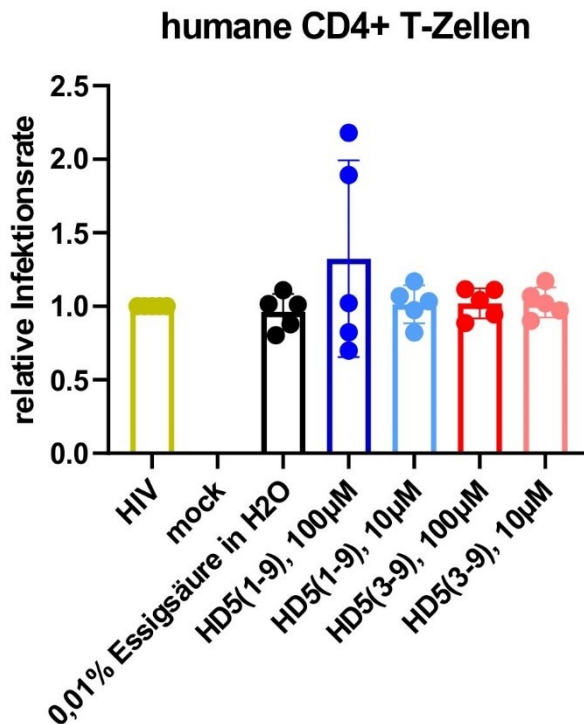


Abbildung 20: Effekt von HD5(1-9) auf die HIV-Infektionsraten von primären T-Zellen

Aus humanem Blut isolierte CD4+ T-Zellen wurden mit PHA und IL-2 stimuliert und anschließend mit HD5(1-9) und HD5(3-9) behandelt. Nach 4 Tagen wurden die Zellen fixiert und mittels Antikörperfärbung gegen p24 untersucht. Die Quantifizierung erfolgte am MACSQuant VYB. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus fünf biologischen Replikaten (n=5) und die entsprechende Standardabweichung (SD).

Eine Evaluation des Virustiters ergab außerdem, dass die Infektionsrate der T-Zellen auch bei deutlicher Reduktion der im Experiment verwendeten Virusmenge annähernd konstant ist. Möglicherweise wird durch eine Überinfektion, also eine zu hohe MOI, ein infektionsverstärkender oder -verringender Effekt maskiert. Eine Normalisierung der Viruslast kann diesem Problem begegnen und die Vergleichbarkeit der Replikate erhöhen.

Zur weiteren Evaluation einer infektionssteigernden Wirkung von HD5(1-9) in der Konzentration 100µM wurde untersucht, ob HD5(1-9) eine stimulierende Wirkung auf T-Zellen hat. Als Positivkontrolle wurde PHA verwendet. Dabei zeigt sich weder eine Induktion von CD69 noch von CD25 als Marker für die Aktivierung von T Zellen. Es ist somit nicht davon auszugehen, dass HD5(1-9) T-Zellen stimuliert.

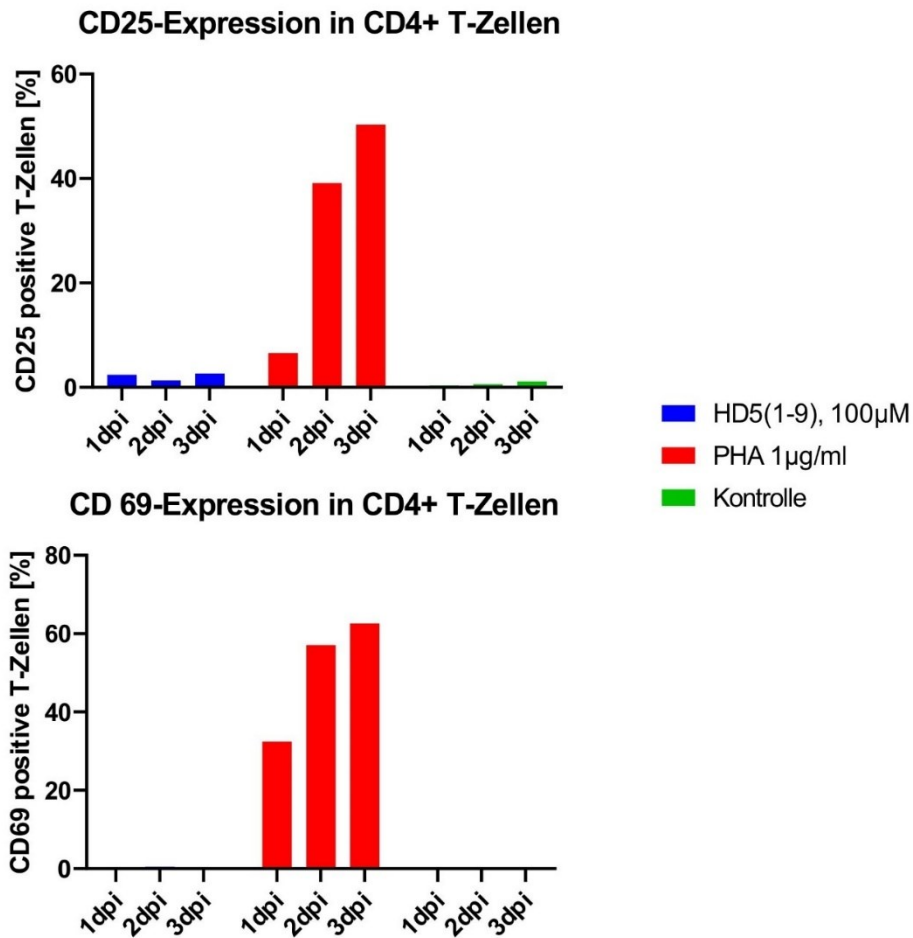


Abbildung 21: Untersuchung einer stimulatorischen Wirkung von HD5(1-9) auf T-Zellen

Aus humanem Blut isolierte CD4+ T-Zellen wurden mit HD5(1-9), 100µM, sowie PHA und Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze behandelt. Nach 1, 2 und 3 Tagen wurden die Zellen fixiert und mittels Antikörperfärbung auf die Oberflächenexpression von CD25 und CD69 untersucht. Die Quantifizierung erfolgte am MACSQuant VYB. n=1

Der Versuch zur Stimulation der T-Zellen wurde einmalig durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 Wirksamkeit von HD5(1-9) gegenüber HCMV

Die antivirale Aktivität von HD5(1-9) in Konzentrationen von über 50µM gegen HCMV ist in verschiedenen Zellkultursystemen beschrieben. Auch eine antibakterielle Aktivität des Fragments wurde bereits gezeigt (Ehmann et al., 2019). Die modifizierten Derivate von HD5(1-9) wurden mit dem Ziel einer Wirkungsoptimierung getestet. Auch wären verkürzte Derivate von HD5(1-9), die eine vergleichbare antivirale Aktivität aufweisen, durch ihre geringeren Synthesekosten von Vorteil.

Alle getesteten verkürzten Derivate von HD5(1-9) sind gegen HCMV in den getesteten Zellkultursystemen (HFF und ARPE-19) inaktiv. Das Nonapeptid HD5(1-9) wird durch die getesteten n- und c-terminalen Verkürzungen wirkungslos. Dies zeigt, dass sowohl das Alanin (Position 1) als auch das Arginin (Position 9) für die Wirkung von HD5(1-9) unerlässlich sind. Es wurde bereits gezeigt, dass der Austausch der Cysteine durch Serin an den Positionen 3 und 5 ebenso wie ein Austausch der Arginine durch Alanin an den Positionen 6 und 9 die antivirale Aktivität von HD5(1-9) deutlich herabsetzt (Böffert et al., 2020). Die vorliegenden Daten ergänzen, dass auch Alanin als apolare Aminosäure für die Gesamtwirkung ein entscheidender Faktor ist. Eine Zusammenschau mit den Studien von Böffert et al. zeigt, dass die Wirksamkeit von HD5(1-9) nicht primär von der Länge/Größe des Peptids abhängt, da die getesteten Varianten (u.a. HD5(1-9) [C3S, C5S]) ebenfalls Nonapeptide sind (Böffert et al., 2020). Eine durch die verkürzten Varianten von HD5(1-9) unterschiedliche Gesamtstruktur der Peptidfragmente kann ebenfalls als unwahrscheinlich gelten, da bereits für das Nonapeptid eine ungeordnete und lineare Struktur angenommen wird. Die Verkürzungen verringern die Molekülgröße und geben so weniger Möglichkeit zu einer komplexeren Struktur im Vergleich zum Referenzpeptid.

Dass Veränderungen der Primärstruktur die anti- oder proviralen Eigenschaften von Defensinen verändern, ist im Hinblick auf andere Viren auch für HD5 beschrieben. Hier wurden einzelne Aminosäuren identifiziert, die bei Testung

gegen HIV für eine gesteigerte Infektionsrate verantwortlich sind (Valere et al., 2017).

Ergänzende Hinweise zu den unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der getesteten Verkürzungen von HD5(1-9) liefert das beobachtete Phänomen der Präzipitatbildung (siehe Abb. 6). Dies betrifft vor allem die Derivate HD5(1-7) und HD5(1-8). Der Verlust des Arginins an Position 9, welcher mit einer Ladungsänderung des Peptids einhergeht, sowie das zusätzliche Fehlen von Glycin (Position 8) führt zu einer Präzipitierung in PBS bei Konzentrationen ab 75µM. Die Beobachtung hebt die enorme Relevanz einzelner Aminosäuren für die Eigenschaft des Gesamtpeptids hervor.

Die im Hinblick auf eine Optimierung der antiviralen Aktivität erfolglosen umfangreichen Testungen strukturmodifizierter Varianten schlagen HD5(1-9) als bereits von Natur aus gegen HCMV optimiertes antiviral aktives Defensinfsegment vor. Der von Ehmann et al. postulierte „Splitterbombeneffekt“, der die Spaltung von HD5 in ebenfalls wirksame Bruchstücke beschreibt, kann durch die vorliegenden Daten weiter unterstützt werden (Ehmann et al., 2019) Im konkreten Fall heißt das, dass die Spaltung von HD5 nicht zufällig zu HD5(1-9) geschieht, sondern mit dem Ziel eine weitere antimikrobiell aktive Substanz zu generieren.

4.2 HD5(1-9) bleibt über eine Woche hinaus stabil und ist antiviral aktiv

In den Experimenten von Böffert et al. wurden sämtliche Infektionsexperimente mit HD5(1-9) mit einer Inkubationszeit von Peptid und Virus auf den Zellkultursystemen von 40h getestet (Böffert et al., 2020). In diesem Zeitraum kann eine Penetration von HCMV in die Zielzelle stattfinden und nachfolgend eine Genexpression der immediate early-Gene einsetzen, deren Genprodukte durch den Infektionsassay mittels Immunfluoreszenz detektiert werden. Ziel der hier durchgeführten Experimente war es zu untersuchen, ob sich durch die Ausdehnung der Inkubation von Peptid und Virus auf 7 Tage Unterschiede in der antiviralen Aktivität ergeben. Der Versuch zur Stabilität des Peptids in Zellkulturbedingungen zeigt, dass eine Degradation allein durch Temperatur oder

Serumbestandteile als vernachlässigbar gelten kann, da die Aktivität auch nach einer Vorinkubation von 7 Tagen vergleichbar ist. Als Nonapeptid ist HD5(1-9) bereits das Ergebnis einer proteolytischen Spaltung aus dem 32 Aminosäuren umfassenden Vollängenpeptid HD5. Bei Entdeckung der Fragmente konnten keine weiteren Bruchstücke von HD5(1-9) identifiziert werden (Ehmann et al., 2019). Eine weitere Prozessierung von HD5(1-9) *in vivo* wurde bislang nicht beschrieben. Die Ergebnisse deuten auf eine Stabilität des Peptids hin, die eine Verwendung in Experimenten mit längerer Inkubationsdauer rechtfertigt. Gleichzeitig lässt sich daraus kein direkter Rückschluss auf eine Stabilität von HD5(1-9) bei oraler Einnahme ziehen. Die schlechte Stabilität von Peptiden ist ein wesentlicher Kontrapunkt in der therapeutischen Anwendung. Ob HD5(1-9) bei einer oralen Aufnahme die Magenpassage übersteht und in hinreichender Menge im menschlichen Darm vorliegt, ist offen. Zunehmend wird versucht, defensinähnliche Substanzen herzustellen oder die Peptide durch chemische Modifikationen in einen stabileren Zustand zu versetzen. Inwieweit sich HD5(1-9) für solche Modifikationen eignet muss kritisch beurteilt werden, da Veränderungen in der Primärstruktur oder Modifikationen die antivirale Aktivität aufheben oder in einer beträchtlichen Toxizität resultieren können (Böffert, 2021). Die Langzeitinkubation von HD5(1-9) zeigt experimentell außerdem keine Zeichen einer gesteigerten Zytotoxizität. Dies bestätigt die Erwartung der umfassenden Zellviabilitätstestungen in der Literatur. (Böffert et al., 2020; Böffert, 2021). Das 7-tägige Infektionsexperiment zeigt keine signifikanten Veränderungen zu den Ergebnissen bei kürzeren Inkubationsdauer. HD5(1-9) hat das Potential, die Infektionsrate der Zellen mit HCMV in einem langfristigen Setting bei einmaliger Applikation gering zu halten. Möglicherweise ist hierfür auch die relativ betrachtet längere Stabilität von HD5(1-9) gegenüber HCMV ausschlaggebend.

Gleichzeitig ist im experimentellen Setting eine Anwesenheit des Peptids bei Viruszugabe von zentraler Relevanz. In den Versuchen zur Infektionsausbreitung konnte kein signifikanter Effekt von HD5(1-9) gezeigt werden. Eine etablierte basale Infektionsrate der Zellkultur breitet sich trotz Zugabe von HD5(1-9) in den Überstand ähnlich schnell aus wie ohne die Zugabe des Peptids. Die

Infektionsausbreitung erfolgt dabei in Clustern, was eine Verbreitung von einer Zelle an ihre direkten Nachbarzellen vorschlägt. Es wurde gezeigt, dass HCMV die Fähigkeit der direkten Zell-zu-Zell-Übertragung besitzt. (Jackson and Sparer, 2018). Möglicherweise ist dieser Mechanismus ausschlaggebend dafür, dass HD5(1-9) in den bislang durchgeführten Versuchen keinen signifikanten Effekt auf die Ausbreitung einer HCMV-Infektion aufweist. Dies ist einerseits bedeutend, da diese Hypothese einen Immunevasionsmechanismus von HCMV postuliert. Ebenfalls kann auf diesem Weg ein Kontakt mit Immunfaktoren wie Antikörpern im Serum umgangen werden (Digel et al., 2006). Angemerkt werden muss, dass im Experiment zur adäquaten Betrachtung der infektiokinischen Parameter nur mit geringen Virusmengen gearbeitet wurde, da eine zu hohe initial infizierte Zellzahl das Studium einer weiteren Infektionsausbreitung unmöglich macht. Bei der großen Zahl nicht-infizierter Zellen kommt es zu keiner signifikanten Viruslast im Serum. Dies stellt einen weiteren wesentlichen Unterschied im Vergleich zum regulären Infektionsassay dar und muss in die Interpretation der Ergebnisse einbezogen werden.

4.3 Verlängerter *time of addition*-Assay bestätigt Entry-Hypothese

Untersuchungen von Böffert et al. haben den Entry von HCMV in die Zielzelle als wahrscheinlichen Zielpunkt der antiviralen Aktivität von HD5(1-9) vorgeschlagen (Böffert et al., 2020). Entscheidend für die antivirale Wirkung ist die Anwesenheit des Peptids bei Zugabe des Virus zum Zellsystem. Der verlängerte *time of addition*-Assay stützt diese Behauptung und bestätigt die bereits vorliegenden Daten (Böffert et al., 2020). Eine Präinkubation von Peptid und Zellen von bis zu 6h hat keine Aktivitätssteigerung des Peptids zur Folge. Gleichzeitig fällt die Aktivität von HD5(1-9) drastisch ab, wenn es 3 bzw. 6h nach dem Virus zu den Zellen zugegeben wird. Für die Zugabe des Peptids 6h nach der Viruszugabe kann auch bei hohen Konzentrationen praktisch keine antivirale Aktivität festgestellt werden. Die isolierte Inkubation von Virus und Zellen führt zu einer Penetration viraler Partikel in die Zelle und zur Infektion derselben. Ein Entry-Inhibitor verliert seine Wirkung, wenn er zeitlich nach der Virusinfektion zum

Zellkultursystem gegeben wird. Dieses Charakteristikum von HD5(1-9) wurde im Assay erneut bestätigt. Inwieweit auch eine Hemmung der viralen Replikation durch HD5(1-9) stattfindet kann durch die Assays nicht sicher bestimmt werden. Hierzu wäre eine Quantifizierung der HCMV-Genomkopien im Überstand bei Zugabe des Virus nach bereits erfolgter Infektion notwendig.

4.4 Nähere Untersuchungen des Wirkmechanismus von HD5(1-9) bei der Blockierung des HCMV-Eintritts in die Zielzelle

Eine Limitation der weiteren Charakterisierung von HD5(1-9) und seiner Wirkung ist die eingeschränkte Nachweisbarkeit von HD5(1-9). Klassische Nachweismethoden wie Antikörper gegen HD5(1-9) sind nicht verfügbar, sodass die Wirkung indirekt über die HCMV-Infektion der Zelle (infiziert oder nicht infiziert) bestimmt wird. Dies erschwert die Bestimmung konkreter molekularer Zielstrukturen von HD5(1-9). In Versuchen von Rebecca Böffert (Böffert, 2021) wurde gezeigt, dass ein Cy5-getaggtetes HD5(1-9) in hohem Maße zytotoxisch ist und somit keine vergleichbare Wirkung zu HD5(1-9) aufweist. Mittels Biotinylierung von HD5(1-9) konnten weitere Experimente durchgeführt werden, nachdem überprüft wurde, dass auch die biotinylierte Form von HD5(1-9) antiviral aktiv ist (siehe Abb.12) und keine erhöhte Zytotoxizität aufweist. Unter Verwendung Massenspektrometrie sollten mögliche Bindungspartner von HD5(1-9) analysiert werden. Das biotinylierte Peptid wurde auf den Zellen inkubiert, welche anschließend abgelöst und lysiert wurden. Das Lysat wurde mittels Streptavidin, einem natürlichen Bindungspartner des Biotin, gefiltert und die resultierenden Partikel massenspektrometrisch analysiert. Die erhaltenen Zielmoleküle wurden gefiltert nach den Kategorien Spezifität (nur beim biotinylierten HD5(1-9), nicht aber beim biotinylierten HD5(3-9) vorkommend) und Zellmembranlokalisation ausgewertet. In einem ersten Durchlauf konnten die membranständigen Proteine Integrin β -1, Integrin A-5 und LRP1 als mögliche Bindungspartner identifiziert werden. Gleichwohl zeigten sich die Proteine nicht als signifikant angereichert bei HD5(1-9) gegenüber HD5(3-9). Dennoch wurden die Proteine mittels Generierung von Knockout-Zellen näher untersucht und

schließlich als nicht für die HCMV-Infektion notwendig bewertet. Es zeigt sich keine Senkung der Infektionsrate mit HCMV in den Knockout-Zellen. Integrin β -1 und LRP1 sind somit nicht für die HCMV-Infektion essentielle Proteine. Für Integrin β -1 ist eine Rezeptorfunktion für HCMV beschrieben (Feire et al., 2004; Feire et al., 2010). Ob eine Bindung von HD5(1-9) an die oben genannten Moleküle vorliegt, kann aufgrund der Limitationen des experimentellen Aufbaus nicht abschließend beantwortet werden. Die Bindung von HD5(1-9) an die Zellen wurde als reversibel charakterisiert (Böffert et al., 2020). Gleichzeitig war experimentell zur Ablösung der Zellen eine Trypsinierung notwendig, welche diese Bindung beeinflussen könnte. Die anschließende Lyse stellt eine noch größere Problematik dar. Einerseits könnte das biotinylierte Defensinderivat mit zahlreichen Strukturen intrazellulär in Kontakt kommen, die es sonst aufgrund der Membranbarriere möglicherweise gar nicht erreicht. Andererseits könnte durch die Lyse auch die Bindung von HD5(1-9) und Zielprotein aufgehoben werden. Auch ist nicht untersucht, ob die Biotinylierung von HD5(1-9) während der Lyse stabil bleibt. Weitere Versuche zur Untersuchung des molekularen Zielstrukturen von HD5(1-9) sollten diese Limitationen unter Berücksichtigung des reversiblen Bindungscharakters von HD5(1-9) kritisch berücksichtigen.

Gleichzeitig wurden KO-Zellen generiert, in welchen Enzyme der Heparansulfatsynthese ausgeschaltet wurden. Hier konnte keine KO-Effizienz bestimmt werden. Mögliche Erklärungen hierfür sind der Detektionsantikörper gegen N-sulfatiertes Heparansulfat, welcher kein eindeutiges Signal gezeigt hat sowie die Hypothese, dass das Ausschalten der unterschiedlichen Enzyme allein nicht ausreichend für die Reduktion der Heparansulfatexpression ist. Zur weiteren Abklärung wäre das Arbeiten mit gesichert Heparansulfat-defizienten Zellen, im Idealfall sowohl durch einen Knockout als auch durch eine enzymatische Spaltung. Von diesen ist bereits beschrieben, dass die HCMV-Infektion entscheidend vermindert wird (Compton et al., 1993). Mit diesen Zellen könnten Unterschiede in der Bindung von HD5(1-9) untersucht werden.

Des Weiteren wurde mit den biotinylierten Peptiden eine indirekte Visualisierung von HD5(1-9) möglich. Durch die Biotinylierung wird eine Streptavidin-Markierung des Peptids möglich, welche Rückschlüsse auf die zelluläre

Lokalisation zulässt. Hierbei zeigen sich klare Unterschiede zwischen HD5(1-9) und HD5(3-9). HD5(1-9) zeigt ein zelluläres Lokalisationsmuster, das sich auch bei Permeabilisierung der Zellen nicht relevant verändert. HD5(3-9) zeigt insgesamt ein schwächeres Signal und eine deutlich geringere zelluläre Lokalisation. Die Ergebnisse untermauern die Wirksamkeit von HD5(1-9) im Gegensatz zu den verkürzten Derivaten. Ebenfalls sind sie ein weiterer Hinweis auf eine Wirkung des Peptids, die an der Zellmembran stattfindet. Zur weiteren Untersuchung wäre eine hochauflösendere Mikroskopie eine Möglichkeit, die Lokalisation näher zu charakterisieren. Auch könnten noch andere Zelltypen untersucht werden, um das Verteilungsmuster zu bestätigen. Schließlich kann die Visualisierung des Verteilungsmusters auf Heparansulfat-defizienten Zellen einen zentralen Hinweis zum Bindungspartner von HD5(1-9) geben. Ein kompetitives Molekül in der Bindung des Heparansulfats könnte ebenfalls in seiner Wirkung auf die Verteilung von HD5(1-9) untersucht werden.

4.5 Hinweise auf Interaktion von HD5(1-9) und Heparansulfat als Schlüssel zum Wirkmechanismus von HD5(1-9)

Nach der Hypothese, dass HD5(1-9) mit dem Entry von HCMV interferiert, wurden im nächsten Schritt eine mögliche Interaktion mit einem bereits bekannten Entry-Inhibitor von HCMV, dem Heparin, getestet. Heparine sind anionische Moleküle, die aus langen Ketten sulfatierter Zuckerbausteine bestehen. Früh wurde seine Wechselwirkung mit dem Eintritt von HCMV beschrieben (Compton et al., 1993). Diese ist analog zu den Resultaten mit HD5(1-9) konzentrationsabhängig sowie abhängig vom Zeitpunkt der Zugabe. Eine Zugabe von Heparin nach der Virusinfektion geht mit einem Verlust der antiviralen Aktivität einher. Als zellulärer Rezeptor wurde Heparansulfat identifiziert. Die initiale Bindung von HCMV an Heparansulfat stellt am ehesten eine Anreicherung der Virionen auf der Zelloberfläche dar. Bei längerer Inkubation von Zellen und HCMV zeigt sich eine zunehmende Insensitivität gegenüber Heparin als antiviralem Wirkstoff sowie eine geringere Reversibilität der HCMV-Bindung zur Zelloberfläche bei Waschung mit Salzlösung (Compton

et al., 1993). Aufgrund der sehr ähnlichen kinetischen Eigenschaften der Inhibition von HCMV durch HD5(1-9) und Heparin wurden beide Substanzen koinkubiert und auf eine mögliche additive Wirkung getestet. Dabei zeigt sich ein Wirkverlust bei gemeinsamer Zugabe: Sowohl Heparin als auch HD5(1-9) sind bei Koinkubation in einem geringeren Maße antiviral aktiv wie als Einzelsubstanz. Die abnehmende antivirale Potenz bei gleichzeitiger Inkubation legt eine gegenseitige Bindung von Heparin und HD5(1-9) nahe, welche zu einer geringeren Menge antiviral aktiver Substanzen und somit zu einer erhöhten Infektionsrate führt. Eine Bindung von Heparin und HD5(1-9) wäre ein klarer Hinweis auf einen ähnlichen Wirkmechanismus beider Substanzen. Als Vergleichssubstanz könnte mit HD5(3-9) gearbeitet werden, dass antiviral inaktiv ist. Analog ist von Interesse, ob auch HD5 als Vollängenpeptid eine Interaktion mit Heparin aufweist. In der antiviralen Aktivitätstestung erweist sich HD5 genauso wie HD5(1-9) als potent, jedoch mit einem ungünstigeren Toxizitätsprofil. Von Interesse ist hier, dass eine ähnliche Interaktion in Bezug auf HIV zwischen Heparin und HD5 beschrieben ist: Eine Gabe von Heparin in höheren Konzentrationen verringert den HIV-verstärkenden Effekt von HD5. In Zellen, die mit Heparinase vorbehandelt wurden, trat die HD5-vermittelte Verstärkung der HIV-Infektion zudem besonders stark auf (Rapista et al., 2011).

Für Heparansulfat als potentielles Zielmolekül von HD5(1-9) spricht neben der ähnlichen inhibitorischen Kinetik sowie der möglichen Interaktion mit Heparin auch das breite Vorkommen. Da es nahezu ubiquitär auf der Zelloberfläche vorhanden ist, könnte der breite Tropismus von HD5(1-9) erklärt werden. Für das Entry von HCMV sind je nach Zelltyp unterschiedliche Rezeptoren und Mechanismen beschrieben. HD5(1-9) inhibiert eine Infektion unabhängig vom Zelltyp und wirkt daher möglicherweise als Attachment-Inhibitor. HCMV könnte sich nicht mehr über Heparansulfat an der Zelloberfläche anreichern, und eine weitere Penetration über Neuropilin-2 oder PDGFR α kann nicht auftreten.

Eine Interaktion mit Heparansulfat zur Inhibition einer HCMV-Infektion wurde zuvor bereits für weitere Substanzen beschrieben: Die Protein-Dendrimere SB105 und SB105_A10 zeigen ähnliche Eigenschaften wie HD5(1-9) in der Inhibitionscharakteristik einer HCMV-Infektion (Luganini et al., 2010). Als

Dendrimere bezeichnet man verzweigt aufgebaute kleine Moleküle (Rosa Borges et al., 2005). Auch für nicht verzweigte Peptide existieren Beispiele einer Interaktion mit Heparansulfat: Für das 45 Aminosäuren lange Peptid p5+14 konnte eine Inhibition der Infektion von HCMV mit einer IC50 von 5,2 µM gezeigt werden (Dogra et al., 2015). Eine positive Gesamtladung des Moleküls wurde als zentral für die antivirale Aktivität postuliert. Als Wirkmechanismus wurde eine Bindung an die zelluläre Oberfläche vorgeschlagen. Eine Präinkubation mit Heparin verringerte zudem die antivirale Aktivität von p5+14. Des Weiteren zeigt p5+14 eine Aktivität auch gegen Herpes simplex Viren 1 und 2 (Dogra et al., 2015). Von besonderer Bedeutung in der Entwicklung antiviral aktiver Substanzen mittels Attachment-Hemmung von HCMV ist dabei, dass es bereits Daten zur Reduktion der HCMV-Viruslast *in vivo* gibt. Diese sind für das 26 Aminosäuren umfassende Peptid p5RD in Mäusen gegenüber HCMV beschrieben (Pitt et al., 2016). Gleichzeitig ist diese Reduktion nicht so prominent verglichen mit der Inhibition *in vitro*. Als Möglichkeit wird von den Autoren hier eine Infektionsausbreitung vorgeschlagen, die weniger von Heparansulfat abhängig ist, wie beispielsweise eine direkte Zell-zu-Zell-Ausbreitung (Pitt et al., 2016). Jackson et al. heben dagegen hervor, dass eine *in vivo*-Applikation eines *in vitro* gegen HCMV aktiven Peptids auch erfolglos sein kann. Für das oben beschriebene p5+14 zeigte sich gegenüber HCMV *in vivo* kein signifikanter antiviraler Effekt. Die Autoren legen in ihren Versuchen nahe, dass die direkte Zell-zu-Zell-Ausbreitung von Heparansulfaten unabhängig ist (Jackson et al., 2019). HD5(1-9) könnte sich als Nonapeptid in die Reihe gegenüber HCMV aktiven peptid(-ähnlichen) Substanzen einordnen, die an Heparansulfat binden. Eine genauere Untersuchung über die Ergebnisse dieser Arbeit hinaus, ob und inwieweit die Ausbreitung einer bereits etablierten HCMV-Infektion eingeschränkt werden kann, ist für die Weiterentwicklung von HD5(1-9) von relevanter Bedeutung. Gleichzeitig kann eine Applikation *in vivo* im Mausmodell nach vorhergehender Testung gegenüber HCMV *in vitro* wertvolle Ergebnisse liefern. Die Schwierigkeiten der Verwendung von antiviralen Substanzen mit dem Ziel der Blockade der Heparansulfat-HCMV-Interaktion *in vivo* wurden bereits diskutiert. Die divergierenden Ergebnisse in der Literatur bezüglich der antiviralen

Wirkstärke *in vivo* zeigen aber auch, dass eine Aktivität von HD5(1-9) im Mausmodell nicht pauschal ausgeschlossen werden kann.

4.6 Caco-2-Zellen als Modell der antiviralen Aktivität von HD5(1-9)

Die proteolytische Spaltung von HD5 tritt nach Exkretion desselben und anderer Effektormoleküle des Immunsystems in das Darmlumen auf. Natürlicherweise vorkommende Proteasen zerlegen HD5 in verschiedene Bruchstücke, darunter HD5(1-9). Die bereits getesteten Zellkultursysteme der antiviralen Aktivitätstestung waren HFF als Modell des Bindegewebes, Makrophagen als Immunzellen sowie ARPE-19 als epitheliale Zelltypen. Alle drei stellen ein für HCMV wichtiges Reservoir mit unterschiedlichen Funktionen im Infektionszyklus dar (Sinzger et al., 2008). Gleichzeitig kommt aber keines der getesteten Systeme *in vivo* mit HD5(1-9) in unmittelbarem Kontakt, da nach Ausschüttung in das Darmlumen das intestinale Epithel die unmittelbare Kontaktfläche. Neben seiner Funktion als Grenzschicht hat das Darmepithel eine besondere Stellung im menschlichen Körper, da es umfangreiche Resorptionsfunktionen steuert, eine zentrale immunologische Pforte ist und auch eine pharmakologisch relevante Barriere ist. Um einen direkten antiviralen Wirkeffekt am Darmepithel zu simulieren, wurden Caco2-Zellen verwendet. Dies sind immortalisierte Darmepithelzellen, deren Zellkulturanwendung weithin als Modell für die intestinale Oberfläche gilt (Meunier et al., 1995). Es wurde bereits gezeigt, dass Caco2 für eine Infektion mit HCMV bei höheren MOIs empfänglich sind (Jarvis et al., 1999) Die vorliegenden Versuche zeigen analog zu den Aktivitätstestungen von HD5(1-9) auf HFF, ARPE-19, THP-1 und Makrophagen eine inhibierende Wirkung gegenüber einer HCMV-Infektion im vergleichbaren Konzentrationsbereich. Durch die Ausschüttung aus den Granula der Paneth-Zellen und anschließender Degradation zu weiteren antimikrobiell aktiven Fragmenten können am Darmepithel lokal hohe Konzentrationen von HD5 und seinen Fragmenten erreicht werden. Eine direkte antivirale Wirkung gegenüber HCMV im Darmlumen könnte als auftretendes Szenario *in vivo* betrachtet werden. Dies ist von Interesse, da eine Reaktivierung von HCMV im Darm unter

anderem bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben wurde (Garrido et al., 2013; Sager et al., 2015; Lv et al., 2017). Gleichzeitig wird die Bedeutung von HCMV für den Verlauf der Colitis ulcerosa kritisch diskutiert (Jentzer et al., 2020). Des Weiteren ist die CMV-Colitis eine typische Infektion, die bei starker Immunsuppression zum Beispiel nach einer Stammzelltransplantation beobachtet wird. Die Inhibierung der HCMV-Infektion mit HCMV durch HD5(1-9) auch auf Caco2-Zellen zeigt weiterhin, dass die Wirkung über verschiedene Zellkultursysteme unterschiedlichen Ursprungs hinaus geht und wahrscheinlich einen antiviralen Mechanismus vermittelt, der in allen Zelltypen konserviert ist. Die Experimente von Böffert et al. ergaben keine Hinweise auf eine direkte antivirale Aktivität gegenüber dem HCMV-Partikel.

4.7 HD5(1-9) ist inaktiv gegenüber SARS-CoV2

Die SARS-CoV2-Pandemie stellt neben der gesundheitlichen Bedrohung eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität weltweit dar. Als natürlich vorkommende antimikrobielle Effektormoleküle weisen Defensine eine breites antimikrobielles und antivirales Wirkspektrum auf. Aus diesem Grund wurde eine Testung von HD5(1-9) und HD5(3-9) auf antivirale Aktivität gegenüber SARS-CoV2 durchgeführt. Beide Stoffe zeigen in den getesteten Konzentrationen keine antivirale Aktivität. Dies ergänzt bereits beschriebene Wirkmuster der Defensine gegenüber SARS-CoV2. So weisen insbesondere die Defensine HNP1-3, HD5 und RC101 eine gute Aktivität gegenüber SARS-CoV2 auf. Für HNP4 und HD6 ist die Aktivität deutlich geringer, die β -Defensine sind inaktiv. Mechanistische Studien haben ebenfalls gezeigt, dass eine Blockade des viralen Entry den wahrscheinlichen Wirkmechanismus darstellt. Gleichzeitig wurde die Struktur von HD5 als relevant für die antivirale Aktivität ausgemacht. Pro-HD5, das Vorläufermolekül von HD5, wies keine antivirale Aktivität auf, ebenso wenig wie eine linearisierte und primär unstrukturierte Form von HD5 (Xu et al., 2021). Das Nonapeptid HD5(1-9) stellt ebenso eine solche linearisierte und unstrukturierte Form dar (Böffert et al., 2020). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass im Falle von SARS-CoV2 die Degradation von HD5 zu HD5(1-9) mit einem Verlust der

antiviralen Aktivität einhergeht. Es ist zu diskutieren, dass die Fragmentierung der Vollängenpeptide zu einer erhöhten Zahl an antiviral aktiven Substanzen führt, welche aber für sich genommen eine geringere Breite ihrer antiviralen Aktivität haben. Für HD5(1-9) kann gelten, dass es als Fragment des Vollängenpeptids HD5 eine bessere antivirale Aktivität gegen HCMV aufweist, aber gleichzeitig die Wirkung gegenüber SARS-CoV2 verliert.

4.8 HD5(1-9) könnte infektionssteigernd gegenüber HIV wirken

Eine Untersuchung der Wechselwirkung von HD5(1-9) mit HIV ist von besonderem Interesse, da in einem initialen Aktivitätsscreening der verschiedenen Defensinfragmente gegen HIV eine leichte Erhöhung der Infektionsraten auftrat (durchgeführte Experiment von Dr. Ramona Businger, nicht veröffentlicht). Außerdem ist die Wirkung des Vollängenpeptids HD5 und anderer Defensine gegenüber HIV bereits untersucht. Hierbei fand sich eine infektionssteigernde Wirkung der enterischen Defensine HD5 und HD6. Als Mechanismus wurde eine Konzentrierung der Virionen auf den Oberflächen der Zielzellen vorgeschlagen (Rapista et al., 2011). Für die myeloiden Defensine, insbesondere HNP4, dagegen ist eine antivirale Aktivität gegenüber HIV beschrieben (Wu et al., 2005). Insofern war von besonderem Interesse, ob und wie HD5(1-9) eine HIV-Infektion beeinflusst. Bei Behandlung mit 100µM von HD5(1-9) zeigt sich eine Erhöhung der Infektionsrate um den Faktor 1,3. Somit scheint HD5(1-9) ähnlich wie das Vollängenpeptid HD5 eine infektionssteigernde Wirkung zu haben. Zur verlässlichen Interpretation ist jedoch zwingend eine experimentelle und statistische Bestätigung erforderlich. Die Daten entstammen 5 Replikaten, dennoch zeigt sich eine große Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten. Die hohe Variabilität bei der Arbeit mit primären Zellen ist bekannt, sodass weitere Replikate zur verlässlichen Interpretation der Daten notwendig sind. Ebenfalls ist eine Titration der tatsächlichen Viruslast ratsam, um die vorliegenden Daten final zu verifizieren.

Eine Steigerung der Infektionsrate kann durch einen direkten proviralen Effekt oder auch über eine indirekte Stimulation der T-Zellen erfolgen. Stimulierte und

aktivierte T-Zellen sind für eine Infektion mit HIV leichter empfänglich und begünstigen die virale Replikation (Stevenson et al., 1990). HD5(1-9) zeigte hierbei kein erhöhtes Stimulationslevel für CD4+T-Zellen (siehe Abb. 21). Es kann analog zu HD5 von einem direkten Effekt von HD5(1-9) ausgegangen werden, welcher für die HIV-Infektion relevant ist. Eine Stimulation von Immunzellen durch HD5(1-9) hätte ein neues Feld der Untersuchungen eröffnet, da ein Defensinbruchstück dann nicht nur eine antimikrobielle Aktivität hätte, sondern auch selbst immunogen wirksam wäre.

Das mit dem Magen-Darm-Trakt assoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT) stellt einen Ort der Replikation und Persistenz für HIV dar (Veazey et al., 1998; Guadelupe et al., 2003). Die klinisch-therapeutische Bedeutung ist in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der antiretroviralen Therapie geraten (Thompson et al., 2017). Nicht außer Acht zu lassen ist daher die räumliche Nähe zum natürlichen Vorkommen von HD5(1-9). Eine relevante Verstärkung einer HIV-Infektion müsste im Hinblick auf jegliche Applikation von HD5(1-9) *in vivo* kritisch evaluiert werden. Diese ist nicht nur aus antiviralen Gründen beispielsweise als unterstützende Therapie gegen HCMV-Infektionen zu erwägen. Intensiv untersucht wird die mögliche Applikation von Defensinen beispielsweise im Hinblick von entzündlichen Darmerkrankungen (Koeninger et al., 2020).

5 Zusammenfassung

HCMV stellt als Erreger bei immunsupprimierten Patientinnen und Patienten sowie als häufigste konnatale Infektion weltweit ein relevantes gesundheitliches Problem dar. Es existiert keine zugelassene Impfung und gängige Therapeutika können schwere Nebenwirkungen verursachen oder durch Resistenzmutationen des Virus ihre Wirkung verlieren. Daher besteht eine Notwendigkeit für neue Therapieansätze und Wirkstoffe. Das Nonapeptid HD5(1-9) stellt ein *in vivo* vorkommendes Fragment des enterischen Defensins HD5 dar. Es wurde *in vitro* als Inhibitor einer HCMV-Infektion auf verschiedenen Zielzellen des Virus charakterisiert. Einschränkend für eine Weiterentwicklung erscheint dabei die hohe Konzentration von bis zu 100µM für eine fast vollständige Inhibition einer HCMV-Infektion. Ziel dieser Arbeit war es, das Wirkprofil verkürzter Derivate von HD5(1-9) zu charakterisieren sowie den antiviralen Mechanismus des Peptids näher zu beleuchten. Gleichzeitig sollte HD5(1-9) bezüglich seiner Wirkung auf weitere Viren mit globaler gesundheitlicher Bedeutung wie HIV und SARS-CoV2 getestet werden. Experimentell zeigte sich, dass sämtliche verkürzte Derivate von HD5(1-9) ihre Aktivität gegenüber HCMV nahezu vollständig verlieren. HD5(1-9) weist eine Stabilität bei längerer Inkubation auf und wirkt am ehesten als Entry-Inhibitor. Unter Verwendung von biotinylierten Peptiden kann in Lokalisationsexperimenten eine Assoziation zur Zelloberfläche angenommen werden, die nicht bei inaktiven Peptidderivaten auftritt. Eine Ko-Inkubation von HD5(1-9) mit Heparin, das ebenfalls aktiv gegenüber HCMV ist, zeigt einen deutlichen Wirkverlust, was auf eine Bindung von Heparin und HD5(1-9) hinweist. Zusammengenommen ist die Arbeitshypothese, dass HD5(1-9) seine antivirale Wirkung über eine Bindung mit zellulären Glucosaminoglykanen, insbesondere Heparansulfat, ausübt. Abschließend zeigte sich HD5(1-9) als inaktiv gegenüber SARS-CoV2. In der Testung gegen HIV dagegen zeigte sich ein leicht infektionsverstärkender Effekt, der jedoch nicht statistisch signifikant war. Eine gezielte Evaluation der postulierten Interaktion von HD5(1-9) und Heparansulfat kann das antivirale Potential von HD5(1-9) offenlegen und zielgerichtete Optimierungen der antiviralen Potenz möglich machen.

6 Literaturverzeichnis

- Anderholm KM, Bierle CJ and Schleiss MR (2016). "Cytomegalovirus Vaccines: Current Status and Future Prospects." *Drugs* 76(17): 1625-1645.
- Anders D, Kerry J and Pari G (2007). CMV DNA synthesis and late viral gene expression. In: *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. . New York, Cambridge University Press.
- Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, Gazit R, Gonen-Gross T, Hanna J, Nahari E, Porgador A, Honigman A, Plachter B, Mevorach D, Wolf DG and Mandelboim O (2005). "Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus." *Nat Immunol* 6(5): 515-523.
- Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME and Ouellette AJ (2000). "Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria." *Nat Immunol* 1(2): 113-118.
- Baldick Jr. CJ, Marchini A, Patterson CE and Shenk T (1997). "Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle." *J Virol* 71(6): 4400-4408.
- Bevins CL and Salzman NH (2011). "Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis." *Nature Reviews Microbiology* 9(5): 356-368.
- Biron KK, Stanat SC, Sorrell JB, Fyfe JA, Keller PM, Lambe CU and Nelson DJ (1985). "Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus." *Proc Natl Acad Sci USA* 82(8): 2473-2477.
- Böffert R, Businger R, Preiß H, Ehmann D, Truffault V, Simon C, Ruetalo N, Hamprecht K, Müller P, Wehkamp J and Schindler M (2020). "The human α -defensin-derived peptide HD5(1-9) inhibits cellular attachment and entry of human cytomegalovirus." *Antiviral Res* 177: 104779.
- Böffert R (2021). "Defensine als innovative antivirale Therapiemöglichkeit der Infektion mit humanen Zytomegaloviren." Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Brandt CR, Akkarawongsa R, Altmann S, Jose G, Kolb AW, Waring AJ and Lehrer RI (2007). "Evaluation of a θ -Defensin in a Murine Model of Herpes Simplex Virus Type 1 Keratitis." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48(11): 5118-5124.

- Britt W (2007). Virus entry into host, establishment of infection, spread in host, mechanisms of tissue damage. In: Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R and Yamanishi K. New York, Cambridge University Press.
- Britt WJ and Prichard MN (2018). "New therapies for human cytomegalovirus infections." *Antiviral Res* 159: 153-174.
- Brook M, Tomlinson GH, Miles K, Smith RWP, Rossi AG, Hiemstra PS, van 't Wout EFA, Dean JLE, Gray NK, Lu W and Gray M (2016). "Neutrophil-derived alpha defensins control inflammation by inhibiting macrophage mRNA translation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(16): 4350.
- Buxmann H, Hamprecht K, Meyer-Wittkopf M and Friese K (2017). "Primary Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection in Pregnancy." *Dtsch Arztebl Int* 114(4): 45-52.
- Cannon MJ, Schmid DS and Hyde TB (2010). "Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection." *Rev Med Virol* 20(4): 202-213.
- Chu H, Pazgier M, Jung G, Nuccio SP, Castillo PA, de Jong MF, Winter MG, Winter SE, Wehkamp J, Shen B, Salzman NH, Underwood MA, Tsois RM, Young GM, Lu W, Lehrer RI, Bäuml AJ and Bevins CL (2012). "Human α -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets." *Science* 337(6093): 477-481.
- Cole AM, Hong T, Boo LM, Nguyen T, Zhao C, Bristol G, Zack JA, Waring AJ, Yang OO and Lehrer RI (2002). "Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4): 1813-1818.
- Cole AM, Patton DL, Rohan LC, Cole AL, Cosgrove-Sweeney Y, Rogers NA, Ratner D, Sassi AB, Lackman-Smith C, Tarwater P, Ramratnam B, Ruchala P, Lehrer RI, Waring AJ and Gupta P (2010). "The Formulated Microbicide RC-101 Was Safe and Antivirally Active Following Intravaginal Application in Pigtailed Macaques." *PLOS ONE* 5(11): e15111.
- Compton T, Nowlin DM and Cooper NR (1993). "Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate." *Virology* 193(2): 834-841.
- Crough T and Khanna R (2009). "Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside." *Clin Microbiol Rev* 22(1): 76-98, Table of Contents.

- Daher KA, Selsted ME and Lehrer RI (1986). "Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins." *Journal of Virology* 60(3): 1068-1074.
- Dai X, Yu X, Gong H, Jiang X, Abenes G, Liu H, Shivakoti S, Britt WJ, Zhu H, Liu F and Zhou ZH(2013). "The Smallest Capsid Protein Mediates Binding of the Essential Tegument Protein pp150 to Stabilize DNA-Containing Capsids in Human Cytomegalovirus." *PLOS Pathogens* 9(8): e1003525.
- Davison AJ, Bhella D (2007). Comparative genome and virion structure. In: *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R and Yamanishi K. New York, Cambridge University Press.
- Demirkhanyan LH, Marin M, Padilla-Parra S, Zhan C, Miyauchi K, Jean-Baptiste M, Novitskiy G, Lu W and Melikyan GB (2012). "Multifaceted mechanisms of HIV-1 entry inhibition by human α -defensin." *J Biol Chem* 287(34): 28821-28838.
- Digel M, Sampaio K, Jahn G and Sinzger C (2006). "Evidence for direct transfer of cytoplasmic material from infected to uninfected cells during cell-associated spread of human cytomegalovirus." *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 37: 10-20.
- Dogra P, Martin EB, Williams A, Richardson RL, Foster JS, Hackenback N, Kennel SJ, Sparer TE and Wall JS (2015). "Novel heparan sulfate-binding peptides for blocking herpesvirus entry." *PLoS one*, 10(5), e0126239.
- Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, Dargan DJ, McGeoch DJ, Gatherer D, Emery VC, Griffiths PD, Sinzger C, McSharry BP, Wilkinson GWG and Davison AJ (2004). "Genetic content of wild-type human cytomegalovirus." *J Gen Virol* 85(Pt 5): 1301-1312.
- E X, Meraner P, Lu P, Perreira JM, Aker AM, McDougall WM, Zhuge R, Chan GC, Gerstein RM, Caposio P, Yurochko AD, Brass AL and Kowalik TF (2019). "OR14I1 is a receptor for the human cytomegalovirus pentameric complex and defines viral epithelial cell tropism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(14): 7043-7052.
- Ehmann D, Wendler J, Koeninger L, Larsen IS, Klag T, Berger J, Marette A, Schaller M, Stange EF, Malek NP, Jensen BAH and Wehkamp J (2019). "Paneth cell α -defensins HD-5 and HD-6 display differential degradation into active antimicrobial fragments." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(9): 3746.

- Farin HF, Karthaus WR, Kujala P, Rakhshandehroo M, Schwank G, Vries RGJ, Kalkhoven E, Nieuwenhuis EES and Clevers H (2014). "Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN- γ ." *Journal of Experimental Medicine* 211(7): 1393-1405.
- Feire AL, Koss H and Compton T (2004). "Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(43): 15470-15475.
- Feire AL, Roy RM, Manley K and Compton T (2010). "The glycoprotein B disintegrin-like domain binds beta 1 integrin to mediate cytomegalovirus entry." *J Virol* 84(19): 10026-10037.
- Fisher CE, Knudsen JL, Lease ED, Jerome KR, Rakita RM, Boeckh M and Limaye AP (2017). "Risk Factors and Outcomes of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infection in Solid Organ Transplant Recipients." *Clin Infect Dis* 65(1): 57-63.
- Frye M, Bargon J, Dauletbaev N, Weber A, Wagner TOF and Gropp R (2000). "Expression of human α -defensin 5 (HD5) mRNA in nasal and bronchial epithelial cells." *Journal of Clinical Pathology* 53(10): 770-773.
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF and Lehrer RI (1985). "Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils." *J Clin Invest* 76(4): 1427-1435.
- Ganz T and Lehrer RI (1994). "Defensins." *Curr Opin Immunol* 6(4): 584-589.
- Ganz T (2003). "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity." *Nature Reviews Immunology* 3(9): 710-720.
- Garrido E, Carrera E, Manzano R and Lopez-Sanroman A (2013). "Clinical significance of cytomegalovirus infection in patients with inflammatory bowel disease." *World journal of gastroenterology* 19(1): 17-25.
- Gerna G, Kabanova A and Lilleri D (2019). "Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors." *Vaccines (Basel)* 7(3).
- Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee SK, Wilk D, Drazba J, Yadav SP, Crabb JW, Ganz T and Bevins CL (2002). "Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5." *Nature Immunology* 3(6): 583-590.
- Gibson W (2008). "Structure and formation of the cytomegalovirus virion." *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 187-204.

- Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B and Greenberg PD (1996). "Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product." *Nature* 383(6602): 720-722.
- Goodrum F, Caviness K and Zagallo P (2012). "Human cytomegalovirus persistence." *Cellular microbiology* 14(5): 644-655.
- Gounder AP, Myers ND, Treuting PM, Bromme BA, Wilson SS, Wiens ME, Lu W, Ouellette AJ, Spindler KR, Parks WC and Smith JG (2016). "Defensins Potentiate a Neutralizing Antibody Response to Enteric Viral Infection." *PLOS Pathogens* 12(3): e1005474.
- Gregg K, Hakki M and Kaul DR (2014). "UL 54 foscarnet mutation in an hematopoietic stem cell transplant recipient with cytomegalovirus disease." *Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society* 16.
- Griffiths P, Baraniak I and Reeves M (2015). "The pathogenesis of human cytomegalovirus." *J Pathol* 235(2): 288-297.
- Grigat J, Soruri A, Forssmann U, Riggert J and Zwirner J (2007). "Chemoattraction of Macrophages, T Lymphocytes, and Mast Cells Is Evolutionarily Conserved within the Human α -Defensin Family." *The Journal of Immunology* 179(6): 3958.
- Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A and Dandekar S (2003). "Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy." *Journal of virology* 77(21): 11708-11717.
- Harder J, Bartels J, Christophers E and Schröder JM (1997). "A peptide antibiotic from human skin." *Nature* 387(6636): 861-861.
- Hazrati E, Galen B, Lu W, Wang W, Ouyang Y, Keller MJ, Lehrer RI and Herold BC (2006). "Human α - and β -Defensins Block Multiple Steps in Herpes Simplex Virus Infection." *The Journal of Immunology* 177(12): 8658.
- Hetzenecker S, Helenius A and Krzyzaniak MA (2016). "HCMV Induces Macropinocytosis for Host Cell Entry in Fibroblasts." *Traffic* 17(4): 351-368.
- Hill CP, Yee J, Selsted ME and Eisenberg D (1991). "Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization." *Science* 251(5000): 1481-1485.

- Holly MK, Diaz K and Smith JG (2017). "Defensins in Viral Infection and Pathogenesis." *Annual Review of Virology* 4(1): 369-391.
- Ibanez CE, Schrier R, Ghazal P, Wiley C and Nelson JA (1991). "Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages." *J Virol* 65(12): 6581-6588.
- Irmiere A and Gibson W (1983). "Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus." *Virology* 130(1): 118-133.
- Jackson JW and Sparer T (2018). "There Is Always Another Way! Cytomegalovirus' Multifaceted Dissemination Schemes." *Viruses*, 10(7), 383.
- Jackson JW, Hancock TJ, Dogra P, Patel R, Arav-Boger R, Williams AD, Kennel SJ, Wall JS and Sparer TE (2019). "Anticytomegalovirus Peptides Point to New Insights for CMV Entry Mechanisms and the Limitations of *In Vitro* Screenings." *mSphere* 4(1), e00586-18.
- Jarvis MA, Wang CE, Meyers HL, Smith PP, Corless CL, Henderson GJ, Vieira J, Britt WJ and Nelson JA (1999). "Human cytomegalovirus infection of caco-2 cells occurs at the basolateral membrane and is differentiation state dependent." *Journal of virology* 73(6): 4552-4560.
- Jean Beltran PM and Cristea IM (2014). "The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics." *Expert review of proteomics* 11(6): 697-711.
- Jentzer A, Veyrard P, Roblin X, Saint-Sardos P, Rochereau N, Paul S, Bourlet T, Pozzetto B and Pillet S (2020). "Cytomegalovirus and Inflammatory Bowel Diseases (IBD) with a Special Focus on the Link with Ulcerative Colitis (UC)." *Microorganisms* 8(7): 1078.
- Jin G and Weinberg A (2019). "Human antimicrobial peptides and cancer." *Semin Cell Dev Biol* 88: 156-162.
- Kabanova A, Marcandalli J, Zhou T, Bianchi S, Baxa U, Tsybovsky Y, Lilleri D, Silacci-Fregni C, Foglierini M, Fernandez-Rodriguez BM, Druz A, Zhang B, Geiger R, Pagani M, Sallusto F, Kwong PD, Corti D, Lanzavecchia A and Perez L (2016). "Platelet-derived growth factor- α receptor is the cellular receptor for human cytomegalovirus gHgLgO trimer." *Nat Microbiol* 1(8): 16082.
- Kagan BL, Selsted ME, Ganz T and Lehrer RI (1990). "Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(1): 210-214.

- Kagan BL, Ganz T and Lehrer RI (1994). "Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides." *Toxicology* 87(1-3): 131-149.
- Kagan KO, Sonek J and Hamprecht K (2018). "Antenatal treatment options for primary cytomegalovirus infections." *Curr Opin Obstet Gynecol* 30(6): 355-360.
- Kalejta RF (2008). "Tegument proteins of human cytomegalovirus." *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 72(2): 249-265.
- Kari B and Gehrz R (1992). "A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope." *J Virol* 66(3): 1761-1764.
- Kenneson A and Cannon M (2007). "Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital Cytomegalovirus (CMV) infection." *Reviews in medical virology* 17: 253-276.
- Koeninger L, Armbruster NS, Brinch KS, Kjaerulf S, Andersen B, Langnau C, Autenrieth SE, Schneidawind D, Stange EF, Malek NP, Nordkild P, Jensen BAH and Wehkamp J (2020). "Human β -Defensin 2 Mediated Immune Modulation as Treatment for Experimental Colitis." *Front Immunol* 11: 93.
- Kotton CN, D. Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L and Humar A (2018). "The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation." *Transplantation* 102(6): 900-931.
- Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T and Selsted ME (1989). "Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity." *J Clin Invest* 84(2): 553-561.
- Liu F and Hong Zhou Z (2007). Comparative virion structures of human herpesviruses. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R and Yamanishi K. New York, Cambridge University Press.
- Liu L, Zhao C, Heng HH and Ganz T (1997). "The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry." *Genomics* 43(3): 316-320.
- Luganini A, Giuliani A, Pirri G, Pizzuto L, Landolfo S and Gribaudo G (2010). "Peptide-derivatized dendrimers inhibit human cytomegalovirus infection by blocking virus binding to cell surface heparan sulfate." *Antiviral research* 85(3), 532–540.

- Lundy FT, Nelson J, Lockhart D, Greer B, Harriott P and Marley JJ (2008). "Antimicrobial activity of truncated α -defensin (human neutrophil peptide (HNP)-1) analogues without disulphide bridges." *Molecular Immunology* 45(1): 190-193.
- Lv YL, Han FF, Jia YJ, Wan ZR, Gong LL, Liu H and Liu LH (2017). "Is cytomegalovirus infection related to inflammatory bowel disease, especially steroid-resistant inflammatory bowel disease? A meta-analysis." *Infect Drug Resist* 10: 511-519.
- Martinez-Martin N, Marcandalli J, Huang CS, Arthur CP, Perotti M, Foglierini M, Ho H, Dosey AM, Shriver S, Payandeh J, Leitner A, Lanzavecchia A, Perez L and Ciferri C (2018). "An Unbiased Screen for Human Cytomegalovirus Identifies Neuropilin-2 as a Central Viral Receptor." *Cell* 174(5): 1158-1171.e1119.
- Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, Haider S, Ullmann AJ, Katayama Y, Brown J, Mullane KM, Boeckh M, Blumberg EA, Einsele H, Snyderman DR, Kanda Y, DiNubile MJ, Teal VL, Wan H, Murata Y, Kartsonis NA, Leavitt RY and Badshah C (2017). "Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation." *N Engl J Med* 377(25): 2433-2444.
- Meunier V, Bourrié M, Berger Y and Fabre G (1995). "The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications." *Cell Biol Toxicol* 11(3-4): 187-194.
- Murphy JC, Fischle W, Verdin E and Sinclair JH (2002). "Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation." *The EMBO journal* 21(5): 1112-1120.
- Nagaoka I, Suzuki K, Niyonsaba F, Tamura H and Hirata M (2012). "Modulation of Neutrophil Apoptosis by Antimicrobial Peptides." *ISRN Microbiology* 2012: 345791.
- Natori Y, Alghamdi A, Tazari M, Miller V, Husain S, Komatsu T, Griffiths P, Ljungman P, Orchanian-Cheff A, Kumar D and Humar A (2018). "Use of Viral Load as a Surrogate Marker in Clinical Studies of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation: A Systematic Review and Meta-analysis." *Clin Infect Dis* 66(4): 617-631.
- Nguyen TX, Cole AM and Lehrer RI (2003). "Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth." *Peptides* 24(11): 1647-1654.
- Ogawa-Goto K, Tanaka K, Gibson W, Moriishi E, Miura Y, Kurata T, Irie S and Sata T (2003). "Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid." *J Virol* 77(15): 8541-8547.

- Paneth J (1887). "Ueber die secernirenden Zellen des Dünndarm-Epithels." Archiv für mikroskopische Anatomie 31(1): 113.
- Panyutichj AV, Panyutich EA, Krapivin VA, Baturevich EA and Ganz T (1993). "Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis." J Lab Clin Med 122(2): 202-207.
- Pitt EA, Dogra P, Patel RS, Williams A, Wall JS and Sparer TE (2016). "The D-form of a novel heparan binding peptide decreases cytomegalovirus infection in vivo and in vitro." Antiviral research, 135, 15–23.
- Porter EM, Liu L, Oren A, Anton PA and Ganz T (1997). "Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules." Infect Immun 65(6): 2389-2395.
- Proud D, Sanders SP and Wiehler S (2004). "Human Rhinovirus Infection Induces Airway Epithelial Cell Production of Human β -Defensin 2 Both In Vitro and In Vivo." The Journal of Immunology 172(7): 4637.
- Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP and Mok SC (1998). "Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract." Am J Pathol 152(5): 1247-1258.
- Rapista A, Ding J, Benito B, Lo YT, Neiditch MB, Lu W and Chang TL (2011). "Human defensins 5 and 6 enhance HIV-1 infectivity through promoting HIV attachment." Retrovirology 8(1): 45.
- Rogers R, Saharia K, Chandorkar A, Weiss ZF, Vieira K, Koo S and Farmakiotis D (2020). "Clinical experience with a novel assay measuring cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity by flow cytometry and intracellular cytokine staining to predict clinically significant CMV events." BMC infectious diseases 20(1): 58-58.
- Roizman B, Carmichael LE, Deinhardt F, de-The G, Nahmias AJ, Plowright W, Rapp F, Sheldrick P, Takahashi M and Wolf K (1981). "Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses." Intervirology 16(4): 201-217.
- Rosa Borges A and Schengrund CL (2005). „Dendrimers and antivirals: a review." Current drug targets. Infectious disorders, 5(3), 247–254.
- Rücker E, Grivel JC, Münch J, Kirchhoff F and Margolis L (2004). „Vpr and Vpu are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication and CD4+ T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo." Journal of Virology 78(22): 12689-12693

- Sager K, Alam S, Bond A, Chinnappan L and Probert CS (2015). "Review article: cytomegalovirus and inflammatory bowel disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 41(8): 725-733.
- Sanjana NE, Shalem O and Zhang F (2014). "Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening." *Nat Methods*. 11(8):783-784
- Schauflinger M, Villinger C, Mertens T, Walther P and von Einem J (2013). "Analysis of human cytomegalovirus secondary envelopment by advanced electron microscopy." *Cell Microbiol* 15(2): 305-314.
- Selsted ME and Harwig SS (1989). "Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide." *J Biol Chem* 264(7): 4003-4007.
- Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW and Lehrer RI (1985). "Primary structures of three human neutrophil defensins." *J Clin Invest* 76(4): 1436-1439.
- Selsted ME, Szklarek D, Ganz T and Lehrer RI (1985). "Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*." *Infection and immunity* 49(1): 202-206.
- Shafee TM, Lay FT, Hulett MD and Anderson MA (2016). "The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies." *Mol Biol Evol* 33(9): 2345-2356.
- Sinzger C, Schmidt K, Knapp J, Kahl M, Beck R, Waldman J, Hebart H, Einsele H and Jahn G (1999). "Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome." *J Gen Virol* 80 (Pt 11): 2867-2877.
- Sinzger C, Digel M and Jahn G (2008). "Cytomegalovirus cell tropism." *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 63-83.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G and Klagsbrun M (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." *Cell* 92(6): 735-745.
- Stegmann C, Hochdorfer D, Lieber D, Subramanian N, Stöhr D, Laib Sampaio K and Sinzger C (2017). "A derivative of platelet-derived growth factor receptor alpha binds to the trimer of human cytomegalovirus and inhibits entry into fibroblasts and endothelial cells." *PLOS Pathogens* 13(4): e1006273.

- Steinstraesser L, Koehler T, Jacobsen F, Daigeler A, Goertz O, Langer S, Kesting M, Steinau H, Eriksson E and Hirsch T (2008). "Host defense peptides in wound healing." *Mol Med* 14(7-8): 528-537.
- Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP and Lamonica CA (1990). "HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration." *Embo j* 9(5): 1551-1560.
- Stinski MF and Meier JL (2007). Immediate-early CMV gene regulation and function. In: *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R and Yamanishi K. New York, Cambridge University Press.
- Stinski MF (1978). "Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides." *Journal of virology* 26(3): 686-701.
- Tang YQ and Selsted ME (1993). "Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils." *J Biol Chem* 268(9): 6649-6653.
- Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ and Selsted ME (1999). "A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins." *Science* 286(5439): 498-502.
- Territo MC, Ganz T, Selsted ME and Lehrer RI (1989). "Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils." *J Clin Invest* 84(6): 2017-2020.
- Thompson CG, Gay CL and Kashuba ADM (2017). "HIV Persistence in Gut-Associated Lymphoid Tissues: Pharmacological Challenges and Opportunities." *AIDS research and human retroviruses* 33(6): 513-523.
- Travi G and Pergam SA (2014). "Cytomegalovirus pneumonia in hematopoietic stem cell recipients." *Journal of intensive care medicine* 29(4): 200-212.
- Valere K, Lu W and Chang TL (2017). "Key Determinants of Human α -Defensin 5 and 6 for Enhancement of HIV Infectivity." *Viruses* 9(9).
- Valore EV and Ganz T (1992). "Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells." *Blood* 79(6): 1538-1544.
- Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray Jr. PB and Ganz T (1998). "Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues." *J Clin Invest* 101(8): 1633-1642.

- Vanarsdall AL, Chase MC and Johnson DC (2011). "Human cytomegalovirus glycoprotein gO complexes with gH/gL, promoting interference with viral entry into human fibroblasts but not entry into epithelial cells." *Journal of virology* 85(22): 11638-11645.
- Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, Rosenzweig M, Johnson RP, Desrosiers RC and Lackner AA (1998). "Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection." *Science* 280(5362): 427-431.
- von Laer D, Meyer-Koenig U, Serr A, Finke J, Kanz L, Fauser AA, Neumann-Haefelin D, Brugger W and Hufert FT (1995). "Detection of cytomegalovirus DNA in CD34+ cells from blood and bone marrow." *Blood* 86(11): 4086-4090.
- Wang D and Shenk T (2005). "Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(50): 18153-18158.
- White EA and Spector DH (2007). Early CMV gene expression and function. In: *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R and Yamanishi K. Cambridge, Cambridge University Press.
- Wiens ME, Smith JG and Imperiale MJ (2017). " α -Defensin HD5 Inhibits Human Papillomavirus 16 Infection via Capsid Stabilization and Redirection to the Lysosome." *mBio* 8(1): e02304-02316.
- Wilkinson GWG, Davison AJ, Tomasec P, Fielding CA, Aicheler R, Murrell I, Seirafian S, Wang ECY, Weekes M, Lehner PJ, Wilkie GS and Stanton RJ (2015). "Human cytomegalovirus: taking the strain." *Medical microbiology and immunology* 204(3): 273-284.
- Wille PT, Wisner TW, Ryckman B and Johnson DC (2013). "Human Cytomegalovirus (HCMV) Glycoprotein gB Promotes Virus Entry in trans acting as the Viral Fusion Protein Rather than as a Receptor-Binding Protein." *mBio* 4(3): e00332-00313.
- Wood MP, Cole AL, Ruchala P, Waring AJ, Rohan LC, Marx P, Tarwater PM, Gupta P and Cole AM (2013). "A Compensatory Mutation Provides Resistance to Disparate HIV Fusion Inhibitor Peptides and Enhances Membrane Fusion." *PLOS ONE* 8(2): e55478.
- Wu Y, Prager A, Boos S, Resch M, Brizic I, Mach M, Wildner S, Scrivano L and Adler B (2017). "Human cytomegalovirus glycoprotein complex gH/gL/gO uses PDGFR- α as a key for entry." *PLOS Pathogens* 13(4): e1006281.

- Wu Z, Cocchi F, Gentles D, Ericksen B, Lubkowski J, DeVico A, Lehrer RI and Lu W (2005). "Human neutrophil α -defensin 4 inhibits HIV-1 infection in vitro." *FEBS Letters* 579(1): 162-166.
- Xie X, Muruato A, Lokugamage KG, Narayanan K, Zhang X, Zou J, Liu J, Schindewolf C, Bopp NE, Aguilar PV, Plante KS, Weaver SC, Makino S, LeDuc JW, Menachery VD and Shi PY (2020). "An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2." *Cell Host Microbe* 27(5): 841-848.e843.
- Xu C, Wang A, Marin M, Honnen W, Ramasamy S, Porter E, Subbian S, Pinter A, Melikyan GB, Lu W and Chang TL (2021). "Human Defensins Inhibit SARS-CoV-2 Infection by Blocking Viral Entry." *Viruses* 13(7): 1246.
- Xu D and Lu W (2020). "Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity." *Frontiers in immunology* 11: 764-764.
- Yamane Y, Furukawa T and Plotkin SA (1983). "Supernatant virus release as a differentiating marker between low passage and vaccine strains of human cytomegalovirus." *Vaccine* 1(1): 23-25.
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MH, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM and Oppenheim JJ (1999). "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6." *Science* 286(5439): 525-528.
- Yang D, Chen Q, Chertov O and Oppenheim JJ (2000). "Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells." *J Leukoc Biol* 68(1): 9-14.
- Yu X, Jih J, Jiang J and Zhou ZH (2017). "Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150." *Science* 356(6345): eaam6892.
- Zhao C, Wang I and Lehrer RI (1996). "Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells." *FEBS Lett* 396(2-3): 319-322.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Eberhard Karls Universität Tübingen im Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten in der Forschungssektion Molekulare Virologie unter Betreuung von Prof. Dr. Michael Schindler durchgeführt.

Die Konzeption erfolgte durch Prof. Dr. Michael Schindler in Zusammenarbeit mit Dr. Ramona Businger.

Sämtliche Versuche mit Ausnahme der Versuche zur Identifizierung des molekularen Targets von HD5(1-9) (siehe 3.6.2) wurden nach Einarbeitung durch Dr. Ramona Businger, Maximilian Feige, Maximilian Bunz und Carlos Vanegas von mir eigenständig durchgeführt. Der Versuch zur Identifizierung des molekularen Targets von HD5(1-9) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Karsten Boldt und Karin Junger von der Core Facility für Medizinische Bioanalytik der Universität Tübingen durchgeführt. Hierbei wurden sämtliche Schritte ab der Lyse der Zielzellen von Frau Karin Junger durchgeführt. Die statistische Auswertung der entsprechenden Versuche sowie die Erstellung von Abbildung 12 wurden von Dr. Karsten Boldt durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 01.07.2022

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und die dafür gesorgt haben, dass ich eine intensive und lehrreiche, aber gleichzeitig auch sehr erfüllende Zeit während meiner Promotion hatte.

An erster Stelle gilt der Dank Prof. Dr. Michael Schindler. Dank seiner exzellenten Betreuung habe ich mich jederzeit gut aufgehoben und wertgeschätzt gefühlt. Ich danke ihm ganz besonders für die zahlreichen Diskussionen und Überlegungen, die das Projekt immer weiterentwickelt haben. Ebenfalls hervorheben möchte ich die vorbildliche Erreichbarkeit, denn auf Fragen oder Vorschläge bekam ich innerhalb von kürzester Zeit eine Rückmeldung.

Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe der Forschungssektion Molekulare Virologie, die mich von Anfang an offen und freundlich aufgenommen hat und ein Umfeld gebildet hat, dass es mir leichtfiel, morgens ins Labor zu fahren. Es war eine tolle Zeit mit euch! Georgios Vavouras Syrigos als meinem direkten Arbeitspartner danke ich für zahllose Diskussionen und Ratschläge und ganz besonders für seine Freundschaft, die mich Tag für Tag mit Lächeln erfüllt hat. Maximilian Bunnz danke ich für seine zahlreichen Ratschläge und Ideen und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Dr. Ramona Businger und Maximilian Feige danke ich für meine Einarbeitung und Begleitung in den ersten Wochen.

Dr. Karsten Boldt und Katrin Junger von der Core Facility für Medizinische Bioanalytik danke ich für ihre Beratung und die unkomplizierte Zusammenarbeit sowie die Durchführung der Experimente.

Dem interdisziplinären Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät und Frau Dr. Tanja Rieß danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit sowie die stete Begleitung und den Austausch unter den Promovierenden.

Abschließend möchte ich meinem Freundeskreis und meiner Familie für ihre vorbildliche Unterstützung während meiner Promotionszeit danken.