

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl

Aktivität des neuen antiviralen Multiplex-Wirkstoffs

AZT-Lipid-PFA

im Mausmodell

der intranasalen Cytomegalovirusinfektion

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Sarah Julia Schott

aus Tübingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Unertl

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. K. Eltzhig

MEINER FAMILY

INHALTSVERZEICHNIS

	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Humane Cytomegalovirus	1
1.2	Diagnose der HCMV-Infektion	3
1.3	Anticytomegalovirale Chemotherapie	5
1.4	Multiplex-Wirkstoff AZT-Lipid-PFA	8
1.5	Untersuchung der Aktivität anticytomegaloviraler Wirkstoffe in Mausmodellen	9
1.6	Mausmodell der intranasalen MCMV-Infektion mit subletaler Dosis	11
1.7	Zielsetzung der Arbeit	14
2	MATERIAL UND METHODIK	15
2.1	Geräte	15
2.2.1	Pufferlösungen	17
2.2.2	„Mastermix“ für die cDNA-Synthese	17
2.3	Primer für die Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
2.4	Narkoselösung	18
2.5	Mausmodell	19
2.5.1	Infektion mit MCMV und Gewichtsbestimmung der Mäuse	19
2.5.2	Antivirale Medikation	20
2.6	Entnahme von Körperflüssigkeiten	20
2.7	MCMV-Nachweis im Lungengewebe	22
2.7.1	Homogenisieren des Lungengewebes	22
2.7.2	RNA-Isolierung	23
2.7.2.1	Spektralphotometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA	24
2.7.2.2	DNA Verdau	24

2.7.3	cDNA Synthese durch Reverse Transkription der mRNA	25
2.7.4	Polymerase Chain Reaction (PCR) der cDNA	25
2.7.5	Trennung der amplifizierten Produkte im Agarosegel durch Gelelektrophorese	26
3	ERGEBNISSE	27
3.1	Infektion und antivirale Medikation der Mäuse	27
3.1.1	Intranasale MCMV-Infektion und antivirale Medikation mit dem Multiplex-Wirkstoff AZT-Lipid-PFA (N₃)	27
3.1.1.1	Therapieplan und Medikation	28
3.2	Nachweis der MCMV-Infektion und Aktivität von N₃	30
3.2.1	Amplifikation der Transkriptionsprodukte durch PCR	30
3.2.1.1	Amplifikation des β-Aktin Genprodukts der Maus	34
3.2.1.2	Amplifikation der IE 1, IE 3 und gB Genprodukte des MCMV	34
3.2.2	Identifizierung der Transkriptionsprodukte durch Elektrophorese im Agarosegel	35
3.2.3	Konzentrationsermittlung der Transkriptionsprodukte	52
3.3	Kontrolle des Allgemeinzustandes der Mäuse durch Gewichtsbestimmung und Histologie	56
4	DISKUSSION	58
5	ZUSAMMENFASSUNG	67
6	ANHANG	69
7	LITERATURVERZEICHNIS	82
8	DANKSAGUNG	90
9	LEBENS LAUF	91

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACV	Acyclovir
AK	Antikörper
AZT-Lipid- PFA	3'-Azido-2',3'-didesoxythymidylyl-(5'-2)-1-O-octadecyl-rac-glycerol-3-(hydroxycarbonyl)-bisphosphonat x3 Na
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
CDV	Cidofovir
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fc	Fragment cristalline
g	Gravity
gB	Glycoprotein Gen
GB	Transkriptionsprodukt des gB
GCV	Ganciclovir
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HCMV	Humaner Cytomegalovirus
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ie 1	immediate early gen 1
IE 1	Transkriptionsprodukt des ie 1
ie 3	Immediate early gen 3
IE 3	Transkriptionsprodukt des ie 3
IFN gamma	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
KMT	Knochenmarkstransplantation
MCMV	Muriner Cytomegalovirus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N ₃	AZT-Lipid- PFA

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NFW	nukleasefreies Wasser
Oligo (dT) ₂₀	Oligothymidinsäure aus 20 Monomeren
p.i.	post infectionem
PBS	Phosphat buffered saline solution without - CaCl ₂ , - MgCl ₂
PCR	Polymerase chain reaction
PFU	Plaque forming units
RNA	Ribonukleinsäure
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	subcutan
SCID	Severe combined immunodeficiency
TAE	Tris-Acetic-EDTA
TE	Tris/ EDTA
T _m	Mittlere Schmelztemperatur
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
UV	Ultraviolett
ZMF	Zentrum für Medizinische Forschung

1 EINLEITUNG

1.1 DAS HUMANE CYTOMEGALOVIRUS

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein DNA- β -Herpesvirus (Familie: Herpesviridae, Subfamilie: β -Herpesvirinae, Gattung: Cytomegalovirus), mit dem 50 - 100 % der Weltbevölkerung infiziert sind [4, 27, 70]. Basierend auf epidemiologischen Daten ist die horizontale Transmission von HCMV, sei es durch Tröpfchen- und Schmierinfektion, perinatal durch Muttermilch, via sexueller oder kongenitaler Übertragung [6], der wesentliche Infektionsweg einer Primärinfektion. Das Schleimhautepithel stellt dabei die Haupteintrittspforte für die Erstinfektion dar [30].

Wie auch bei anderen β -Herpesviren verläuft eine Primärinfektion mit HCMV in immunkompetenten Menschen meist inapparent und ist lediglich mit milden Symptomen begleitet [76]. Bei Neugeborenen kann es nach intrauteriner oder konnataler HCMV-Infektion zu neurologischen Entwicklungsstörungen, Hörverlust [20, 55] und einer gravierenden HCMV-Manifestation in Form eines Cytomegalie-Syndroms kommen [31]. Generell bleibt das Virus nach der Erstinfektion durch zahlreiche Mechanismen für die Immunzellen des Wirts unerkennbar [41, 51, 72] und kann dadurch latent, im virulenten Zustand in seinem Wirt [5, 19, 76] überdauern. Von Viruslatenz spricht man, wenn das komplette virale Genom nach Ablauf der Primärinfektion in den Wirtszellen verweilt, ohne infektiöse Virione zu produzieren [58]. Als Folge eines adäquaten Stimulus können ruhende, virale Gene jedoch reaktiviert werden und infektiöse Replikationsprodukte produzieren. Eine Reaktivierung des HCMV kann durch Stress bedingt sein und wird im Klinikalltag sehr oft bei Intensivpatienten [28] sowie weniger häufig nach Herzinfarkt beobachtet [49].

Die detaillierten molekularen Mechanismen der Latenz und Reaktivierung im Körper sind jedoch bis dato weitgehend ungeklärt [70]. Allerdings scheint die Beeinflussung des Immunsystems und die daraus resultierende Differenzierung der myeloiden Zellreihe für die virale Replikation und Reaktivierung essentiell zu sein [32]. Dabei greifen einige Produkte des HCMV Genoms in zentrale

Funktionen der initialen und adaptiven Immunantwort ein [16, 57]. Demgemäß stören beispielsweise einige HCMV-kodierende Proteine unmittelbar die Antigenpräsentation, was dazu führt, dass HCMV-infizierte Zellen nicht von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und eliminiert werden können [44]. Weiter umgeht HCMV die adaptive Immunantwort, indem gezielt ein Fc- γ Rezeptor exprimiert wird, der an die Fc-Region des IgG bindet. Dadurch wird die Oberfläche der virusinfizierten Zelle mit IgG-Antikörpern bestückt, wodurch Antigenstrukturen der infizierten Zelle für die körpereigene Abwehr undetektierbar werden. Die Zelle ist somit geschützt vor einer antikörperinduzierten Zellzerstörung [41, 51, 70]. Zudem beeinflusst HCMV die Produktion und Funktion von inflammatorischen Zytokinen, indem einerseits die Produktion durch HCMV getriggert wird, andererseits das HCMV Genom für homologe Chemokinrezeptoren codiert, die Chemokine binden und internalisieren wie Sönderberg-Naucler in einem ausführlichen Übersichtsartikel zeigt [70]. Für eine Reaktivierung aus der myeloiden Zellreihe wird vor allem der Einfluss der von aktivierten T-Zellen produzierten Zytokine wie TNF-alpha und IFN- γ verantwortlich gemacht, die sowohl auf die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen als auch auf die direkte Aktivierung des HCMV IE 1/2 Promotors Einfluss nehmen [15, 73, 81]. Als Ursache für die Reaktivierung in Fibroblasten werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert bei denen NF-kappaB, TNF-alpha, CREP, Stat-1 und AP-1 entscheidende Funktionen zugesprochen werden, die die Virusreplikation steigern oder aktivieren können [15, 27, 39, 66, 70]. Vorgeschlagene Mechanismen werden derzeit intensiv erforscht [66, 75]. Leider ließen sich die zahlreichen Ergebnisse, die in der umfangreichen Grundlagenforschung der letzten Jahre erzielt werden konnten, noch nicht zur Optimierung der anti-CMV-Therapie nutzen.

Durch die Beeinflussung wesentlicher zellulärer Prozesse wie Zellzyklus, Apoptose [36], Zellwanderung, Tumordinvasion und Angiogenese kann das HCMV zur Krankheitsentstehung beitragen. So wurde beobachtet, dass HCMV insbesondere bei entzündlicher Genese wie beispielsweise Gefäß- und

Autoimmunerkrankungen [23, 45] sowie seit jüngster Erkenntnis auch bei gewissen Formen von Krebserkrankungen [8, 26, 62] beteiligt sein kann.

Bei immunsupprimierten Patienten ist HCMV seit Jahren als ein maßgeblicher Krankheitserreger bekannt. Bis zur Entwicklung der antiviralen Therapie galt die HCMV Infektion als eine lebensbedrohliche Komplikation insbesondere bei Transplantierten [65]. Eine Primärinfektion kann schwere HCMV-bedingte Erkrankungen bei Transplantierten hervorrufen, die bei HCMV-negativen Empfängern beobachtet werden, denen ein HCMV-positives Spenderorgan transplantiert wird. Vor allem aber wird bei Transplantempfängern die endogene Reaktivierung oder exogene (Super-) Infektion für ein HCMV Krankheitsbild verantwortlich gemacht. So kann HCMV im latenten Zustand durch ein Spenderorgan oder Blutprodukte mit übertragen und bei einer anschließenden Reaktivierung beispielsweise zu einer HCMV induzierten Pneumonie führen, die unbehandelt in 80 % der Fälle letal verläuft [14]. Heute weiß man, dass Organe sowie Knochenmark und Blut ein Reservoir des latenten HCMV darstellen [18].

Bei AIDS-Patienten trat vor der Einführung der highly active antiretroviral therapy (HAART) in 90 % der Patienten im Spätstadium eine HCMV Retinitis auf. Unter dem flächendeckenden Einsatz der HAART ist das Ausmaß des HCMV-Syndroms signifikant rückläufig [7]. Eine wiederkehrende HCMV Retinitis wird bei Patienten beobachtet, bei denen die HAART eingestellt werden muss [74]. Zudem haben diese Patienten häufig (7 - 10 %) ein HCMV verursachtes Krankheitsbild, das im Gastrointestinaltrakt durch Colitis, Oesophagitis und Wasting Syndrom sowie in neurologischen Erkrankungen in Erscheinung tritt.

1.2 DIAGNOSE DER HCMV-INFEKTION

Nach Definition von Fleckenstein [18] wird eine CMV verursachte Erkrankung diagnostiziert, wenn der Patient das entsprechende klinische Syndrom zeigt und der Nachweis des Virus möglichst im entsprechende infizierten Körperteil erfolgt. Das CMV kann über direkte und indirekte Nachweismethoden detektiert werden. Der direkte Nachweis ist über Virusanzucht, den Antigennachweis

pp65 in Leukozyten sowie den Nachweis des Virusgenoms mittels PCR möglich. Antikörper-Screeningverfahren von anti-CMV-IgM bei aktiver und anti-CMV-IgG bei persistierender Infektion sind indirekte Virusnachweise. Sie liefern orientierende Daten über den Status einer Infektion und werden meist für epidemiologische Untersuchungen eingesetzt. Beispielsweise treten in der Regel nach einer Woche hohe anti-CMV-IgM Spiegel bei einer Primärinfektion auf.

Zur Diagnose der CMV-Infektion ist die Virusbestimmung mit Hilfe der Zellkultur noch immer *lege artis*. Die Sensitivität der Methode und die daraus resultierende Vorhersage einer CMV-bedingten-Krankheit ist relativ niedrig und limitiert den Einsatz für die Identifizierung von Hochrisikopatienten [61, 82]. Zudem ist die Dauer dieser Methode von Nachteil, da verlässliche Ergebnisse teilweise erst nach einigen Wochen erzielt werden können. Ein weiterer limitierender Faktor ist die Notwendigkeit von frischen Proben.

Eine nachweisbare pp65 Antigenämie in Leukozyten ist eng korreliert mit dem Ausmaß des klinischen Erscheinungsbilds einer Cytomegalie-Infektion [40, 56]. Allerdings liegt die prognostische Aussagekraft dieser Methode ähnlich niedrig wie die der Virusbestimmung aus der Zellkultur. Auch hier wird Blut benötigt, das nicht älter als 4 Stunden sein darf. Da aber eine semiquantitative Aussage über die HCMV-Last möglich ist, kann der Antigennachweis zur Therapieüberwachung eingesetzt werden.

Neben den Quantifizierungsmethoden mittels Virusisolierung und Antigen-nachweisen werden zunehmend molekularbiologische Nachweistechiken praktiziert, die auf einem quantitativen Nachweis von Nukleinsäuren aus Patientenproben basieren [69].

Der Nachweis mittels PCR ist sowohl äußerst sensitiv, als auch prädiktiv aussagekräftig [21, 25, 35, 71]. Ein prädiktiver Nachweis mittels molekulargenetischer Methoden lässt Aussagen über eine Virusreplikation jenseits der klinisch sichtbaren Symptome zu, so dass präventiv eine Therapie eingeleitet werden kann. Zudem ergeben die quantitativen PCR-

Untersuchungen, dass hohe Absolutwerte der Viruslast sowie eine zeitlich ansteigende Viruslast mit äußerst gravierenden Krankheitsprognosen einhergehen. Es wurde gezeigt, dass solche Maßnahmen vor allem Transplantatempfängern zu Gute kommen und eine Manifestation der CMV-Krankheit verhindert werden kann. Im zunehmenden Maß wird daher die PCR zur Identifikation einer Virämie, Virurie oder zur Bestimmung der Viruslast aus anderen Körperflüssigkeiten wie beispielsweise einer bronchoalveolären Lavage (BAL) sowie Gewebeproben eingesetzt [17, 59]. Die Quantifizierung von CMV-DNA, d.h. die Ermittlung der Viruslast [18] kann als diagnostischer und prognostischer Marker eingesetzt werden und bietet sich auch zur Überwachung einer antiviralen Chemotherapie an, da eine sinkende Viruslast ein signifikanter Marker für den Therapieerfolg ist. Der Nachweis von HCMV bedeutet aber nicht automatisch seine pathologische Rolle bei einem gleichzeitig bestehenden Krankheitsbild, da auch beim Gesunden nicht selten eine geringe, asymptomatische CMV-Reaktivierung vorliegt [18].

1.3 ANTICYTOMEGALOVIRALE CHEMOTHERAPIE

Zur Chemotherapie der HCMV-Infektion sind derzeit fünf Virusstatika verfügbar, von denen drei zu den Nukleosidanaloga zählen sowie ein Antisense-Oligonukleotid und Foscarnet (Abb.1). Weitere Wirkstoffe sind erst in Entwicklung [11]. Mit dem Nukleosidanaloga Ganciclovir (GCV, 9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin) und dessen oral wirksamen Prodrug, Valganciclovir, der Valylester von Ganciclovir, wird einerseits die HCMV-Infektion bei AIDS-Patienten therapiert. Andererseits verwendet man GCV zur Prophylaxe und Therapie bei HCMV bedingten Erkrankungen, die nach Knochenmark- und Organtransplantation auftreten können [54]. Das Nukleosidanaloga Cidofovir (CDV, (S)-1-(3-Hydroxy-2-phosphosylmethoxypropyl)cytosin) ist zur i.v. Behandlung von HCMV-Retinitis bei AIDS-Patienten zugelassen [13] und kann präventiv gegen Cytomegalie bei allogener Knochenmarkstransplantation eingesetzt werden [12, 42, 47]. Diese drei genannten Nukleosidanaloga inhibieren die HCMV-spezifische DNA-

Polymerase. Hierzu ist es aber erforderlich, dass die an sich unwirksamen Nucleosidanaloga (Prodrugs) zunächst durch HCMV codierende Kinasen phosphoryliert und dadurch in die wirksamen Nucleotide überführt werden.

Im Gegensatz zu den drei genannten Virusstatika inhibiert Foscarnet (PFA, Natriumsalz der Phosphonoameisensäure) die virale DNA-Polymerase ohne notwendige Voraktivierung dadurch, dass PFA kompetitiv die Stelle der Polymerase blockiert, an welcher der Pyrophosphatrest bei der DNA Verlängerung mit Nucleotidtriphosphaten abgespalten wird. PFA wirkt somit als allosterischer DNA-Polymerasehemmer [3].

Fomiviren, ein Antisense-Oligonucleotid, hybridisiert mit der HCMV immediate-early mRNA, wodurch die virale Proteinsynthese blockiert wird [2]. Das Antisense-Oligonucleotid wird zur intravitrealen Behandlung der CMV-Retinitis eingesetzt.

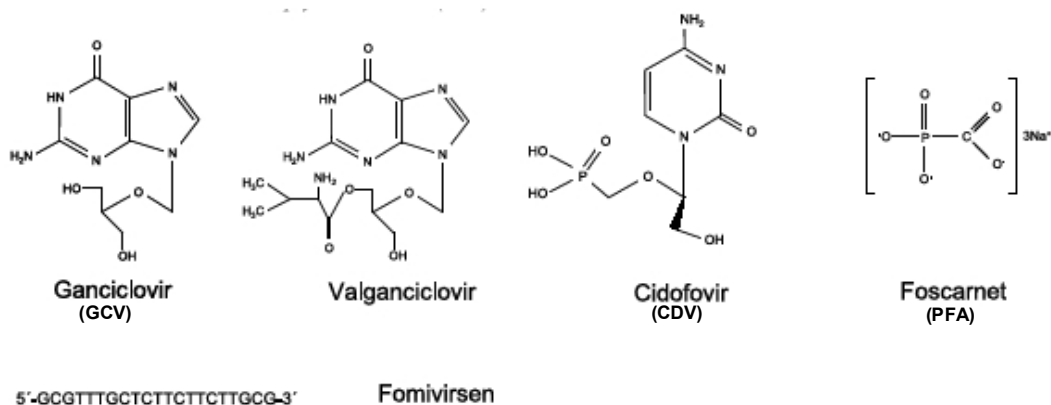


Abb. 1 Strukturformeln der derzeitig eingesetzten anti-HCMV-Virusstatika

Der entscheidende Nachteil der heutigen anti-HCMV-Arzneimittel sind die schwerwiegenden Nebenwirkungen, wodurch ihre klinische Anwendung stark eingeschränkt ist. Nephrotoxizität ist der dosislimitierende Faktor für CDV und PFA [34]. Die Toxizität von GCV verursacht Granulozytopenie und Thrombozytopenie. Zu diesen unerwünschten Nebenwirkungen kommen

außerdem die Nachteile der Resistenzentwicklungen vor allem im Verlauf einer Langzeittherapie [13].

Angesichts der gravierenden Nachteile der verfügbaren anticytomegaloviralen Arzneimittel wird intensiv nach neuen Wirkstoffen gesucht, die spezifischer wirken, weniger Nebenwirkungen auslösen und vor allem bei Patienten noch wirksam sind, bei denen sich Multiresistenzen gegen die herkömmlichen Wirkstoffe entwickelt haben.

Für die Entwicklung neuer anti-HCMV-Wirkstoffe werden sehr unterschiedliche Konzepte und Strategien verfolgt [11]. Wesentliche Ziele dieser Arbeiten sind einerseits die Reduzierung der Nebenwirkungen, so dass die Therapie für Patienten schonender und langfristig verträglicher wird. Andererseits sucht man nach Wirkstoffen, die bei auftretenden Multiresistenzen gegen die derzeitigen Arzneimittel wirksam sind. Zudem wird ein breiterer Applikationsweg angestrebt, damit eine Therapie sowohl oral als auch i.v. durchgeführt werden kann. Ein weiterer, nicht zu unterschätzender Gesichtspunkt ist die Entwicklung kostengünstiger Präparate, um möglichst vielen Patienten weltweit eine optimale Therapie zu ermöglichen.

Um diese Ziele zu erreichen, hält man aber nach wie vor am Grundprinzip der Monotherapie fest, d.h., man sucht einen neuen Wirkstoff, der in der Regel nur ein therapeutisches Target des Virus angeht. Sicherlich wird man in Zukunft verbesserte Wirkstoffe für die Monotherapie finden, welche nicht die starken Nebenwirkungen von Nukleosidanaloga, Foscarnet und Antisense-Oligonukleotiden aufweisen. Allerdings bleibt zu befürchten, dass schnell mutierende Viren, die besonders schwierig zu therapieren sind, durch die Ausbildung von Resistenzen jeden „Wunderwirkstoff“ für eine Monotherapie früher oder später unwirksam werden lassen. Gerade in der frühen HIV Therapie war die schnelle Resistenzbildung der limitierende Faktor für den Erfolg einer Monotherapie. Inzwischen hat man erkannt, dass nur durch Kombination von Wirkstoffen mit unterschiedlichen Therapie-Targets ein Therapieerfolg über einen langen Zeitraum möglich werden kann. Bis der Erfolg der Kombinationstherapie in einer pharmazeutischen Formulierung realisiert

werden konnte, d.h. eine Pille mit einem Gemisch zweier anti-HIV-Wirkstoffe (Combivir®), sozusagen eine „Kombipille“ zur Verfügung gestellt wurde, hat es jedenfalls sehr lange gedauert. Obwohl die Vorteile einer Kombinationstherapie bei der HIV Therapie eindeutig sind, setzt sich dieses Konzept nur sehr langsam als eine neue Therapieform gegen die bisherige Monotherapie auch bei anderen Erkrankungen durch.

1.4 MULTIPLEX-WIRKSTOFF AZT-LIPID-PFA

Im Gegensatz zur „Kombi-Pille“, die ein Gemisch aus zwei verschiedenen Wirkstoffen enthält, sind in Multiplex-Wirkstoffen zwei verschiedene Wirkstoffe chemisch miteinander zu einem neuen Molekül verbunden. Bei der enzymatischen Metabolisierung eines solchen Wirkstoffmoleküls werden gleichzeitig mehrere antivirale Metabolite (Multiplex) im Körper freigesetzt, die jeweils unterschiedliche Targets oder das gleiche Ziel unterschiedlich angreifen und somit additiv oder synergistisch wirken. Wird der anti-HIV-Wirkstoff Azidothymidin (AZT) über eine Glycerinlipidbrücke mit Foscarnet (PFA) chemisch gekuppelt, so resultiert der Multiplex-Wirkstoff 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidylyl-(5'-2)-1-O-octadecyl-rac-glycerol-3-(hydroxycarbonyl)-bisphosphonat x3 Na, der als AZT-Lipid-PFA oder N₃ bezeichnet wird (siehe Abb. 2). N₃ erweist sich in vitro den bisherigen anti-CMV-Nukleosidanaloga deutlich überlegen. N₃ ist hoch aktiv gegen GCV-resistente HCMV-Stämme und besitzt eine circa vierzigfach höhere antivirale Aktivität als PFA gegen einen GCV-resistenten CMV-Stamm [24, 43]. Die in vivo Aktivität soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals ermittelt werden. Eine Verträglichkeitsstudie die am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin-Buch, von Frau PD Dr. I. Fichtner mit N₃ durchgeführt wurde, hat ergeben, dass 50 bzw. 25 mg/kg ohne Auffälligkeiten und ohne Gewichtsverlust von Mäusen vertragen werden.

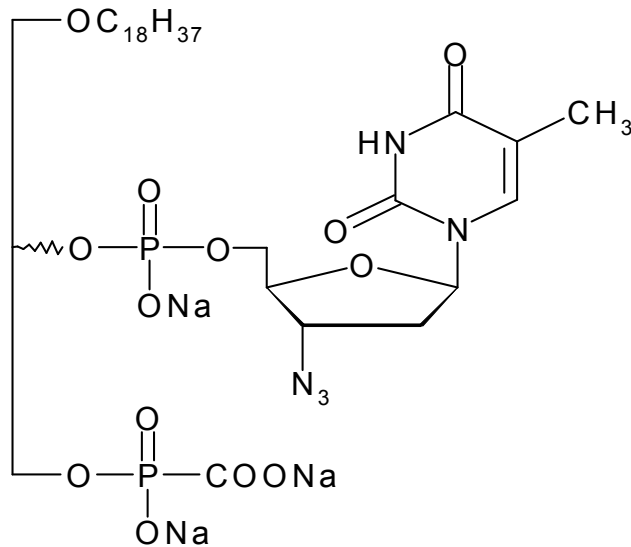


Abb. 2 Strukturformel des anti-CMV Multiplex-Wirkstoffs

3'-Azido-2',3'-dideoxythymidyl-(5'-2)-1-O-octadecyl-rac-glycerol-3-(hydroxycarbonyl)-bisphosphonat x3 Na (AZT-Lipid-PFA oder N₃)

1.5 UNTERSUCHUNG DER AKTIVITÄT ANTICYTOMEGALOVIRALER WIRKSTOFFE IN MAUSMODELLEN

Aufgrund der hohen Speziespezifität von HCMV [37] ist es nur bedingt möglich, anti-HCMV aktive Substanzen in Tiermodellen zu testen [33]. Hinzu kommt, dass Verteilung, Absorption, Metabolismus, Ausscheidung und Toxizität der antiviralen Wirkstoffe im Tiermodell anders ablaufen können als im Menschen [33]. Da das MCMV eine gute Übereinstimmung in den Genprodukten und den Zielorganen mit HCMV aufweist [1, 22, 52, 63], bietet sich bevorzugt das Mausmodell als Tiermodell zur Testung von potentiellen anti-HCMV-Wirkstoffen an. So lässt das MCMV-Genom 170 Gene erkennen und entspricht den zentralen 180 kb des HCMV. Beide Viren verursachen Infektionen sowohl im immungeschwächten als auch gesunden Wirt, wobei im Vergleich zum Menschen ähnliche klinische Krankheitsbilder auftreten. Daher kann eine aktive, letale als auch eine latente, nicht letale CMV-Infektion im Mausmodell nachgestellt werden. Verschiedene Mausmodelle werden in einer

Übersicht von Kern vorgestellt und bezüglich ihrer Vor- und Nachteile diskutiert [78, 80].

Zur schnellen, orientierenden Ermittlung der anti-CMV-Wirksamkeit einer Substanz hat sich das Mausmodell bewährt (in der Regel BALB/c Mäuse), bei dem eine letale Dosis des MCMV verabreicht wird. Aus der lebensverlängernden Wirkung lässt sich indirekt die anti-CMV-Aktivität abschätzen. Als zusätzliche Kontrolle kann die CMV-Last in den jeweiligen Organen bestimmt werden. Als letale CMV-Dosis werden in der Literatur für gesunde Mäuse Bereiche zwischen 2×10^5 [60] und 1×10^6 [33, 79] PFU und für SCID Mäuse zwischen $10^{2.5}$ und $10^{5.5}$ PFU [67, 68] angegeben. Die Angaben sind schwankend und schlecht vergleichbar, da für die Präparation der zur Infektion verwendeten Viren unterschiedliche Reinigungsmethoden wie auch verschiedene Stämme verwendet werden.

SCID Mäuse erweisen sich als ideales Modell zur Nachstellung von CMV-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten. Da SCID Mäuse kein funktionsfähiges Immunsystem besitzen, können sie das Virus weder durch eine Immunantwort eliminieren noch seine Replikation stoppen und sterben somit unbehandelt an einer MCMV-Infektion. Unter antiviraler Therapie erfolgt eine Replikationshemmung nur so lange die antivirale Therapie erfolgt, wodurch eine Lebensverlängerung der SCID Mäuse eintritt. Sobald die antivirale Therapie abgesetzt wird, sterben die Mäuse. Ein antiviraler Wirkstoff allein kann bekanntlich das Virus nicht eliminieren, sondern nur die Virusexpression und die damit verbundenen Folgen mehr oder weniger effektiv im Applikationszeitraum unterbinden [78, 80].

Die Inhibition der Virusreplikation in Zielorganen bei nicht tödlich infizierten BALB/c Mäusen gibt dagegen Auskunft über die Langzeitwirkung eines Virusstatikums.

Zu bedenken ist, dass mit diesen Mausmodellen eigentlich nur die antivirale Wirkung einer Substanz gegen MCMV in vivo ermittelt werden kann. Die Wirkung gegen HCMV kann lediglich als eine gute Näherung aus den Daten

des Mausmodells postuliert werden und ersetzt keinesfalls klinische Studien. Die Verwendung eines HCMV-Mausmodells zur Untersuchung von antiviralen Substanzen ist dann nur bedingt möglich, wenn das Wirkstofftarget oder der Wirkmechanismus bei Maus und Mensch zwar grundsätzlich gleich aber geringfügig speziesspezifisch geändert ist. Gerade die hohe Spezifität der Wechselwirkung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zwischen Wirkstoff und Ziel bedingt die Selektivität, die eine Wirkung weitgehend ohne unspezifische Nebenwirkung ermöglichen kann.

In jüngster Zeit wurde daher versucht, eine direkte HCMV-Infektion von humanem Gewebe im Mausmodell darzustellen. Hierzu wurde SCID Mäusen bspw. retinales Humangewebe in die Augen oder Thymus- und Lungengewebe unter die Nierenkapsel implantiert und mit HCMV infiziert. Mit Hilfe von plaque assays wurde der HCMV im Humangewebe ermittelt [34, 79].

1.6 MAUSMODELL DER INTRANASALEN HCMV-INFEKTION MIT SUBLETALER DOSIS

Wie bereits erwähnt, ist in einem Großteil der Bevölkerung das HCMV aufgrund früherer HCMV-Infektionen latent im Körper vorhanden. Geraten Virusträger in einen kritischen Krankheitszustand, beispielsweise nach schweren chirurgischen Eingriffen, so kann der an sich latente Virus reaktiviert werden [10] mit der Folge, dass sich der kritische Krankheitszustand dramatisch verschlechtert. Da die Lungen als Organ für ein hohes Reservoir an latentem HCMV bekannt sind [39], beginnt sehr häufig hier die Reaktivierung des Virus beispielsweise bei intubierten Intensivpatienten [29].

Aus den zahlreichen Arbeiten von Reddehase ist bekannt, dass in der latent infizierten Lunge die Infektionsherde wie in einer Art Mosaik angeordnet sind. Mehrere verschiedene lokale Infektionsfoci sind nach dem Zufallsprinzip über die gesamte Lunge verteilt, die sich entweder in einem Transkriptions- oder Ruhezustand befinden und dabei ihren Status von Zeit zu Zeit wechseln. In der Latenzphase werden das IE 1 Genprodukt, das dem humanen IE Protein p72

entspricht sowie das Transkriptionsprodukt IE 3, das dem humanen IE 2 zuzuordnen ist, gefunden. In der Replikationsphase tritt neben den genannten Genprodukten noch das early gB Transkript auf. Durch Zerlegen der Lunge in verschiedene Abschnitte werden Bereiche mit unterschiedlicher Virusaktivität erhalten. Mit diesem hoch sensiblen Verfahren sind die Voraussetzungen geschaffen, dass praktisch alle replikationsaktiven bzw. latenten Bereiche im infizierten Lungengewebe erfassbar werden [38, 53].

Zur Aufklärung der CMV-Infektion auf genetischer Basis wurde in jüngster Zeit von der Arbeitsgruppe Dr. Häberle, Anästhesie ZMF Universitätsklinikum Tübingen ein Mausmodell der intranasalen (i.n.) MCMV-Infektion entwickelt, in dem alle Erkenntnisse aus den Redderhase-Arbeiten zum Tragen kommen. Das Modell untersucht die pulmonale MCMV-Infektion und stellt die klinische Relevanz der HCMV-Infektion weitgehend nach. Mit Hilfe des Modells und der Anwendung molekularbiologischer Methoden können die verschiedenen Stadien der MCMV-Infektion erfasst werden. Durch die Detektion der IE 1 und IE 3 Genprodukte, die keinen wesentlichen Unterschied zwischen MCMV und HCMV aufweisen, ist der latente Infektionszustand nachweisbar. Die Virusreplikation äußert sich durch das Auftreten des early Genprodukts gB.

Im Tiermodell werden gesunde Mäuse eingesetzt, die mit einer subletalen Dosis (2×10^4 PFU) des MCMV i.n. infiziert werden. Nach Primärinfektion kann sowohl die Virusreplikation als auch die Viruslatenz durch MCMV-Genprodukte zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion im Zeitraum von 1 - 36 Tagen ermittelt werden [75].

Mit Hilfe der RT-PCR und den entsprechenden MCMV-genspezifischen Primern können in der, aus den Lungenteilen isolierten mRNA, die jeweiligen IE 1, IE 3, gB Genprodukte voneinander unabhängig detektiert werden, so dass der virale Infektionsstatus in jedem einzelnen Lungenabschnitt selektiv bestimmbar wird.

Das Mausmodell hat sich zur Untersuchung der zytokin-induzierten Reaktivierung bewährt, wie einer Posterpräsentation zu entnehmen ist [75]. Hierbei konnten neue Aspekte des Signaltransduktionsweges und der

Reaktivierungsmechanismen des MCMV ermittelt werden, die einen Beitrag zum besseren Verständnis der HCMV-Infektion leisten.

Da mit diesem Modell der Verlauf einer MCMV-Infektion anhand der auftretenden Genprodukte verfolgt werden kann, bietet es sich auch zur Untersuchung der Aktivität antiviraler Stoffe an. Da bisher solche Untersuchungen mit diesem Modell noch nicht durchgeführt wurden, fehlen Orientierungsdaten, so dass der Einfluss von anti-CMV-Arzneimitteln auf den Verlauf einer subletalen i.n. Primärinfektion bisher ungeklärt ist.

Orientierende Daten zur Reaktivierung der MCMV-Infektion bei Prophylaxe mit Ganciclovir (GCV) in gesunden Mäusen, die i.p. mit subletaler Dosis an MCMV primär infiziert wurden, und deren Virusinfektion dann in den latenten Zustand übergegangen war, wurden vor kurzem veröffentlicht [10]. Dabei zeigte sich, dass die Reaktivierung des MCMV in der Lunge durch prophylaktische GCV-Gabe für die Dauer der Medikation verhindert werden kann.

1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Durch die chemische Kupplung der antiviralen Wirkstoffe Azidothymidin und PFA wurde der neue Multiplex-Wirkstoff AZT-Lipid-PFA erhalten, der in vitro eine hohe Anti-CMV-Aktivität aufweist. Ob dieser Wirkstoff für die Langzeittherapie bzw. Prophylaxe von HCMV geeignet ist, wurde bisher in vivo nicht untersucht. Ebenfalls ungeklärt ist, ob mit diesem Wirkstoff die hohe Nephrotoxizität der bisherigen anti-CMV-Arzneimittel gemildert, beziehungsweise vermieden werden kann. Ziel der Arbeit ist daher die Klärung folgender Fragen:

Welchen Einfluss hat der neue anti-CMV-Wirkstoff AZT-Lipid-PFA auf die Virusaktivität im Lungengewebe gesunder Mäuse nach deren intranasaler Primärinfektion mit subletaler MCMV-Dosierung?

Welche Nebenwirkungen treten bei der Medikation mit AZT-Lipid-PFA im Allgemeinen auf, und inwieweit sind dabei besonders Nieren und Lungen betroffen?

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 GERÄTE

Bezeichnung	Firma
AIDA image analyser	Raytest, Straubenhardt
Biofuge fresco	Heraeus, Langenselbold
Blutentnahmemonovetten Li-Heparin 2,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht
DIANA III	Raytest, Straubenhardt
DNase/ RNase freie Multireaktionsgefäße 1,7; 2 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Einbettkassetten	Sarstedt, Nümbrecht
einmal Injektionskanülen 20G, 25G, 27G	BD Microlance, USA
Einmalpipetten 5, 10, 25 ml	BD Falcon, Heidelberg
Einmalspritzen 10, 20 ml	B Braun, Melsungen
Einmalspritzen 1ml	BD Palstikpak™, Heidelberg
Falcon Tubes 15; 50 ml	BD Falcon, Heidelberg
Gelelektrophoresekammern Horizon 11-14	Gibco BRL life technologies Gel Apparatur
Homogenisator D8	Miccra RT
KNF Laborport	KNF, Freiburg
Küvette	Sarstedt, Nümbrecht
Lavage-Sonde	Dr. Häberle, ZMF Tübingen
Lithium-Heparin-S-Monovette®	Sarsted, Nümbrecht
Master Cycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0 R	Kendro, Langenselbold
Microzentrifuge 220 VAC	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipet boy accu	Integra bioscience, Wallisellen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen gelb/ blau	Sarsted, Nümbrecht
Powerpack 3000	Biorad, München, Philadelphia
Präparierbesteck	Aesculab AG, Tuttlingen
Sterile Filterspitzen 10, 20, 100, 200, 1000µl	Bioenzym, Oldendorf
Steriler Filter 0,2 µl Ministart®	Sartorius, Göttingen
Ultraspec 3000 pro Photometer	Amersham pharmacia, USA
Vortex Genie® 2	Scientific Industries, USA
Wattestäbchen	Schmeiser, Horb a.N.

2.2 REAGENZIEN

Bezeichnung	Firma
100bp DNA LADDER	Promega, Mannheim
50 x TAE– Puffer	Biorad, München
Chloroform for molecular biology min. 99%	Sigma, München
DEPC-Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I, Amplification Grade	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol 80%	Sigma, München
Ethanol RNA-frei für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid [10mg/ ml]	Sigma, München
Formaldehyd-Lösung 4 % für die Histologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
H ₂ O - destilliert, autoklaviert	ZMF, Tübingen
Isopropanol for molecular biology min. 99%	Sigma, München
Ketamin Curamed	Curamed, Karlsruhe
Methylbutan	Applichem GmbH, Darmstadt
N ₃	Prof. Dr. H. Schott Institut für Organische Chemie, Tübingen
NaCl (0,9 %)	B Braun, Melsungen
Oligo dT20–Primer 50 µM	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Sigma, München
PBS	Ginco, Eggenstein
peqGOLD Trifast™	Peqlab, Erlangen
peqGOLD universal Agarose	peqlab, Erlangen
Platinum® PCR Supermix	Invitrogen, Karlsruhe
RNA-away®	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse H	BIOLABS, New England
RNAse OUT™	Invitrogen, Karlsruhe
Saccharose	Sigma, München
Superscript III–RNAseH®	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript™ III first Strand synthesis system for RT-PCR®	Invitrogen, Karlsruhe
TE-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Tissue Tek® O.C.T.™ flüssig	IMEB Sakura, USA
Wasser (RNAse, DNase-frei (NFW))	Sigma, München
Xylazin, Rampun®	Bayer, Leverkusen
Xylenecyanol	AppliChem GmbH, Darmstadt

2.2.1 PUFFERLÖSUNGEN

▪ TAE-Puffer

Als Stammlösung wird der 50 x TAE-Puffer der Firma Biorad (50 x TAE-Puffer (40mM), Essigsäure (20mM), EDTA (1mM), pH 8,3) verwendet. Für die Gele wird dieser mit destilliertem H₂O 1:5 verdünnt.

▪ Tissue Tek® Verdünnung

Unter der Sterilbank wird für die Gefrierschnittproben flüssiges Tissue Tek® mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt.

▪ 6 x Laufpuffer für die Gelelektrophorese

Nach dem Laborprotokoll wird der Laufpuffer wie folgt hergestellt:

0, 40 % Orange G (50 bp), 0, 25 % Xylenecyanol (4 kb), 40 % Saccharose in destilliertem H₂O.

2.2.2 „MASTERMIX“ FÜR DIE cDNA-SYNTHESE

10 µl „Mastermix“ enthalten folgende Komponenten des Superscript™ III first Strand synthesis system for RT-PCR®- Kit:

2 µl 10 x RT Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT,

1 µl RNaseOUT™ (40 U/µl), 1 µl SuperScript™ RT (200 U/µl).

2.3 PRIMER FÜR DIE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Die in Tab. 1 aufgeführten Primer werden von der Firma ThermoElektron, Langenselbold bezogen.

Tab. 1 Sequenz, Schmelztemperatur (TM in °C) und Länge (bp) der zur Amplifikation der MCMV-Gene verwendeten Primer

Gen		Sequenz	TM in °C	Amplifikationslänge in bp
β-Aktin*	Forward	5'- TCT GGC ACC ACA CCT TCT AC- 3'	49,8	477
	Reverse	5'- CAG GCA GCT CAT AGC TCT TC- 3'	49,4	
ie 1 [9]	Forward	5'- TAG CCA ATG ATA TCT TCG AGC G - 3'	53,9	602
	Reverse	5'- ATC TGG TGC TCC TCA GAT CAG CTA A- 3'	57,4	
ie 3 [1]	Forward	5'- CCT CGA GTC TGG ACC CGA AA- 3'	54,1	299
	Reverse	5'- TGT GAG GCA GTA GTT ATA CC- 3'	41,6	
gB*	Forward	5'- TCG AGA CCG CTG GTC GTC TT - 3'	57,0	362
	Reverse	5'- GTG CGG ATG TGC TGC TTC TG- 3'	56,6	

* entworfen mit Hilfe von Daten aus der Genbank im Labor von Frau Dr. H. Häberle (Anästhesie, ZMF Tübingen)

2.4 NARKOSELÖSUNG

Eine Narkoselösung der nachstehenden Zusammensetzung 4,0 ml Ketamin Curamed (50 mg/ml), 1,3 ml Xylazin (20 mg/ml), 7,6 ml NaCl (0,9 %) wird unter der sterilen Werkbank hergestellt.

2.5 MAUSMODELL

Für die Versuche werden fünf Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse mit einem durchschnittlichen Gewicht von 17,5 g eingesetzt. Die Mäuse werden im Alter von drei Wochen von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln bezogen. Die Tierhaltung erfolgt in Filterkäfigen zu je fünf Tieren im Tierstall des ZMF Tübingen nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Ernährt werden die Tiere mit Trockenfutter (Pellets) und sterilem H₂O.

2.5.1 INFEKTION MIT MCMV UND GEWICHTSBESTIMMUNG DER MÄUSE

Die Primärinfektion erfolgt i.n. mit einer Viruslösung, die 2×10^4 PFU des aufgereinigten MCMV Smith Stamms enthält, der primär von der Firma ATCC erworben wurde. Zur Infektion werden die Tiere durch i.p. Applikation von 100 µl der Narkoselösung betäubt. Anschließend werden den narkotisierten Tieren unter der sterilen Werkbank pro Nasenloch 25 µl der Viruslösung appliziert. Den Kontrollmäusen werden analog 2 x 25 µl PBS i.n. verabreicht.

Alle Tiere werden ab Tag 9 p.i. wöchentlich gewogen. Dazu wird jedes Tier aus dem Käfig in eine Box gesetzt, die auf einer Waage steht. Das Gewicht der virusinfizierten Tiere wird unter der sterilen Werkbank bestimmt.

Zudem wird an jedem Präparationstag das folgende Stammdatenblatt für jede Maus ausgefüllt.

Mäuse Stammdatenblatt
Datum:
Käfig Nr.:
Kennung:
Therapie:
Gewicht:
Fell:
Urin in ml: Blut in ml: Besonderheiten:

2.5.2 ANTIVIRALE MEDIKATION

An jedem Therapietag werden 800 mg N₃ in 80 ml PBS gelöst, wobei eine Stammlösung mit der Konzentration von 1 mg N₃/ 100 µl PBS erhalten wird. Die Lösung wird dann durch einen 0,2 µl Sterilfilter filtriert, in 1 ml Spritzen mit einer Kanülendicke von 27G unter der Sterilbank portioniert und bis zur Applikation auf Eis gelagert. Die Tiere werden in folgender Reihenfolge behandelt, um eine Virusverschleppung zwischen den Käfigen zu vermeiden: Zuerst erhält die Kontrollgruppe PBS, anschließend die Wirkstoffgruppe N₃ i.p.. Dann werden die MCMV-infizierten Tiere der Therapiegruppe mit N₃ therapiert und zuletzt wird den infizierten Tiere der Infektionsgruppe PBS gespritzt, siehe dazu Therapieschema der Abb. 4 auf Seite 29.

2.6 ENTNAHME VON KÖRPERFLÜSSIGKEITEN

Am Tag 1 p.i. werden fünf Mäuse jeweils aus der Kontroll- und Infektionsgruppe, an den Tagen 5, 15, 22, 29, 36, 43, 50 p.i. fünf Mäuse aus jeder der vier Gruppen getötet. Unter i.p. applizierter Narkoselösung von 200 µl und nach ausbleibendem Schmerzreiz werden am jeweiligen Zeitpunkt aseptisch drei Tieren Leber, Milz und Nieren entnommen. Außerdem werden für spätere Untersuchungen, die nicht im Rahmen dieser Arbeit vorgesehen sind, allen fünf Tieren Blut und Urin für Metabolismusstudien entnommen, eine BAL für Zytokinbestimmungen durchgeführt, sowie Blutausstriche für mögliche weitere Versuche angefertigt. Der an der Luft getrocknete Blutausstrich wird im Ethanolbad mit 100% Ethanol fixiert. Allen fünf Tieren einer Gruppe werden jeweils die Lungen entnommen. Davon werden drei Lungen zur Untersuchung für den MCMV-Nachweis mittels RT-PCR verwendet, die restlichen zwei Lungen werden für histopathologische Untersuchungen benötigt.

Die Organentnahme, deren Aufbewahrung und Verwendung wird wie folgt durchgeführt: Nach Lösen des Fells der betäubten Tiere wird zuerst mit einer Einmalkanüle (25G) an einer 2,6 ml Lithium-Heparin-S-Monovette® eine Herzpunktion durchgeführt. Bei drei Mäusen einer Fünfergruppe wird die Trachea freigelegt, die jeweilige Maus tracheotomiert und die Lunge über eine

Sonde mit 2 x 1 ml PBS gespült (= BAL). Weiter wird der Brustkorb eröffnet, die Lunge entnommen und nach dem Schema, das in Abb. 5 auf Seite 31 dargestellt ist, zunächst zerkleinert. Anschließend werden die so erhaltenen Lungenstücke in RNA-freien Eppendorf Cups vereinigt, in flüssigem Stickstoff zwischengelagert und für die spätere Aufarbeitung mittels PCR bei -80 °C asserviert. Danach wird der Bauchraum aufgeschnitten. Zur Urinentnahme wird die Blase mit einer Injektionskanüle (27G) punktiert, dann werden Leber, Milz sowie Nieren entnommen. Die präparierten Organe sowie der Urin werden in 2,0 ml RNA-freien Eppendorf Cups ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert, während die Nieren in Einbettkassetten eingebettet und in gepuffertem 4% Formaldehyd bei Rt konserviert werden. Die BAL und das Blut werden bis zur Zentrifugation (BAL: 4 °C, 15 min, 2 g; Blut: 20 °C, 10 min, 2000 g) am Entnahmetag bei 4 °C zwischengelagert. Das mittels Zentrifugation gewonnene Serum und der Überstand der BAL wird in RNA-freie Eppendorf Cups überführt und ebenfalls bei -80 °C aufbewahrt. Bei den zwei restlichen Mäusen aus einer Fünfergruppe werden Blut, Urin sowie die Lungen für histologische Untersuchungen entnommen, wobei dazu die eine Lunge mit gepuffertem 4 % Formaldehyd, die andere für Gefrierschnitte mittels Tissue Tek® fixiert wird. Um die Lunge mit Tissue Tek® zu fixieren, wird diese analog zur PBS Spülung mit 1 ml Tissue Tek® (1:1) ausgeschwemmt. Für die Gefrierschnitte muss das Tissue Tek® in der Lunge verbleiben. Dies kann durch Abbinden der tracheotomierten Trachea mittels Garn erzielt werden. Die Tissue Tek® gefüllte Lunge wird anschließend dem Torso entnommen und in einem Methylbutan-Trockeneisbad in gekühltem Tissue Tek® eingebettet. Bis zur Weiterverarbeitung bewahrt man den Tissue Tek® Block, in dem sich die eingebettete Lunge befindet, in Aluminiumfolie verpackt bei -70 °C auf. Zur Formalinfixierung wird die Lunge mit 1 ml gepuffertem 4% Formaldehyd gespült, ohne Herz in einer Einbettkassette eingelagert und anschließend in einem mit gepufferten 4 % Formaldehyd gefüllten Behälter zusammen mit den Nieren bei Rt aufbewahrt.

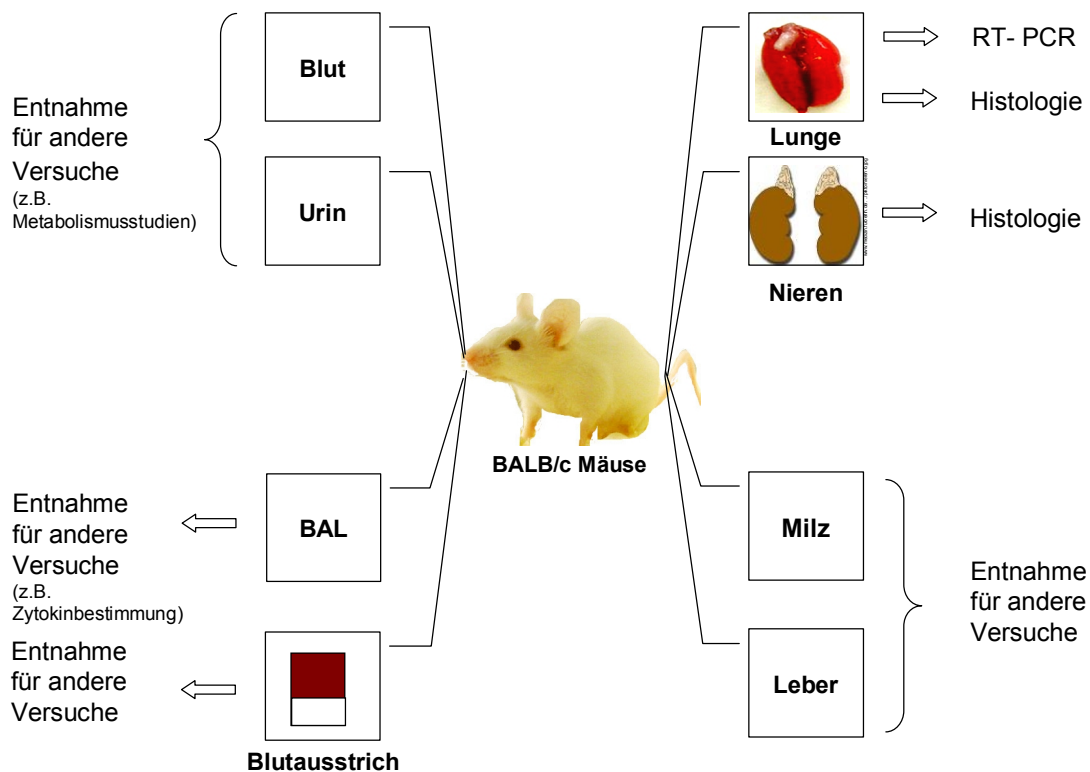


Abb. 3 Übersicht zu der Organentnahme an den jeweiligen Tagen 1, 5, 15, 22, 29, 36, 43, 50 p.i. und deren anschließende Verwendung.

2.7 MCMV-NACHWEIS IM LUNGENGeweBE

2.7.1 HOMOGENISIEREN DES LUNGENGeweBES

Die entnommenen Lungen werden jeweils an den Präparationstagen 1, 5, 15, 22, 29, 36, 43, 50 p.i. unmittelbar in die verschiedenen Teile zerlegt (siehe Abb. 5 Seite 31) und bei -80°C asserviert. Bei der späteren Aufarbeitung für die PCR werden die tiefgefrorenen Gewebeproben zunächst auf Trockeneis und kurz vor der Weiterbearbeitung auf Eis gelagert.

Zu den aufgetauten, gekühlten Eppendorf Cups mit den Lungenstücken werden direkt vor dem Homogenisieren $200\ \mu\text{l}$ gekühltes ^{peqGOLD} TrifastTM mit einer RNase-freien Pipette, versehen mit steriler Spitze, gegeben. Das Gemisch im Eppendorf Cup aus Lungengewebe und ^{peqGOLD} TrifastTM wird mit dem

Homogenisator ungefähr 15 sec zerkleinert. Zur zerkleinerten Masse werden weitere 800 μl ^{peq}GOLD TrifastTM hinzugefügt. Durch wiederholtes Auf- und Abziehen des Inhalts im Eppendorf Cup mit der Pipette wird eine schlierenfreie Suspension erhalten. Bei einer unmittelbar anschließenden Weiterverarbeitung werden die Proben auf Eis gekühlt. Anderenfalls können die Proben wiederholt auf Trockeneis zwischengelagert bzw. im Gefrierschrank -80°C aufbewahrt werden.

Nachdem eine Probe homogenisiert ist, erfolgt die Reinigung des Homogenisators in folgenden vier Schritten: Spülung mit 80 % Ethanol, RNA-away®, destilliertem H_2O und zum Schluss mit autoklaviertem, destilliertem H_2O , anschließend wird der Homogenisator mit einem Papiertuch noch getrocknet.

Nach Abschluss des Homogenisierens aller Proben werden die Stäbe des Homogenisators in ein KOH-Bad gestellt und vor dem nächsten Gebrauch mit H_2O und Ethanol gründlich gespült.

2.7.2 RNA-ISOLIERUNG

Die Lungenstücke, die nicht unmittelbar nach ihrer Zerkleinerung aufgearbeitet sondern eingefroren wurden, lässt man ungefähr 15 min bei Rt auftauen und dann weitere 5 min bei Rt stehen.

Die im Eppendorf Cup enthaltene und auf Rt erwärmte Gewebesuspension wird mit Hilfe des VortexGenies2 3 sec aufgemischt, mit 200 μl gekühltem Chloroform versetzt, gut verschlossen und abermals für ungefähr 15 sec gemischt bis die Suspension eine rosig-milchige Färbung annimmt. Nach fünfminütigem Ruhen bei Rt wird die Suspension in der auf 4°C gekühlten Zentrifuge für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Es resultieren drei Phasen: die untere, phenolische, rote Phase, welche die DNA enthält, eine weiße Proteinschicht als Zwischenphase und die obere, wässrige Phase, welche die gesuchte RNA enthält. Die wässrige Phase, etwa 600 μl , wird in ein neues 1,7

ml RNase-freies Eppendorf Cup überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach gutem Durchmischen wird der Ansatz entweder nach 60 min bei -20 °C weiterverarbeitet oder für die spätere Aufarbeitung mehrere Tage bei -20 °C aufbewahrt. Die beim Stehenlassen der wässrigen Proben ausfallende RNA wird 15 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert und bildet dabei ein Pellet. Der Überstand wird verworfen. Das verbliebene RNA-Pellet wird zur Reinigung mit 1 ml gekühltem 75% RNase-freiem Ethanol versetzt, gut durchgemischt und bei der anschließenden Zentrifugation bei 4°C und 12000 g für 2 min wieder ausgefällt. Der Überstand wird verworfen. Reste des Ethanolüberstandes werden mit 10 µl Filterspitzen vom Pellet möglichst weitgehend abgesaugt. Die Pellets werden an der Luft bis zum glasigen Erscheinen ungefähr 5 min getrocknet und dann je nach Größe in ca. 20 - 40 µl nukleasefreiem Wasser (NFW) gelöst. Die RNA-Konzentration der jeweiligen Lösung wird spektralphotometrisch bestimmt.

2.7.2.1 SPEKTRALPHOTOMETRISCHE REINHEITS- UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER RNA

Ein Aliquot jeder Probe wird zuerst in einem RNA-freien Gefäß mit TE-Puffer 1:100 verdünnt. Die Verdünnung wird in eine Küvette von 10 mm überführt und im Photometer Ultraspec 3000 mit dem Programm Molekularbiologie RNA mit einem Verdünnungsfaktor von 100 bei 260 nm, 280 nm gemessen. Der Nullabgleich erfolgt mit 100 µl TE-Puffer. Die Küvetten werden nach jeder Probe mit dem Laborport ausgesaugt und mit NFW gereinigt.

2.7.2.2 DNA VERDAU

In einem 500 µl RNase-freien Eppendorf Cup wird ein Aliquot der isolierten RNA auf 5 µg/µl mit NFW verdünnt und auf ein Gesamtvolumen von 6,2 µl mit NFW aufgefüllt (siehe Anhang). Für den DNA Verdau fügt man folgende Komponenten des DNase I Amplification Grad-Kit hinzu: 0,8 µl DNA I Reaction Puffer und 1 µl DNase I (Amp Grade, 1 U/µl). Der Ansatz wird 30 min bei Rt

stehengelassen, bevor er durch Zugabe von 1 µl EDTA gestoppt wird. Das Gemisch wird anschließend 10 min im Mastercycler bei 65°C inkubiert.

2.7.3 cDNA SYNTHESE DURCH REVERSE TRANSKRIPTION DER mRNA

Nach dem DNA Verdau wird die RNA mittels Superscript™ III first Strand synthesis system for RT-PCR®-Kit, das alle nötigen Komponenten enthält, in drei Schritten zur cDNA umgeschrieben. Im ersten Schritt wird die im Eppendorf Cup enthaltene Probe mit 1 µl Oligo (dT)₂₀ und 1 µl dNTP-Mix versetzt, im Mastercycler 5 min bei 65°C erhitzt und dann 5 min auf Eis gekühlt. Im zweiten Schritt werden 10 µl „Mastermix“ zu jeder Probe hinzugeführt, die dann im Mastercycler 50 min bei 50°C, gefolgt von weiteren 5 min bei 85°C wieder erhitzt und anschließend abermals für 5 min auf Eis gekühlt wird. Im dritten Schritt wird jede Probe mit 1 µl RNase H versetzt und 20 min bei 37°C im Mastercycler erwärmt. Das Eppendorf Cup mit dem hierbei entstandenen cDNA-Pool wird für den unmittelbar anschließenden Gennachweis mittels RT-PCR auf Eis gekühlt oder für eine spätere Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

2.7.4 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) DER cDNA

Für die PCR wird aus den jeweiligen Stammlösungen der Forward (F)- und Reverse(R)-Primer ein Primergemisch für die Anzahl an cDNA-Ansätze in einem RNA-freiem Eppendorf Cup wie folgt angesetzt.

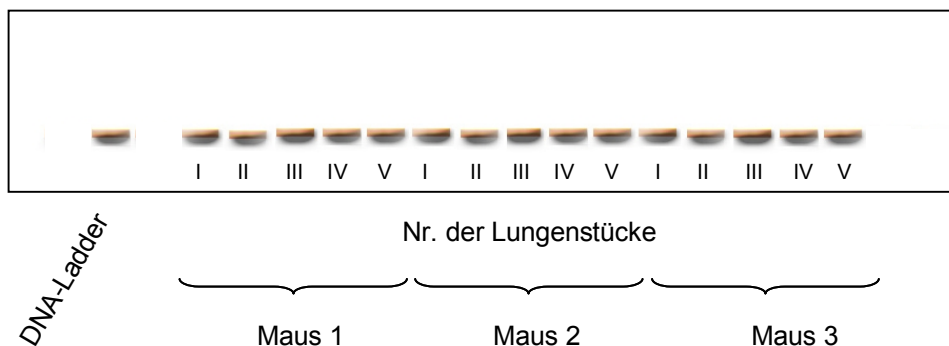
$(\frac{1}{2} \text{ (PRIMER (R))} + \frac{1}{2} \text{ (PRIMER (F))}) : 9 \times \text{NFW}$

Für jede cDNA Probe werden in ein RNA-freies Eppendorf Cup 46 µl Platinum® PCR Supermix, 2 µl Primergemisch sowie 2 µl aus dem cDNA-Pool pipettiert. Zur Durchführung der RT-PCR wird das Eppendorf Cup an zentrifugiert, in den Mastercycler gestellt und durchläuft das Primer spezifische Programm, welches in Tab. 2 auf Seite 32 aufgeführt ist. Der erhaltene Reaktionsansatz wird durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.7.5 TRENNUNG DER AMPLIFIZIERTEN PRODUKTE IM AGAROSEGEL DURCH GELELEKTROPHORESE

Für jede Gelkammer wird ein Ansatz von 2,25 mg Agarose in 150 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle zum Sieden gebracht. Zur UV-Markierung des zu erwartenden Bandenmusters wird das unter Rühren auf Rt abgekühlte, noch flüssige Agarosegel unter dem Abzug mit 4 μ l Ethidiumbromid (Lösung) versetzt und dann in die Gelkammern gegossen. Zur Aussparung der Geltaschen wird ein Kamm mit 1 mm Dicke am Gelrand eingesetzt. Die Elektrophoresekammer wird nach Erstarren des Ethidiumbromid-Agarosegels mit TAE-Puffer aufgefüllt. Zu den im Eppendorf Cup befindlichen PCR-Produkten werden 10 μ l des 6-fach-DNA-Laufpuffers gegeben. Der Ansatz wird gemischt und ein Aliquot von 15 μ l wird jeweils in eine der 15 Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker werden 8 μ l der 100 bp DNA-Ladder in die am Rand befindliche Geltasche pipettiert. Dann schließt man die Kammer am Powerpack bei 90 V für ungefähr 1,5 h an.

Schema 1 Ethidiumbromid-Agarosegel zur Chromatographie der amplifizierten cDNA, die aus den verschiedenen Lungenabschnitten gewonnen wird.



Das erhaltene Gelchromatogramm wird mit Hilfe des digital Kamerasystems DIANA III der Firma Raytest unter UV-Licht fotografiert sowie digitalisiert und mit AIDA Software Version 3.22 analysiert. Die erwarteten Basenpaare der Amplifikationsprodukte betragen für das Produkt von β -Aktin 477 bp, für das Genprodukt IE 1 602 bp, IE 3 299 bp und gB 362 bp (siehe Tab.1 auf Seite 18). Die Gele werden im Anschluss als Gefahrstoff entsorgt.

3 ERGEBNISSE

3.1 INFektion UND ANTIVIRALE MEDIKATION DER MÄUSE

3.1.1 INTRANASALE MCMV-INFektion UND ANTIVIRALE MEDIKATION MIT DEM MULTIPLEX-WIRKSTOFF AZT-LIPID-PFA (N₃)

Die Wirkung des Multiplex-Wirkstoffes N₃ auf die intranasale (i.n.) Primärinfektion gesunder Mäuse mit murinem Cytomegalovirus (MCMV) wurde über einen Zeitraum von 50 Tagen untersucht. Für diese Versuchsreihe sollten ursprünglich insgesamt 154 BALB/c Mäuse einbezogen werden. Bei der Narkotisierung vor der i.n. Infektion verstarben bereits vier Tiere. Die verbliebenen 150 Tiere verhielten sich unauffällig, so dass die i.n. Applikation weitgehend komplikationslos möglich war. Die eingesetzten Tiere wurden in zwei Gruppen mit jeweils 75 Mäusen aufgeteilt (Abb. 4) und in 30 Filterkäfigen zu je fünf Tieren gehalten. Unter Narkose wurde jeder Maus einer Gruppe i.n. in jedes Nasenloch 25 µl der MCMV-Lösung (rote Maus) oder 25 µl PBS als Kontrolle (weiße Maus) appliziert. An Tag 1 p.i. wurden je fünf Mäuse aus der Kontrollgruppe (PBS/PBS) und der Infektionsgruppe (MCMV/PBS) für den Infektionsnachweis getötet, so dass für den weiteren Verlauf der Testung noch 140 Mäuse verblieben.

3.1.1.1 THERAPIEPLAN UND MEDIKATION

Die nach Tag 1 der Infektion beginnende Medikation wurde nach dem in Abb. 4 zusammengefassten Plan durchgeführt. Von der Gruppe mit MCMV infizierten 70 Mäusen erhielten 35 Mäuse an den 10 Therapietagen, in der Therapiezeit Tag 1 - 19 p.i., jeweils 100 µl PBS intraperitoneal (i.p.). 35 Mäusen wurden jeweils 100 µl PBS, in denen 1 mg des Multiplex-Wirkstoffes (N₃) gelöst war, ebenfalls i.p. gespritzt. Bei den 70 Mäusen aus der nicht infizierten Gruppe wurde analog verfahren, so dass 35 Mäuse nur PBS und 35 Mäuse dagegen PBS/N₃ erhielten. Nach dem Therapieplan resultierten somit vier Gruppen. Die Kontrollgruppe (PBS/PBS), die Wirkstoffgruppe (PBS/N₃), in der eventuelle Nebenwirkungen von N₃ ermittelt werden konnten, die Therapiegruppe (MCMV/N₃) zur Bestimmung der antiviralen Aktivität von N₃ und die Infektionsgruppe (MCMV/PBS) zur Untersuchung der Auswirkung der MCMV-Infektion.

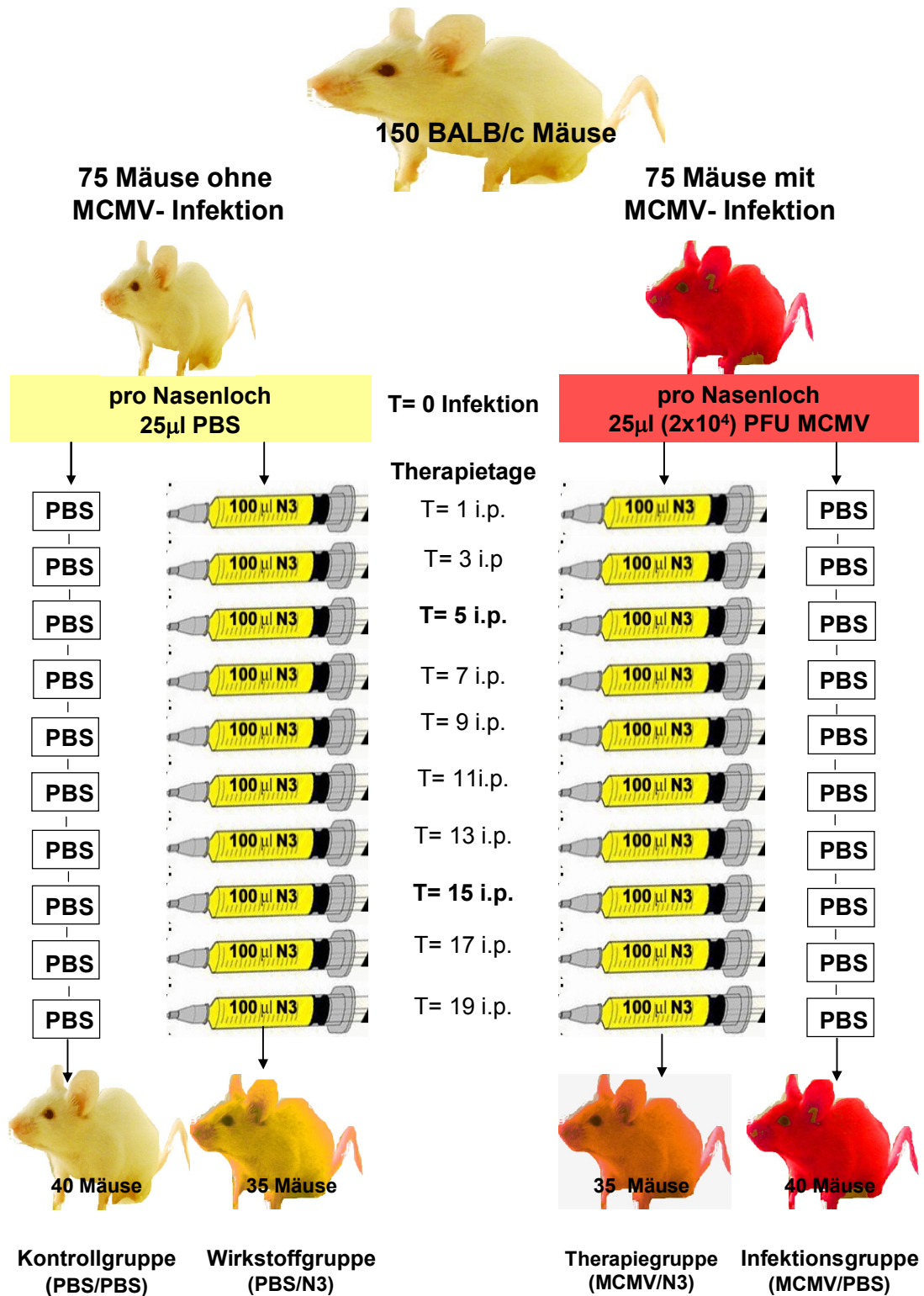


Abb. 4 Therapieplan für die in vier Gruppen aufgeteilten Mäuse ab Tag 5 nach der i.n. MCMV-Infektion. Am Tag 1 wurden jeweils 5 Mäuse aus der Kontroll- und Infektionsgruppe zum Nachweis der Primärinfektion verwendet, so dass für die sich anschließenden Untersuchungen noch 140 der ursprünglich 150 Tiere verblieben.

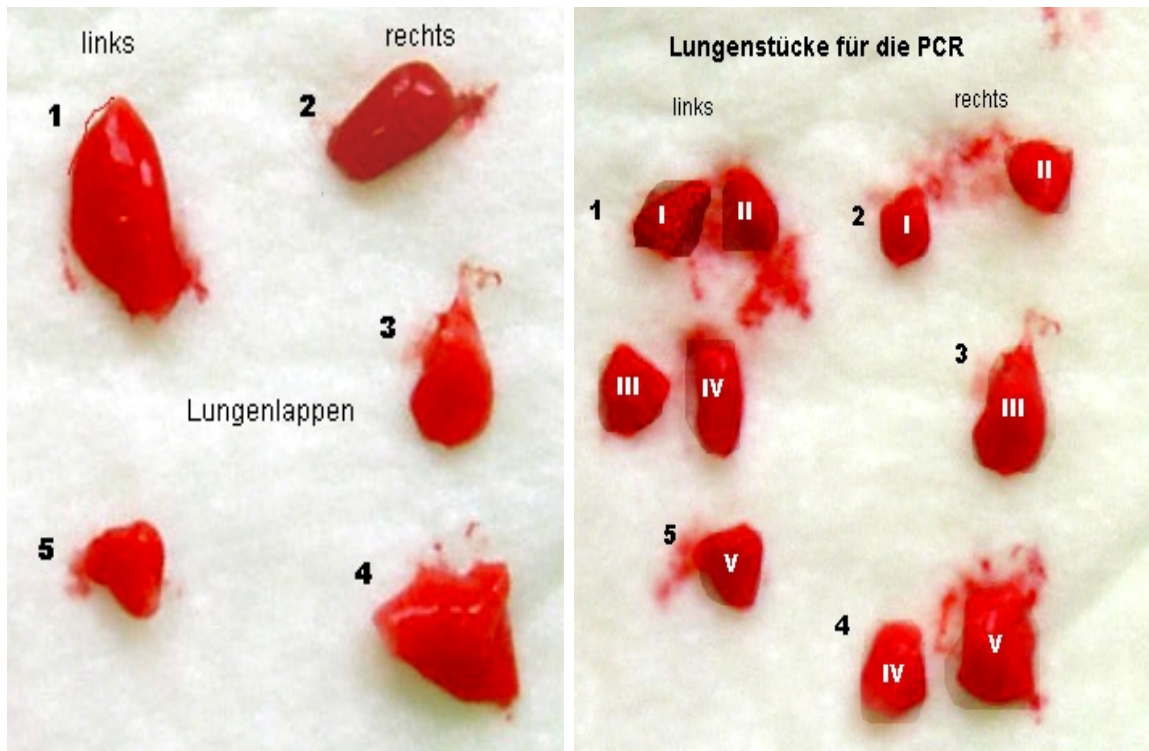
3.2 NACHWEIS DER MCMV-INFEKTION UND AKTIVITÄT VON N₃

Der Nachweis einer MCMV-Infektion sowie der anticytomegaloviralen Wirkung von AZT-Lipid-PFA wurde mit molekularbiologischen Methoden und histologischen Untersuchungen geführt. Für die Histologie, die von PD Dr. Vogel, Institut für Pathologie, Universität Tübingen durchgeführt wurde, sind die Lungen und Nieren von jeweils zwei Mäusen einer Therapiegruppe verwendet worden. Die Virusdetektion erfolgte aus den Lungen von drei Mäusen, die jeweils einer Gruppe entstammten.

3.2.1 AMPLIFIKATION DER TRANSKRIPTIONSPRODUKTE DURCH PCR

Die Expression der MCMV spezifischen Genprodukte wurde in einzelnen Lungenstücken bestimmt. Dazu wurden die entnommenen Lungenhälften entsprechend der Abb. 5B in 10 Teile zerschnitten. Die fünf Lungenlappen wurden vom Herz und Trachea befreit (siehe Abb. 5A), die dann wie in Abb. 5B dargestellt, in die Lungenstücke zerlegt wurden. Der Lungenlappen 1 wurde geviertelt, Lungenlappen 2 und 4 geteilt, während Lungenlappen 3 und 5 als Ganzes belassen wurden. Lungenstücke gleicher römischer Ziffer, wie in Abb. 5B markiert, wurden zu einer Probe in einem 2 ml RNase-freien Eppendorf Cup vereinigt. Hierdurch konnte erreicht werden, dass möglichst in jeder Gewebeprobe Transkriptionsprodukte des MCMVs vorhanden wären.

Zur Identifizierung der MCMV-Genprodukte mit Hilfe der RT-PCR wurden die Lungenstücke zunächst im Homogenisator in eine Suspension überführt und daraus wie zuvor beschrieben die Gesamt-RNA isoliert.



5 (A)

5 (B)

Abb. 5 Darstellung der Lungenlappen einer BALB/c Maus (A). Die fünf Lungenlappen wurden für die RT-PCR in zehn Lungenstücke geteilt, wie in (B) dargestellt.

Durch spektrometrische Bestimmung der Absorptionseinheiten bei 260 nm und 280 nm wurde die Menge und Reinheit der isolierten RNA ermittelt. Der RNA-Gehalt der Proben aus den aufgearbeiteten 380 Lungenstücken lag zwischen 185 und 4900 $\mu\text{g/ml}$. 31 RNA-Isolate, mit einem RNA-Gehalt unter 800 $\mu\text{g/ml}$, wurden nicht weiter verwendet. Durchschnittliche 260/280 Verhältnisse von ca. 1,6 (gemessen in NFW) oder von 2,1 (gemessen in TE Puffer) belegten eine ausreichend hohe Reinheit der isolierten RNA für die anschließende cDNA Synthese (siehe Anhang).

Die in den Proben enthaltene mRNA, in der die Transkriptionsequenzen des MCMV zu vermuten waren, wurden mit Hilfe eines OligodT₍₂₀₎ Primers, der an die Oligo-A-Region am 3'-Ende der mRNA hybridisiert, nach den Angaben aus Schema 2 in die entsprechende cDNA transkribiert.

Anschließend wurden Aliquots der erhaltenen cDNAs mit den MCMV-spezifischen Primern nach den Bedingungen der Tab. 2 in der PCR-Reaktion amplifiziert. Je nach Sequenz des zur Amplifikation verwendeten Primers resultierte ein MCMV-spezifisches DNA-Fragment, das zu einer bestimmten Teilsequenz der aus dem Lungengewebe isolierten mRNA komplementär war.

Tab. 2 Bedingungen der PCR bei der Verwendung der Primer für β -Aktin, ie 1, ie 3, gB

	Temperatur in °C	Zeit in min : sec	Zyklen
Hot Start	94	02:00	
Denaturierung	94	00:30	
Annealing			
a) β -Aktin, ie 1	53	00:30	
b) ie 3	58	00:30	
c) gB	62	00:30	
Polymerisation	72	01:00	
Zyklen			
a) β -Aktin, ie 1, gB			40
b) ie 3			30
Extensionsschritt			
a) β -Aktin, ie 1, gB	72	02:00	
b) ie 3	---	-----	

Schema 2 Reaktionsschritte zur reversen Transkription von mRNA in cDNA

Denaturierung:

mRNA + 1 μ l Oligo(dT)₂₀ + 1 μ l dNTPs

65°C für 5 min



Kühlen auf Eis 5 min



Annealing:

+ 10 μ l „Mastermix“



cDNA Synthese:

50°C für 50 min



Terminale Reaktion:

85°C für 5 min



Kühlen auf Eis 5 min



RNA Verdau:

+ 1 μ l RNase H



37°C für 20 min



cDNA der mRNA

3.2.1.1 AMPLIFIKATION DES β -AKTIN GENPRODUKTS DER MAUS

Zunächst wurde von einem Aliquot der cDNA mit dem β -Aktin Primer ein DNA-Fragment aus der β -Aktin Region des Mausgenoms amplifiziert. β -Aktin wird hierbei als Referenzgen, so genanntes House-keeping-Gen, eingesetzt. Die ubiquitäre Expression wird nicht durch experimentelle Faktoren bei der Transkription beeinflusst. Das nach der PCR erhaltene Reaktionsgemisch konnte durch Elektrophorese in einem Agarosegel in DNA-Fragmente unterschiedlicher Kettenlänge aufgetrennt werden. Durch die Anwesenheit von Ethidiumbromid fluoreszieren die DNA-Fragmente unter UV-Licht. Beim Vergleich mit fluoreszierenden Molekulargewichtsmarkern, die im Agarosegel als Referenzgemisch mit aufgetragen wurden, kann die Kettenlänge der fluoreszierenden, amplifizierten DNA-Fragmente ermittelt und somit das β -Aktin Gen auf der Basis seiner Kettenlänge indirekt nachgewiesen werden. Durch das Auftreten des β -Aktin Gens wurde die erfolgreiche Transkription der mRNA in cDNA dokumentiert. Auf der Basis der β -Aktin Bandenintensität ließ sich halbquantitativ die relative Menge der amplifizierten MCMV-Gene IE 1, IE 3 und gB mit Hilfe der AIDA Software ermitteln.

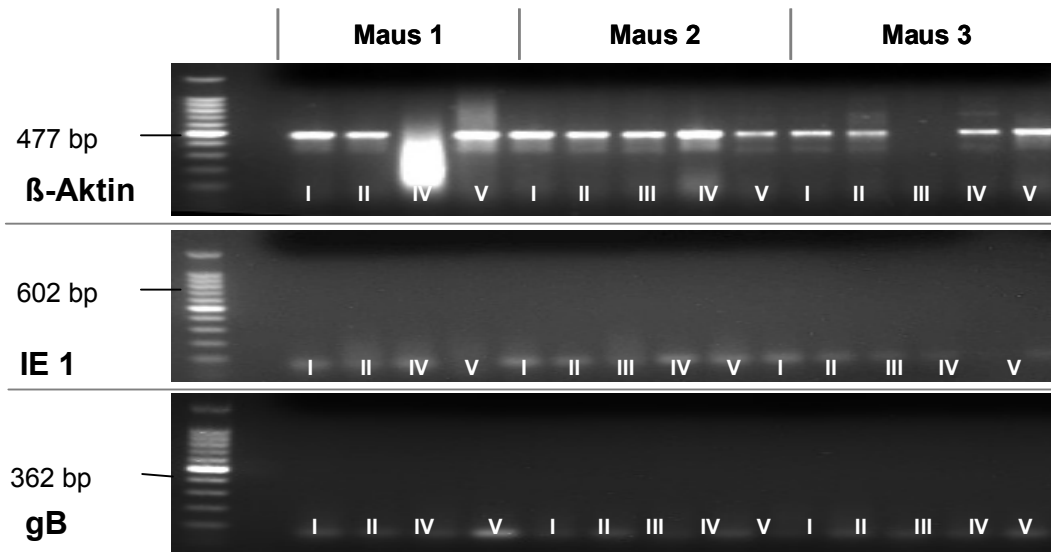
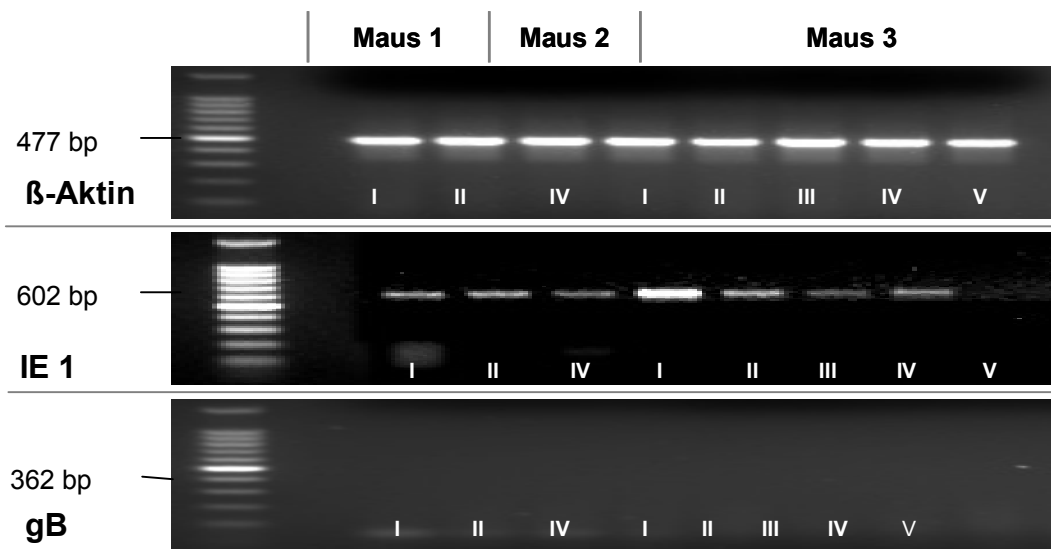
3.2.1.2 AMPLIFIKATION DER IE 1, IE 3 UND gB GENPRODUKTE DES MCMV

Die aus den verschiedenen Lungenabschnitten erhaltenen cDNAs wurden anschließend zur weiteren Identifikation von MCMV-Transkriptionsprodukten wie folgt amplifiziert. Dem jeweiligen cDNA-Pool einer Gewebeprobe wurden zunächst drei entsprechende Aliquots entnommen. Das eine wurde mit dem Primer für die ie 1-MCMV-, das andere mit dem Primer für die ie 3-MCMV- und das dritte mit dem Primer für die gB-MCMV-Genregion versetzt. Nach Hinzufügen von Platinum® zu den Proben, wurden die Ansätze nach den Angaben der Tab. 2 behandelt und jeweils einzeln in 1,5 % Agarosegelen aufgetrennt.

3.2.2 IDENTIFIZIERUNG DER TRANSKRIPTIONSPRODUKTE DURCH ELEKTROPHORESE IM AGAROSEGEL

Wie bereits zuvor beschrieben, belegen die auftretenden Banden der Amplifikationsprodukte IE 1 und IE 3, dass eine Virusinfektion erfolgt ist. Eine gB Bande, die nur bei der Replikation des Virus auftritt, zeigt eine aktive Virusvermehrung im Lungengewebe der Maus an. Damit spiegelt das Expressionsmuster der entsprechenden MCMV-Genprodukte den Verlauf der MCMV-Infektion wieder und lässt Rückschlüsse auf die antivirale Wirkung von AZT-Lipid-PFA im Verlauf der Medikation zu.

Die 22 Lungenstücke der Mäuse an Tag 1 p.i., die von jeweils drei Mäusen der Kontroll- und Infektionsgruppe gewonnen wurden, zeigten, dass die Kontrollgruppe erwartungsgemäß keine MCMV-Genprodukte aufwies (Abb. 6A). In der Infektionsgruppe (Abb.6B) wurden nur IE 1 aber keine gB Transkriptionsprodukte gefunden, so dass eine Primärinfektion an Tag 1 p.i. zwar erfolgte (IE 1 positiv), das Virus allerdings noch nicht repliziert wurde (gB negativ). Hierdurch konnte auf die zusätzliche Identifizierung von IE 3 verzichtet werden.

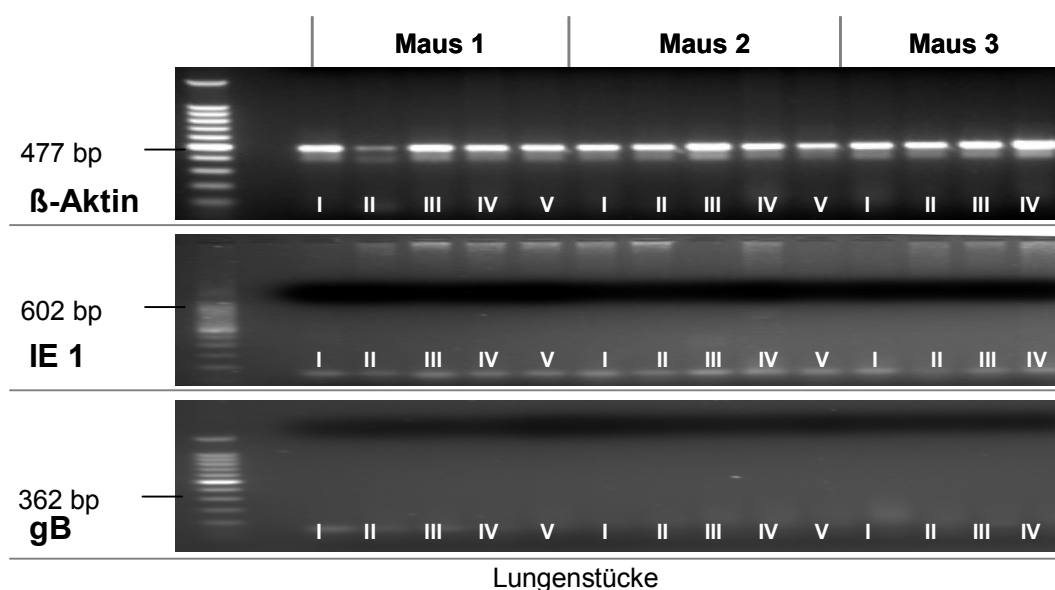
6A) TAG 1 KONTROLLGRUPPE (PBS/PBS)**6B) TAG 1 INFektionsGRUPPE (MCMV/PBS)**

Lungenstücke

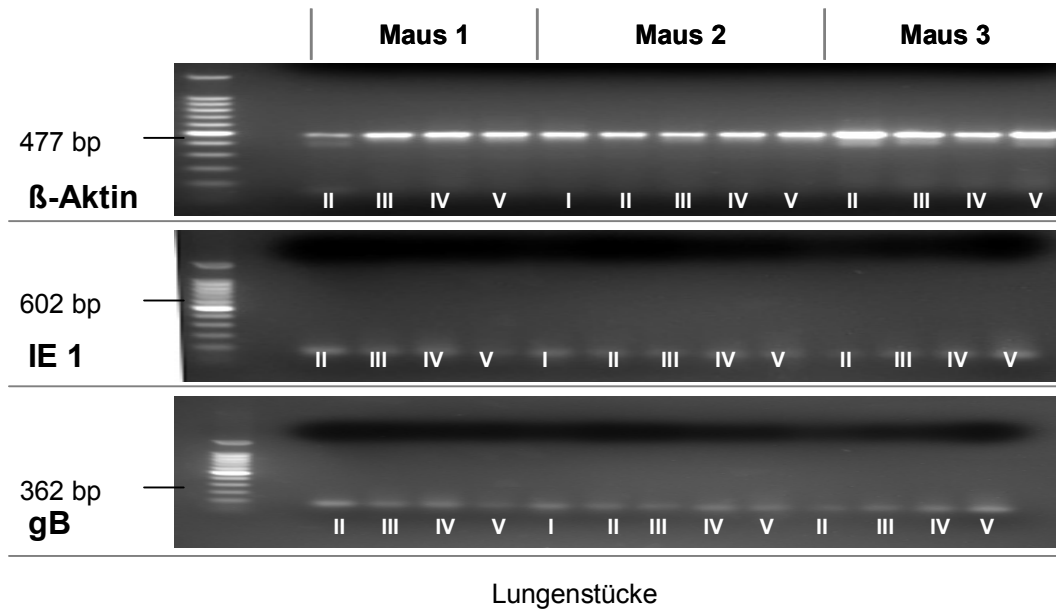
Abb. 6 Gelchromatogramme der Genprodukte IE 1 und gB, die mit Hilfe der RT-PCR aus dem Lungengewebe von unterschiedlich behandelten BALB/c Mäusen **am Tag 1 p.i.** gewonnen wurden. A) Jeweils drei Tiere entstammten der Gruppe, die mit PBS/PBS (Kontrollgruppe) und B) drei weitere Tiere gehörten der Gruppe an, die i.n. mit (2×10^4 PFU) MCMV infiziert wurden, MCMV/PBS (Infektionsgruppe).

An Tag 5 p.i. wurden 52 Lungenproben untersucht, die aus zwei Mäusen der Infektionsgruppe und aus jeweils drei Mäusen der Kontroll-, Wirkstoff- und Therapiegruppe stammten. In der cDNA der Kontroll- und Wirkstoffgruppe (Abb. 7A,B) befanden sich erwartungsgemäß keine MCMV-Gene. Dagegen wurden in der Therapiegruppe (Abb. 7C) bei allen drei Mäusen IE 1 und gB und in den Mäusen 1 und 2 zusätzlich auch IE 3 gefunden. Bei Maus 1 der Infektionsgruppe wurden alle drei Genprodukte identifiziert, bei Maus 2 dieser Gruppe allerdings nur die Genprodukte IE 1 und gB (Abb. 7D). Die Amplifikation der cDNA mit den drei Primern war nur bei einigen Proben nachzuweisen, obwohl in allen 11 Gewebeproben die β -Aktin Bande auftrat. Hinzu kam, dass die Amplifikation in parallel laufenden Reaktionsansätzen durchgeführt wurde, und die eingesetzten DNA-Aliquots aus den gleichen Pools der cDNAs stammten. Die Untersuchungen der Lungenproben am Tag 5 p.i. ergaben, dass spätestens am Tag 5 eine Infektion (IE 1 und IE 3 Genprodukte) mit auftretender Virusreplikation (gB Genprodukte) in der Lunge vorhanden war. Außerdem zeigten die Untersuchungen, dass eine i.p. Medikation mit dem antiviralen Multiplex-Wirkstoff AZT-Lipid-PFA bis zu diesem Zeitpunkt weder die Infektion noch die Virusreplikation verhinderte.

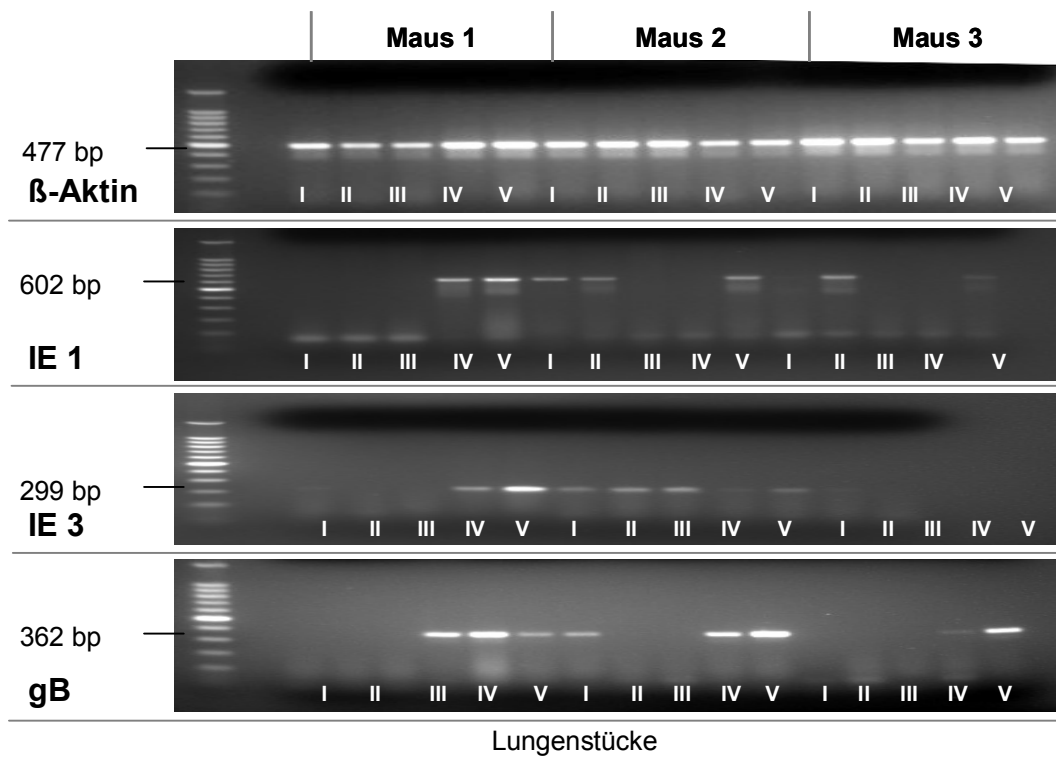
7A) TAG 5 KONTROLLGRUPPE (PBS/PBS)



7B) TAG 5 WIRKSTOFFGRUPPE (PBS/N₃)



7C) TAG 5 THERAPIEGRUPPE (MCMV/N₃)



7D) TAG 5 INFEKTIONSGRUPPE (MCMV/PBS)

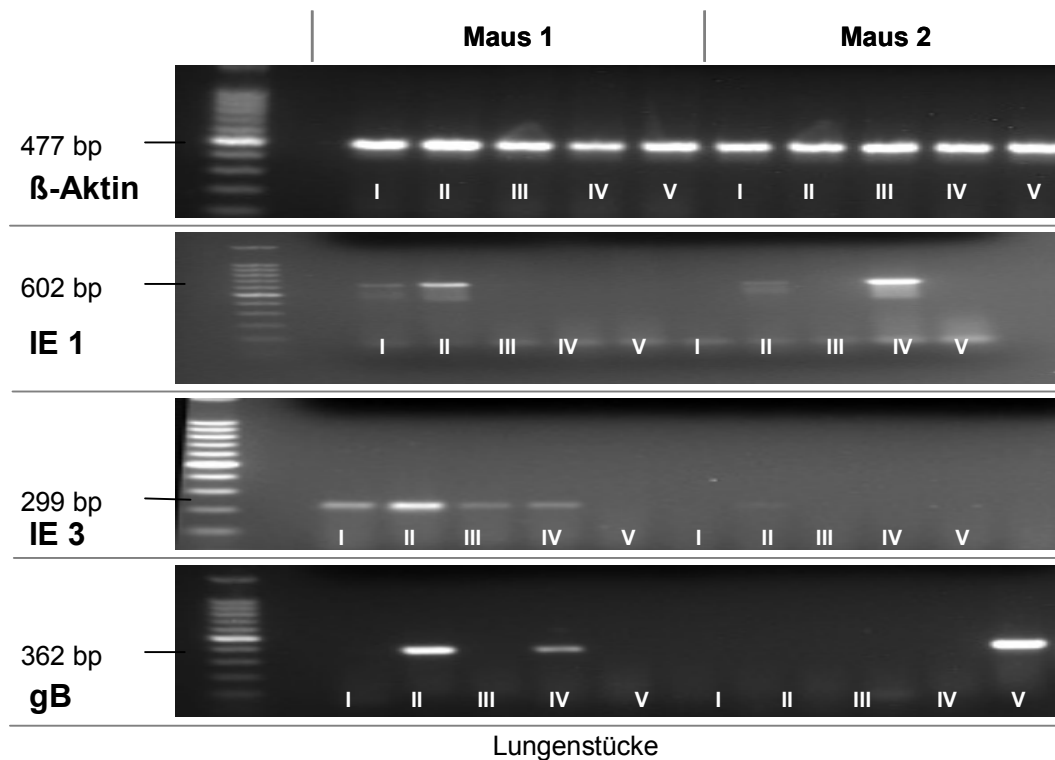
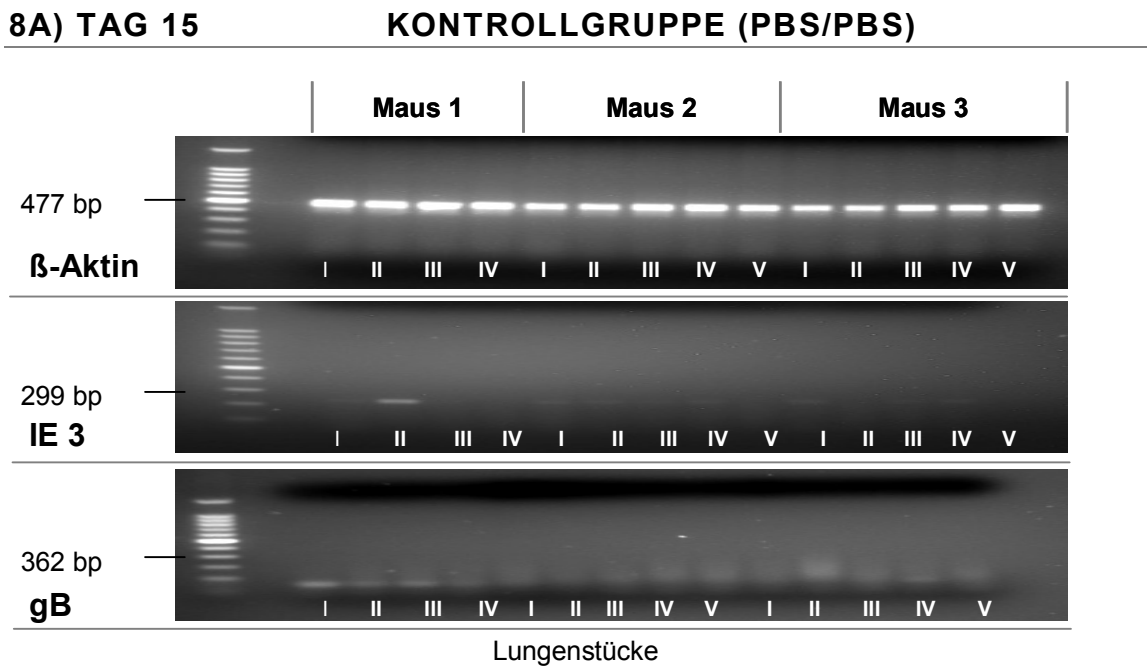


Abb. 7 Gelchromatogramme der Genprodukte β -Aktin IE 1, IE 3 und gB, die mit Hilfe der RT-PCR aus mRNA des Lungengewebes von unterschiedlich behandelten BALB/c Mäusen am **Tag 5 p.i.** gewonnen wurden. 2 Gruppen mit jeweils 3 Mäusen werden A) mit PBS/PBS (Kontrollgruppe) B) mit PBS/N₃ (Wirkstoffgruppe) p.i. behandelt. 2 weitere Gruppen wurden i.n. mit (2×10^4 PFU) MCMV infizierten und erhielten i.p. C) MCMV/N₃ (Therapiegruppe) oder D) MCMV/PBS (Infektionsgruppe).

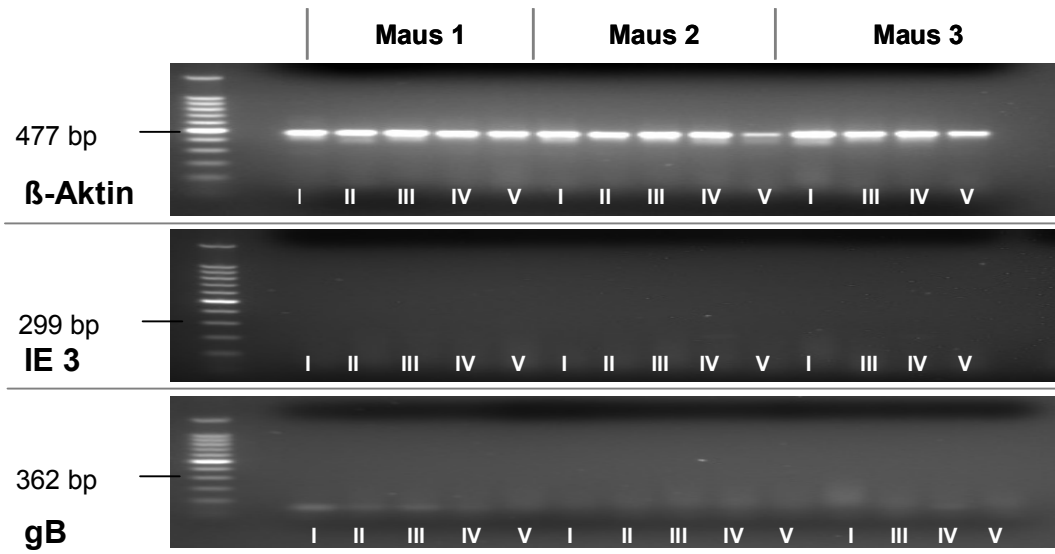
15 Tage nach Infektion wurde wiederum im Lungengewebe der vier entsprechenden Gruppen (Kontroll-, Wirkstoff-, Therapie- und Infektionsgruppe) die Expression der MCMV-Gene IE 1, IE 3, gB untersucht. Wie Abb. 8A,B zeigt, enthielten die Mäuse aus der Kontroll- und Wirkstoffgruppe in 30 untersuchten Lungengewebsproben erwartungsgemäß keine Transkriptionsprodukte des MCMV, wobei allerdings nur nach IE 3 und gB Amplifikationsprodukten gesucht wurde. Beim Lungengewebe der drei Mäuse aus der Therapiegruppe (Abb. 8C) wies das Lungengewebe von Maus 3 eine IE 1 und IE 3 Bande auf, während im Gewebe aus Maus 1 nur eine IE 3 Bande nachgewiesen wurde. Keine Probe aus der Therapiegruppe zeigte eine gB Bande. Die fehlenden gB Banden bei

gleichzeitiger Anwesenheit von IE 1 und IE 3 Banden zeigten, dass in der Therapiegruppe durch die Medikation mit N₃ die Virusreplikation unterbunden wurde, das Virus aber latent vorhanden blieb. Bei den drei Mäusen der Infektionsgruppe (Abb. 8D) wurde in den 13 untersuchten Gewebeproben auch nach Doppelbestimmung keine IE 1 sondern nur schwache IE 3 Genbanden identifiziert, obwohl im Lungengewebe der Mäuse 1 und 3 vier eindeutige gB Banden auftraten. Die identifizierten IE 3 und gB-Banden zeigten, dass in zwei Mäusen an Tag 15 eine MCMV-Replikation stattfand.



8B) TAG 15

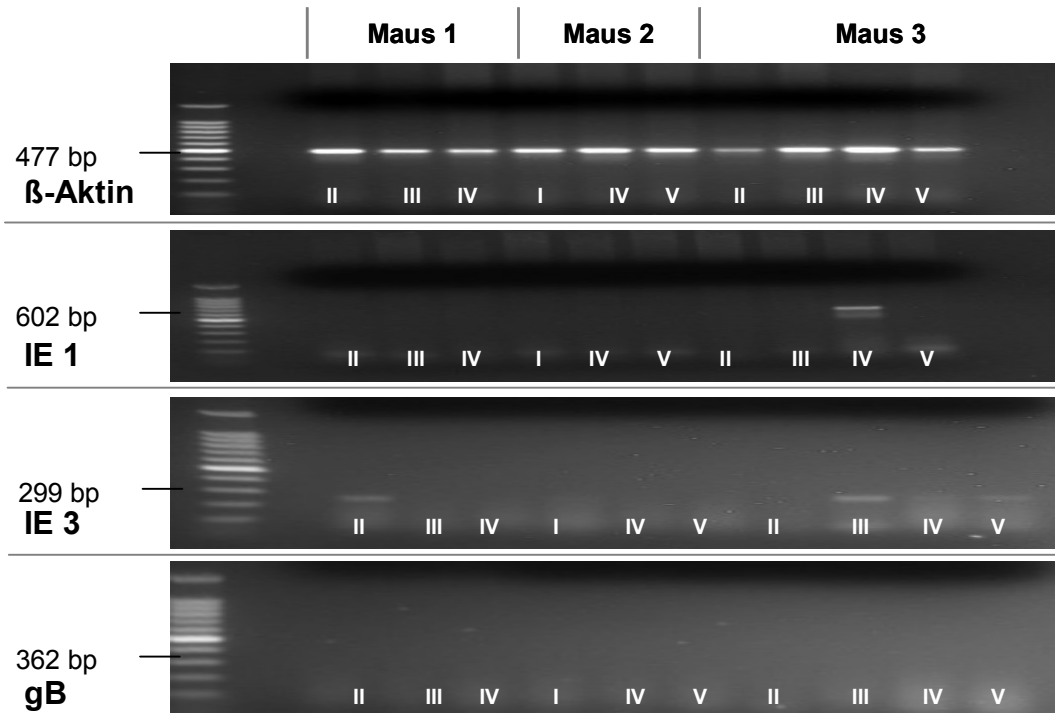
WIRKSTOFFGRUPPE (PBS/N₃)



Lungenstücke

8C) TAG 15

THERAPIEGRUPPE (MCMV/N₃)



Lungenstücke

8D) TAG 15

INFEKTIONSGRUPPE (MCMV/PBS)

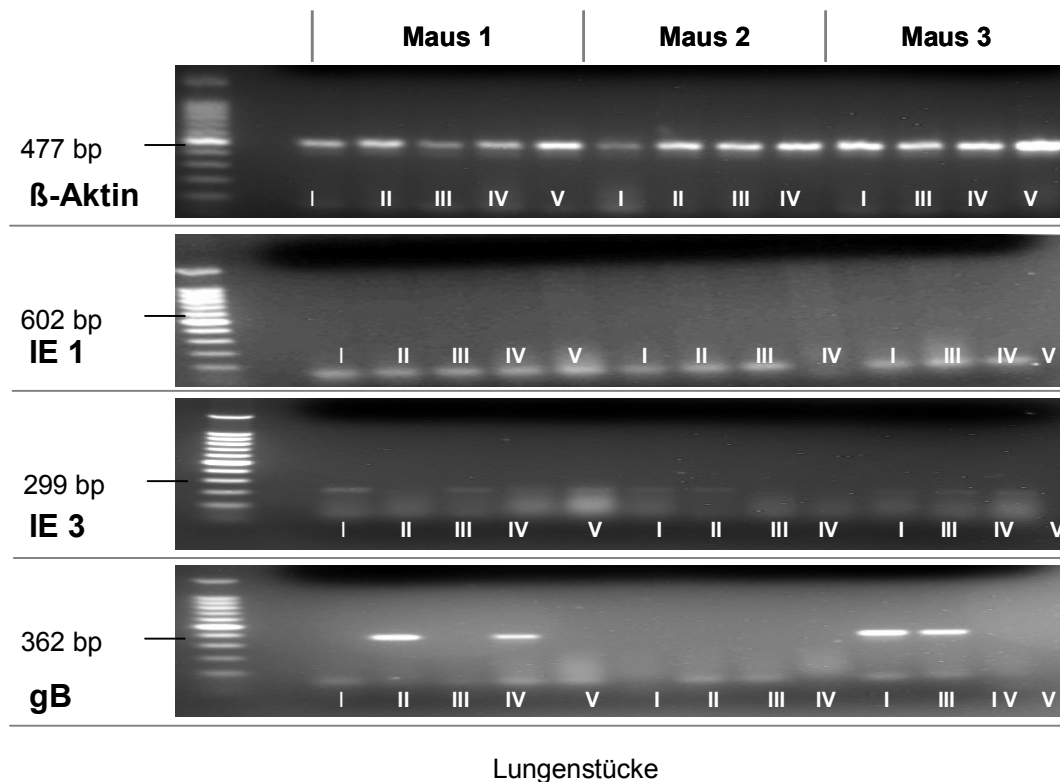


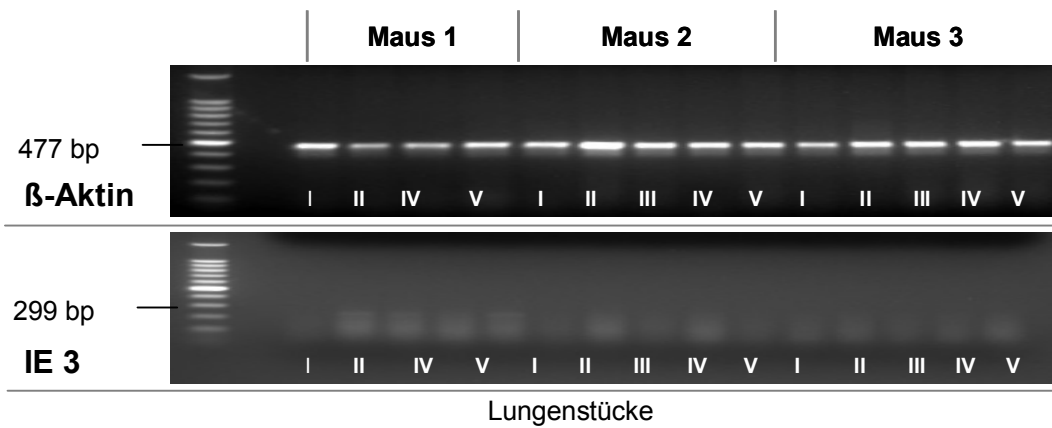
Abb. 8 Gelchromatogramme der Genprodukte β -Aktin, IE 1, IE 3 und gB, die aus der mRNA des Lungengewebes von unterschiedlich behandelten BALB/c Mäusen an **Tag 15 p.i.** erhalten wurden. Die Behandlung der Mäuse erfolgte nach den Angaben der Abb. 4.

Am Tag 22 p.i. enthielten die Lungenabschnitte folgende MCMV-Genprodukte. Bei jeweils drei Mäusen der Kontroll- und Wirkstoffgruppe trat erwartungsgemäß außer β -Aktin kein Genprodukt in den untersuchten Lungengewebeproben auf (siehe Abb. 9A,B). In den 14 Proben der drei Mäuse aus der Therapiegruppe (Abb. 9C) wurde auch nach einer Doppelbestimmung weder das IE 1 noch das IE 3 Genprodukt gefunden. Ein schwach auftretendes gB Genprodukt wurde dagegen in jeweils einer Probe der drei Mäuse identifiziert. Von den 15 Lungengewebeproben der drei Mäuse aus der Infektionsgruppe (Abb. 9D) wiesen 6 Proben das IE 3 Genprodukt auf, wovon zwei in Maus 1 und vier in Maus 3 gefunden wurden. Außerdem wurden

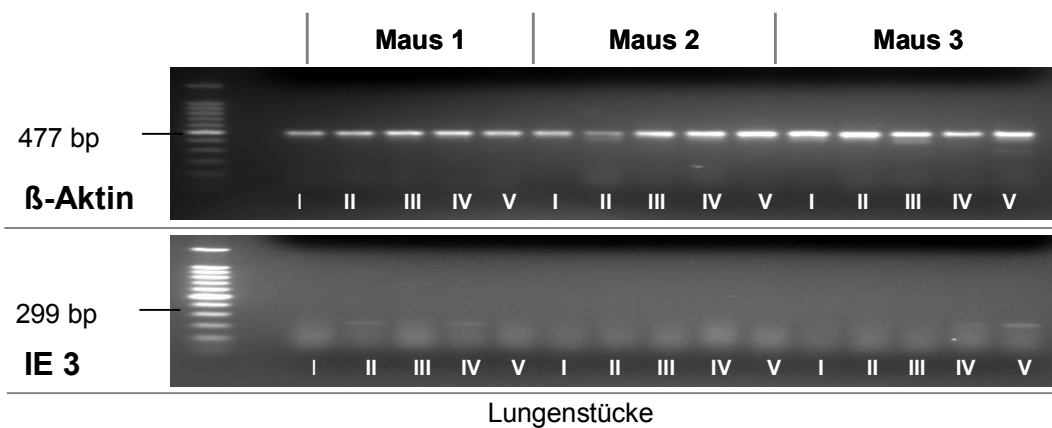
schwach auftretende gB Banden in zwei Proben aus Maus 2 und in drei Proben aus Maus 3 identifiziert.

Die Ergebnisse zeigten, dass am Tag 22 p.i. die MCMV-Replikation sowohl in der Therapie- als auch Infektionsgruppe stattfand. Hieraus konnte gefolgert werden, dass der antivirale Wirkstoff N₃ drei Tage nach der letzten i.p. Applikation, die Therapie war am Tag 19 beendet, die MCMV-Replikation allenfalls abschwächte, aber nicht soweit hemmen konnte, dass sie nicht mehr nachweisbar war.

9A) TAG 22 KONTROLLGRUPPE (PBS/PBS)

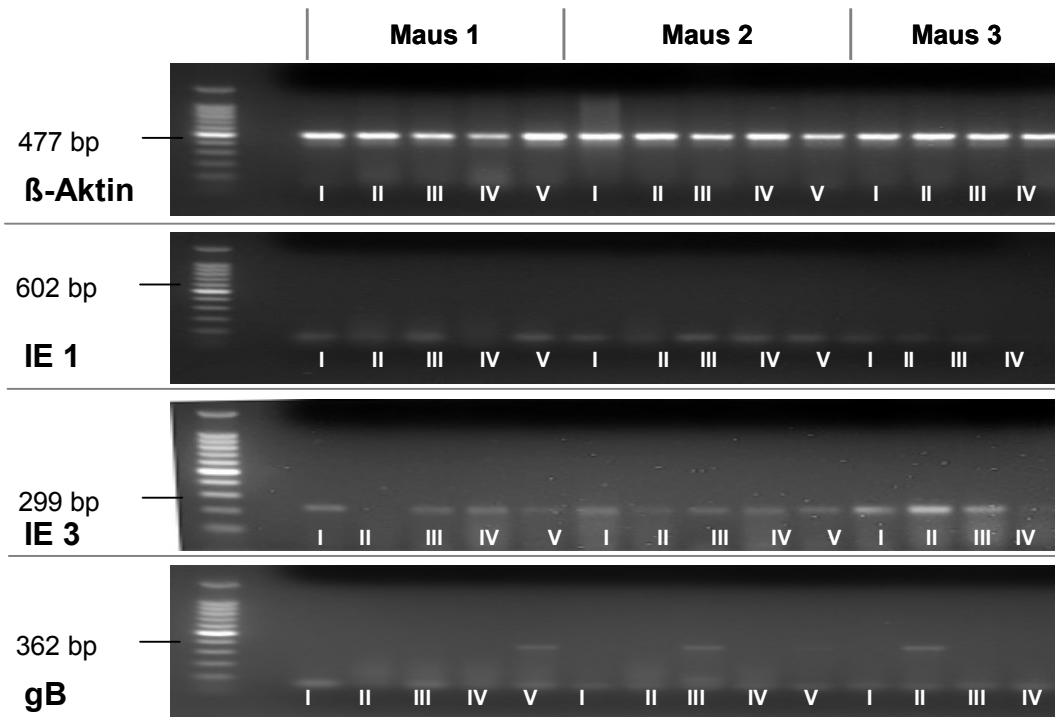


9B) TAG 22 WIRKSTOFFGRUPPE (PBS/N₃)



9C) TAG 22

THERAPIEGRUPPE (MCMV/N₃)



Lungenstücke

9D) TAG 22

INFEKTIONSGRUPPE (MCMV/PBS)

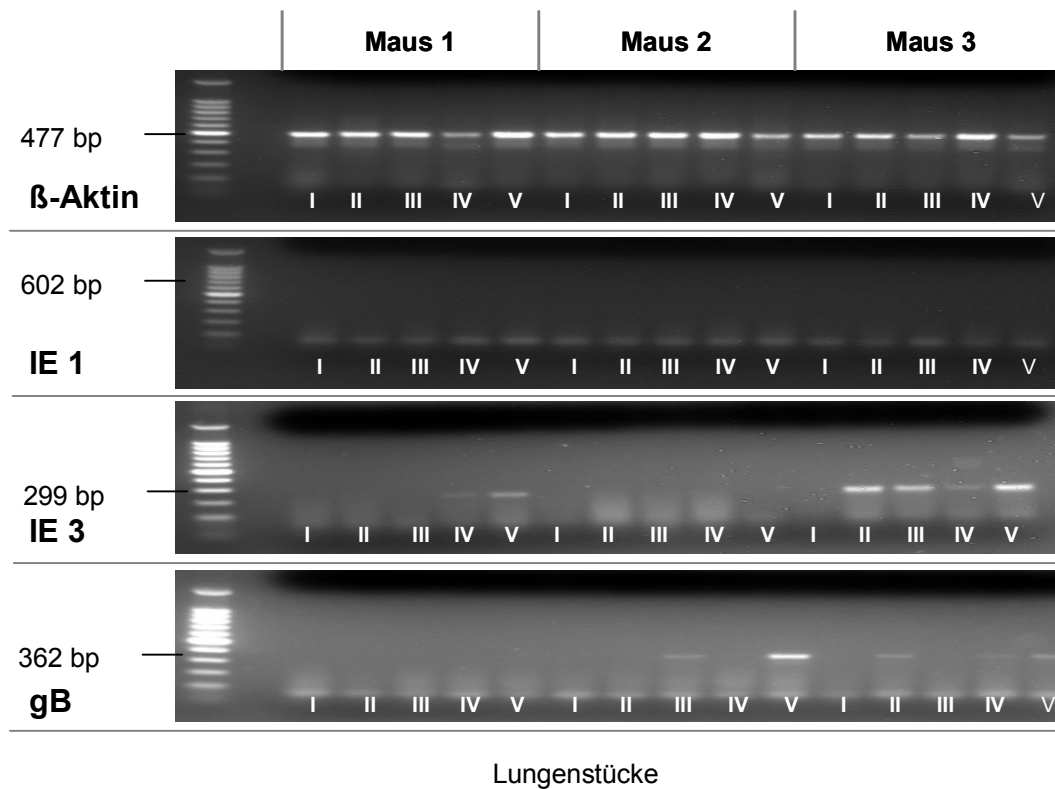
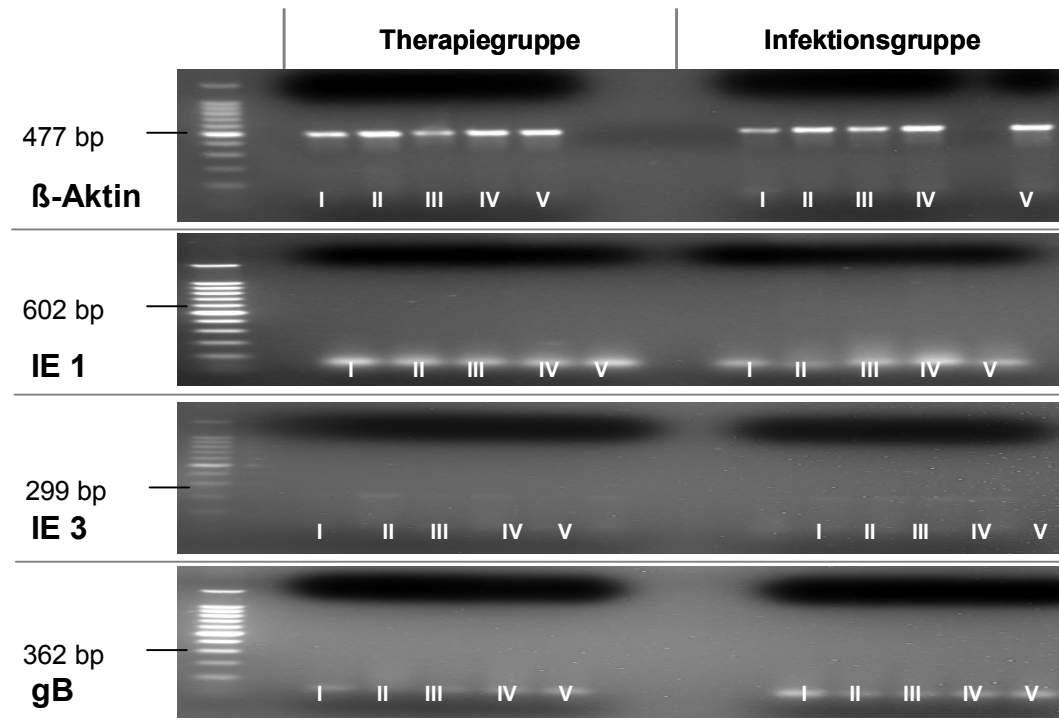


Abb. 9 Gelchromatogramme der Genprodukte IE 1, IE 3 und gB, die mit Hilfe der RT-PCR aus mRNA des Lungengewebes von unterschiedlich behandelten BALB/c Mäusen **an Tag 22 p.i.** gewonnen wurden. Die Behandlung der Mäuse erfolgte nach den Angaben der Abb.4.

Bei der Untersuchung von Lungenproben der Mäuse von Tag 29 waren weder in der Infektions- noch in der Therapiegruppe MCMV-Gene nachweisbar, wie den Gelen der Abb. 10 zu entnehmen ist.

10A) TAG 29

MAUS 1



Lungenstücke

10B) TAG 29

MAUS 2

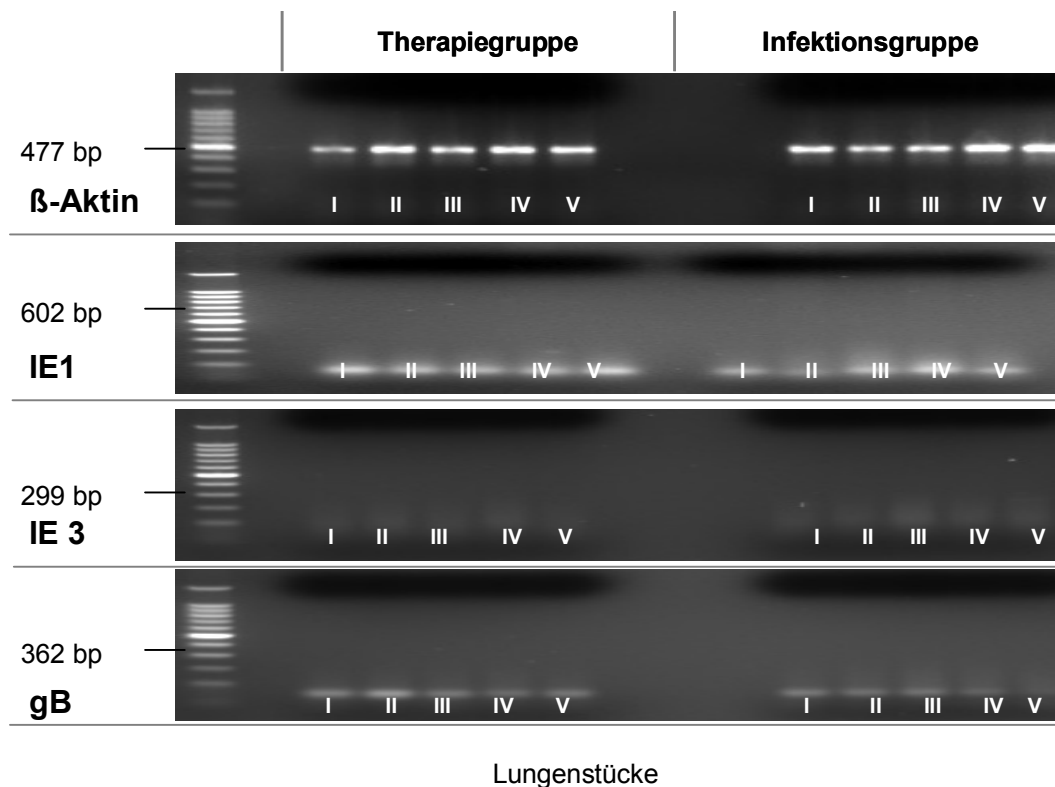


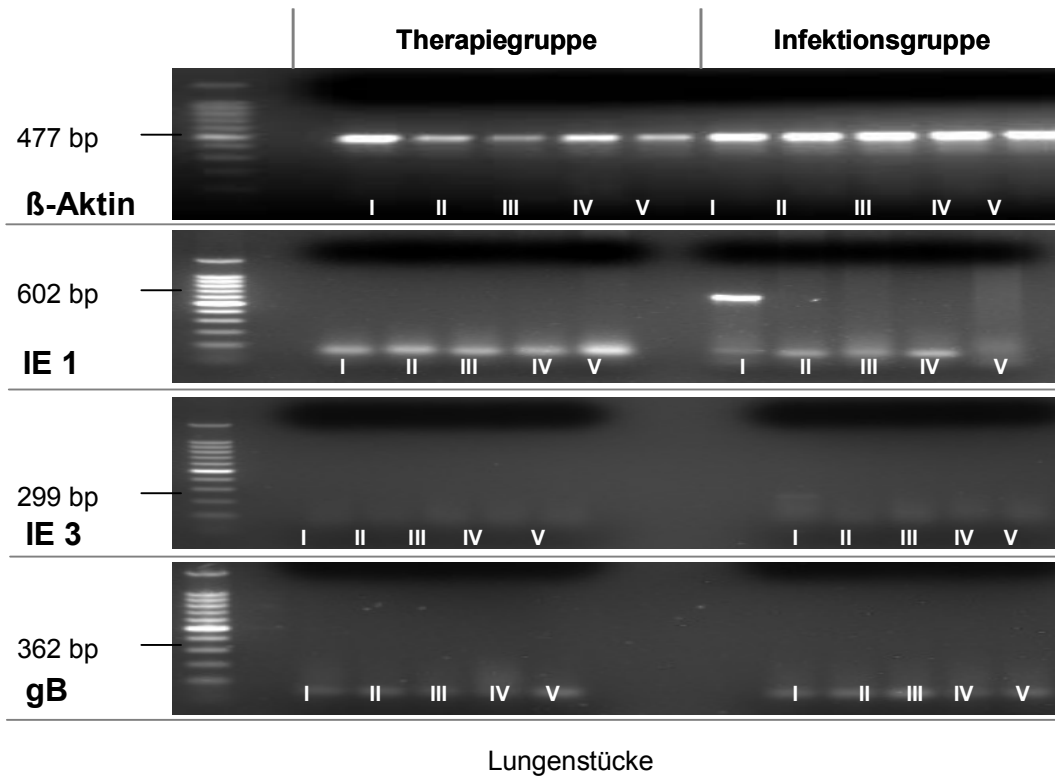
Abb. 10 Gelchromatogramme der Genprodukte IE 1, IE 3 und gB, die mit Hilfe der RT-PCR aus mRNA des Lungengewebes von unterschiedlich behandelten BALB/c Mäusen an **Tag 29 p.i.** gewonnen wurden. Die Behandlung der Mäuse erfolgte nach den Angaben der Abb. 4.

Am Tag 36 (siehe Abb.11A) trat nur in der Infektionsgruppe bei Maus 1 in dem Lungenabschnitt I eine sehr starke IE 1 Bande auf, was für eine Latenz des Virus in dieser Lungenregion spricht.

Am Tag 43 war in Maus 2 aus der Infektionsgruppe in dem Lungenabschnitt IV eine gB Bande detektierbar, während IE 3 und IE 1 Banden nicht gefunden wurden.

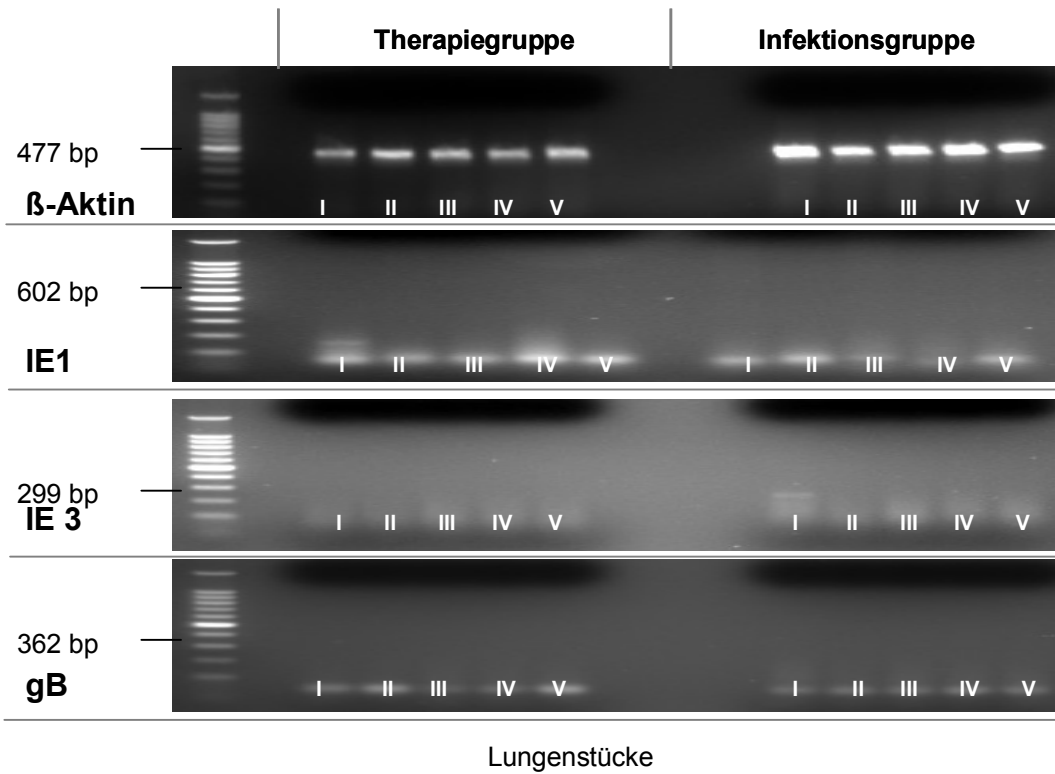
11A) TAG 36

MAUS 1



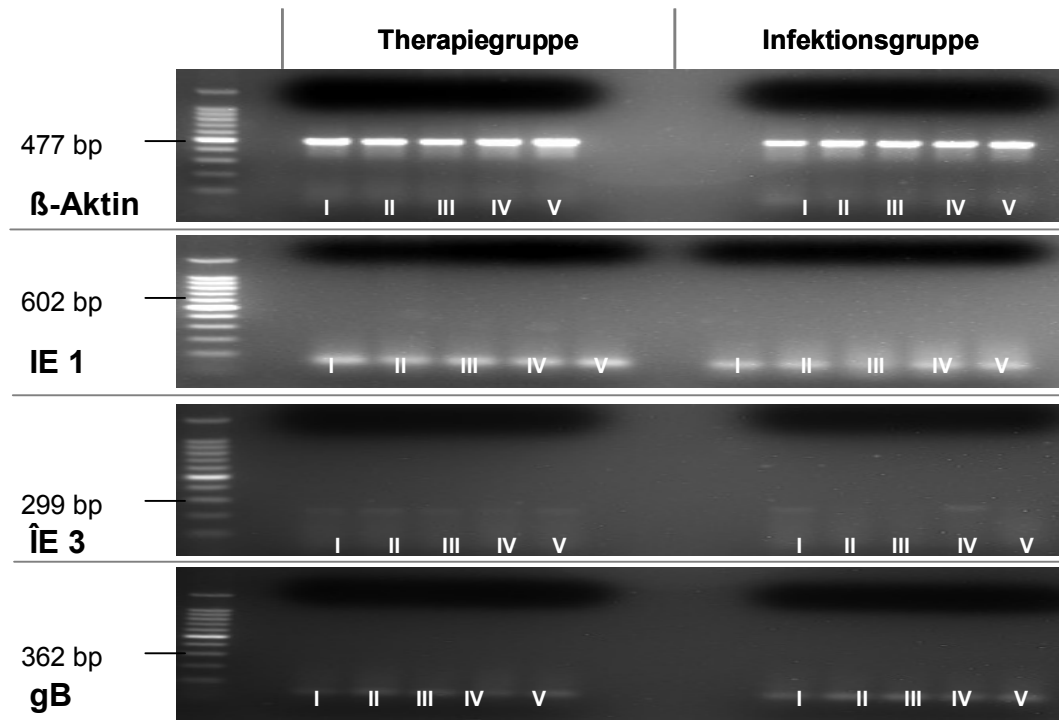
11B) TAG 36

MAUS 2



11C) TAG 43

MAUS 1



Lungenstücke

11D) TAG 43

MAUS 2

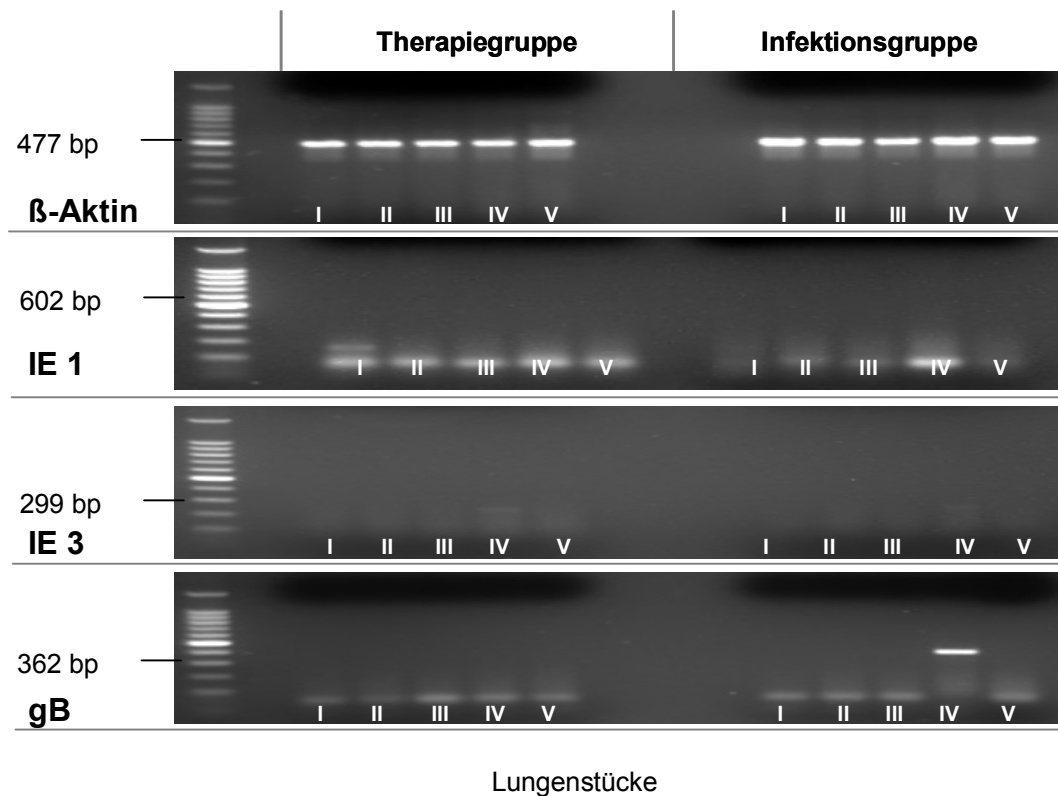
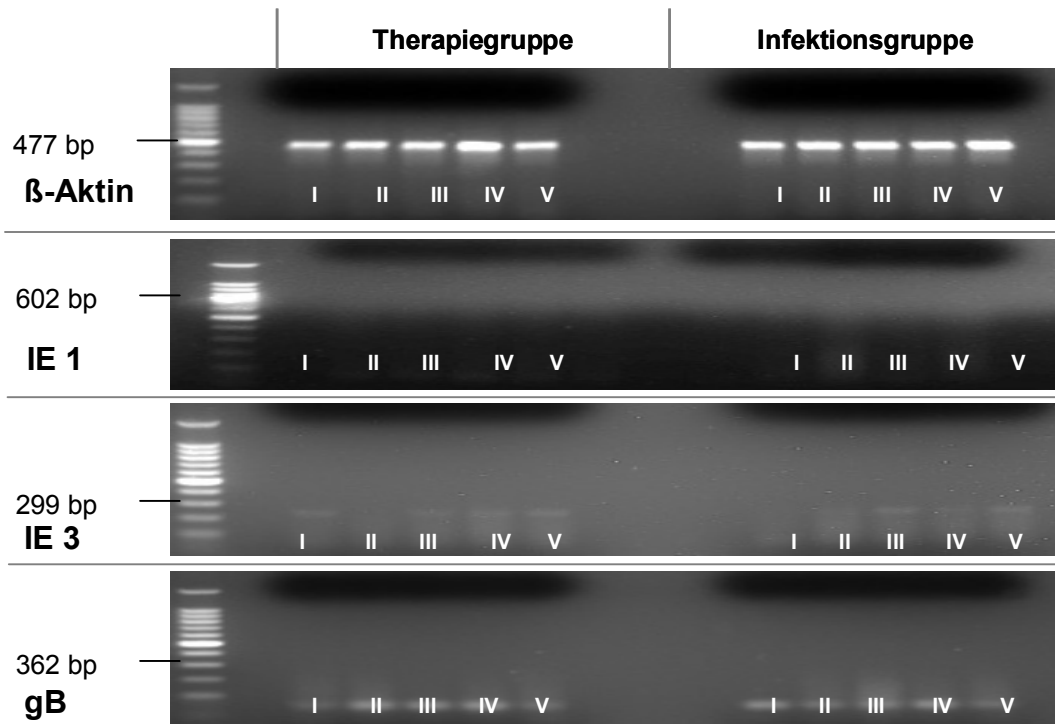


Abb. 11 Gelchromatogramme der Genprodukte IE 1, IE 3 und gB, die mit Hilfe der RT-PCR aus mRNA des Lungengewebes von unterschiedlich behandelten BALB/c Mäusen **an Tag 36** (Abb. 11A,B) **und 43 p.i.** (Abb. 11C,D) gewonnen wurden. Die Behandlung der Mäuse erfolgte analog zu den Angaben der Abb. 4.

Am letzten Zeitpunkt der Versuchsserie, Tag 50 p.i., wurde, wie das Gel der Abb. 12B zeigt, im Lungengewebe von Maus 2 aus der Infektionsgruppe im Lungenabschnitt I eine schwache IE 1 Bande gefunden, während in der Therapiegruppe keine MCMV-Genprodukte nachweisbar waren.

12A) TAG 50

MAUS 1



Lungenstücke

12B) TAG 50

MAUS 2

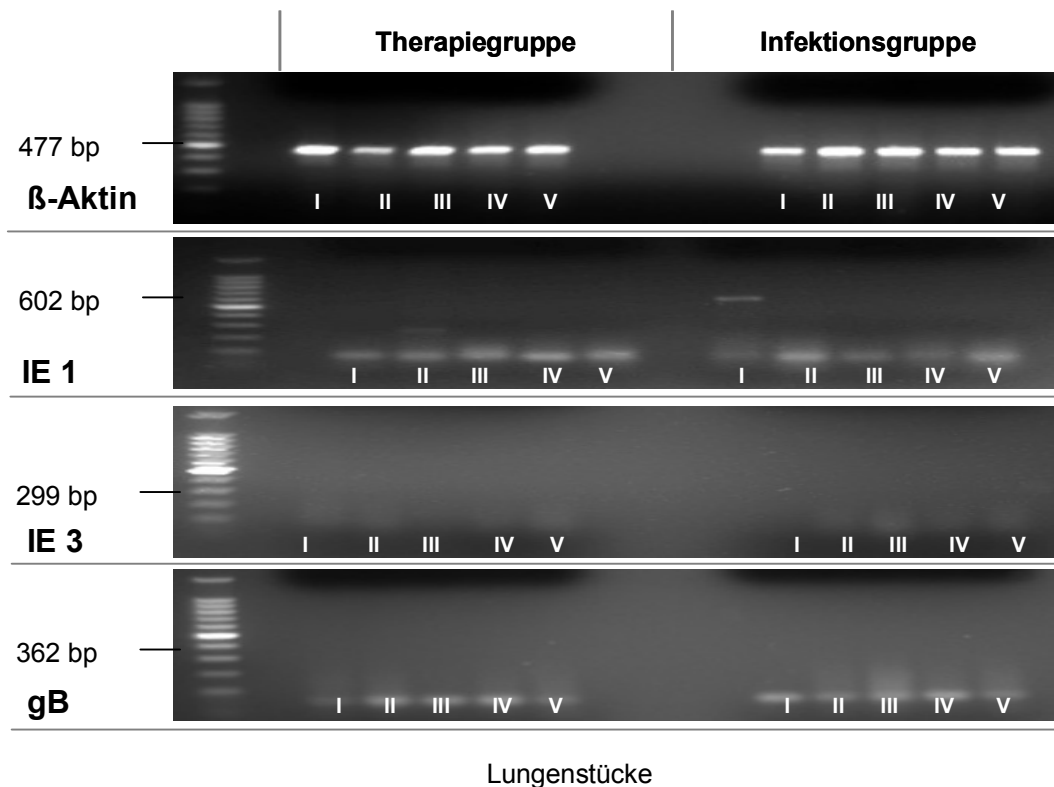


Abb. 12 Gelchromatogramme der Genprodukte IE 1, IE 3 und gB, die mit Hilfe der RT-PCR aus mRNA des Lungengewebes von unterschiedlich behandelten BALB/c Mäusen an **Tag 50 p.i.** gewonnen wurden. Die Behandlung der Mäuse erfolgte analog zu den Angaben der Abb. 4.

3.2.3 KONZENTRATIONSERMITTLUNG DER TRANSKRIPTIONSPRODUKTE

Die relative Intensitätsdichte der Gelbanden von IE 1, IE 3 und gB wurden bezogen auf die als Standard gesetzte β -Aktinbande mit Hilfe der AIDA Software berechnet, wobei Areal/Integral in QL/mm² kalkuliert wurde. Bei der Auswertung der Gele von Tag 5, 15, 22 wurden die in Tab. 3, 4 aufgeführten Werte erhalten.

Tab. 3 Prozentuale Intensität der Gelbanden aus Abb. 7 - 9 bezogen auf β -Aktin. Die Banden entsprechen den Genprodukten, die aus dem Lungengewebe der mit MCMV-infizierten (I) und der infizierten aber mit N_3 therapierten Mäuse (T) an den Tagen 5, 15, 22 p.i. erhalten wurden.

Tag p.i.	Maus Nr.	Gruppe	Relative Intensität zu β -Aktin in %		
			IE 1	IE 3	gB
5	1	T	46,3	61,1	82,1
		I	25,7	61,8	43,7
	2	T	43,6	51,7	72,4
		I	36,6	44,1	34
	3	T	34,9	33,3	53,7
		I	-	-	-
15	1	T	25,3	25,6	22,1
		I	10,5	37,7	52,6
	2	T	34,9	30,3	31,5
		I	10,9	33,2	39,8
	3	T	27,1	23,5	30,5
		I	10,6	35,1	60,2
22	1	T	46,7	22,3	41,7
		I	30,8	34,5	66,1
	2	T	45,3	23,5	41,0
		I	29,34	36,6	73,8
	3	T	42,9	23,8	38,4
		I	34,0	61,7	80,6

Tab. 4 Mittelwerte der prozentualen auf β -Aktin bezogenen Genexpressionsprodukte an den Tagen 5, 15, 22 p.i., die in Tab. 3 aufgeführt sind.

Tag p.i.	Genprodukte	Gemittelter Prozentanteil der Genprodukte		p
		Therapiegruppe	Infektionsgruppe	
5	IE 1	41,6	31,2	< 0,05
	IE 3	48,7	53,0	> 0,05
	gB	69,4	38,9	< 0,005
15	IE 1	29,1	10,7	< 0,001
	IE 3	26,4	35,4	< 0,001
	gB	28,0	50,8	< 0,001
22	IE 1	45,0	31,4	< 0,001
	IE 3	23,3	44,3	< 0,005
	gB	40,4	73,5	< 0,001

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Statistikprogramm SPSS 14 für Windows von SPSS Inc. Zur Kontrolle der Varianzgleichheit wurde zuerst ein Levenetest durchgeführt, der bei allen Ergebnissen eine Varianzgleichheit ergab. Weiter wurde die Signifikanz mittels studentischem T-Test bei Normalverteilung berechnet. Die Signifikanz kann in folgender Abstufung ausgedrückt werden. $p < 0,001$: hoch signifikant, $p < 0,01$ signifikant, $p < 0,05$ schwach signifikant und $p > 0,05$ nicht signifikant. Der Vergleich der Genexpression in der Therapie- und Infektionsgruppe ergab an Tag 5 p.i. bei der Expression des gB Gens signifikante Ergebnisse. An Tag 15 p.i. wurde bei allen drei Genprodukten hoch signifikante Werte gefunden, wobei die prozentualen Anteile an Tag 22 p.i bei IE 1 und gB hoch signifikant und bei IE 3 signifikant ermittelt wurden. So können die Resultate bis auf die Werte von Tag 5 IE 1 und IE 3 als bedeutsam deklariert werden (Abb. 13). Diese Ergebnisse wurden durch die Berechnung des Wilcox-Test mit Hilfe der Software Jump

durch Herrn Eichner, Institut für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen gesichert.

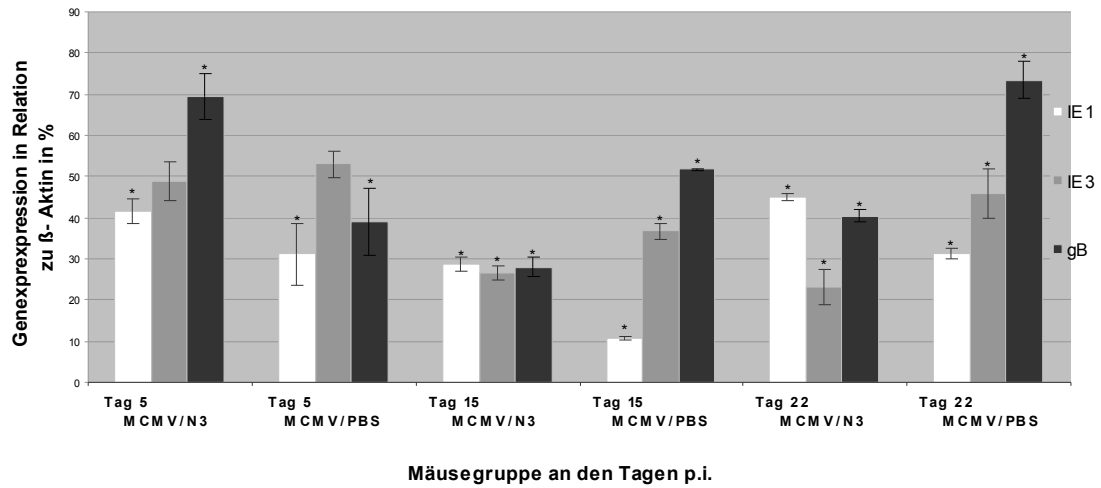


Abb. 13 Semiquantitative Auswertung der Gelchromatogramme und Angaben zur Signifikanz, die mit Hilfe des studentischen T-Tests bei Normalverteilung berechnet wurde.

3.3 KONTROLLE DES ALLGEMEINZUSTANDES DER MÄUSE DURCH GEWICHTSBESTIMMUNG UND HISTOLOGIE

Die Körpergewichtskontrolle im Verlauf einer Therapie kann bekanntlich indirekt Auskunft über den Krankheitsverlauf und die Nebenwirkungen eines Arzneimittels geben. Aus diesem Grund wurden die Tiere im Verlauf der Versuchsreihe gewogen. Ab Tag 9 p.i. traten Gewichtsänderungen auf. Wie Abb. 14 zeigt, verzeichneten alle Mäuse im Verlauf der siebenwöchigen Studie eine Gewichtszunahme, die am Studienende zwischen 10 und 30 % betrug. Die Medikation wurde von den Tieren gut toleriert, da die Mäuse im Verlauf der Therapie keinen Gewichtsverlust sondern im Gegenteil eine Gewichtszunahme aufwiesen, die leicht über der von nicht behandelten Tiere lag. Die Gewichtszunahme zeigte, dass eine Dauertherapie von 20 Tagen mit insgesamt 10 mg N₃ pro Maus, d.h. 570 mg N₃/kg als Gesamtdosis ohne merkbare Nebenwirkungen vertragen wurde.

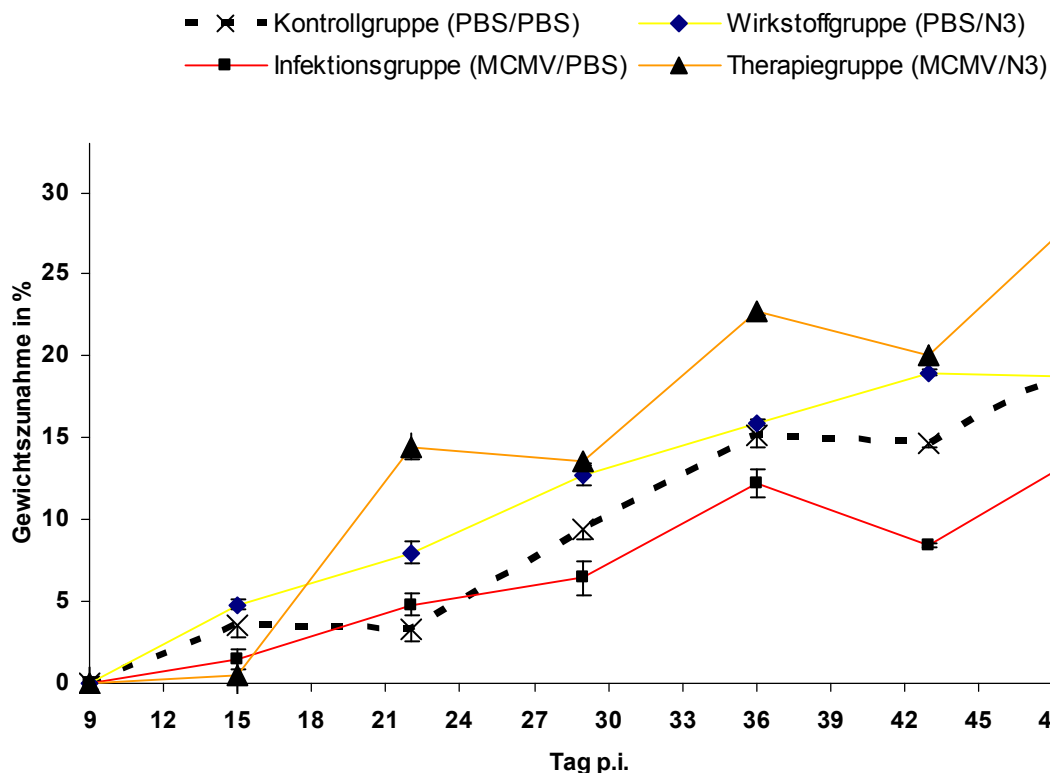


Abb. 14 Prozentuale Gewichtsänderung bei den unterschiedlich behandelten Mäusen ab Tag 9.

Zudem verursachte die Infektion keine auffälligen Nieren- und Lungenschäden, wie histologische Untersuchungen der Organe, die von Herrn PD Dr. Vogel durchgeführt wurden, belegten. Stellvertreten für die umfangreichen histologischen Untersuchungen wird in Abb. 15 das unauffällige Nierenparenchym gezeigt.

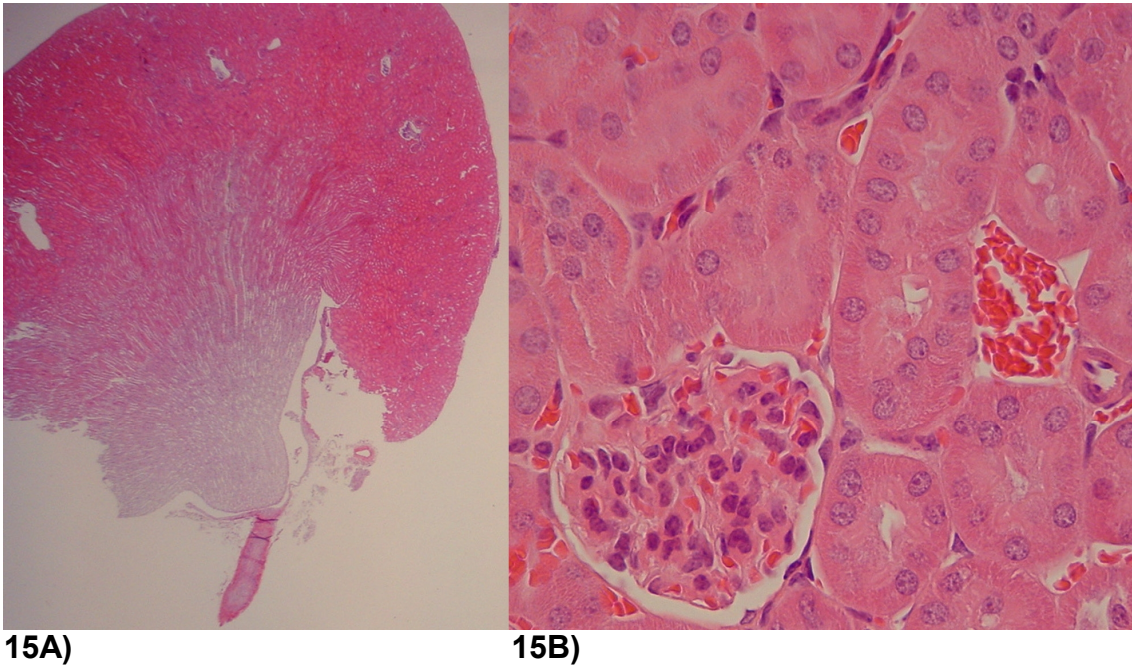


Abb. 15 Nierenparenchym nach zehnmaliger Applikation von N3 an Tag 22 p.i..

A: Übersicht über das Nierenparenchym. Hämatoxylin-Eosin, x 1,25

B: Unauffällige Nierenrinde mit Glomerulus, Tubuli und Gefäßen. Hämatoxylin-Eosin, x 40

4 DISKUSSION

Die Untersuchungen der in vivo Aktivität deuten daraufhin, dass der Multiplex-Wirkstoff AZT-Lipid-PFA die charakteristischen Eigenschaften eines Virusstatikums aufweist. Der Wirkstoff vermochte die Virusreplikation teilweise oder ganz zu hemmen, solange eine Medikation erfolgte. Eine Eliminierung des Virus im Therapiezeitraum konnte nicht erreicht werden, was aber auch mit derzeit verfügbaren Virusstatika bekanntlich nicht zu erwarten gewesen wäre.

Wie die in Tab. 5 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, trat ab Tag 5 bis einschließlich Tag 22 p.i. bei den mit MCMV-infizierten und nicht therapierten Mäusen eine Primärinfektion auf, da in den untersuchten Lungengewebsproben die MCMV-Genprodukte IE 1, IE 3 und gB eindeutig nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu beobachtete man bei den mit MCMV-infizierten, jedoch therapierten Mäusen, dass am Tag 15 p.i. nach der siebenmaligen Applikation von AZT-Lipid-PFA kein gB-Genprodukt auftrat und somit die Replikation weitgehend unterbunden wurde. Nach Absetzen der Therapie (Tag 19 p.i.) wurde die Replikation am Tag 22 p.i. wieder nachweisbar. Am Tag 29 p.i. befanden sich in allen untersuchten Lungengewebsproben sowohl bei den infizierten und behandelten als auch bei den unbehandelten Tieren keine MCMV-Genprodukte. Das Nichtauftreten der Gelbanden täuschte bei den infizierten, nicht behandelten Mäusen eine Viruselimination vor, denn am Tag 36 p.i. wurde in der Infektionsgruppe wieder das IE 1 Gen identifiziert. Dieser Befund lässt die Vermutung zu, dass das Virus am Tag 29 p.i. latent aber nicht detektierbar vorhanden war und ab Tag 36 p.i. durch einen unbekanntes Mechanismus zur Replikation aktiviert wurde und somit wieder nachweisbar geworden ist. Der aus dem optischen Erscheinungsbild des Gelbandenmusters interpretierbare Verlauf der intranasalen Infektion von gesunden Mäusen mit einer subletalen MCMV-Dosis bestätigte sich bei der instrumentellen Auswertung der Bandenintensität mit der AIDA Software 3.22 und der errechneten Signifikanz der Messdaten.

Tab. 5 Identifizierte MCMV-Genprodukte IE 1 (immediate early gen 1); IE 3 (immediate early gen 3); gB (Glycoprotein) im Lungengewebe von intranasal mit 2×10^4 PFU MCMV infizierten Mäusen an den Tagen 5, 15, 22, 29, 36, 43, 50 p.i. Gruppe 1, (Therapiegruppe, drei Mäuse) wurde nach der Infektion an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 mit dem antiviralen Wirkstoff AZT-Lipid-PFA therapiert. Gruppe 2 (Infektionsgruppe, drei Mäuse) erhielt keine antivirale Therapie.

Tag p.i.	IE 1		IE 3		gB	
	Gruppe		Gruppe		Gruppe	
	1	2	1	2	1	2
1	n.b.*	+	n.b.*	n.b.*	n.b.*	-
5	+	+	+	+	+	+
15	+	-	+	+	-	+
22	-	-	-	+	+	+
29	-	-	-	-	-	-
36	-	+	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	+
50	-	+	-	-	-	-

* n.b. nicht bestimmt

Im Rahmen einer früheren Versuchsreihe, bei der im gleichen Mausmodell eine Primärinfektion ausgelöst wurde [75], waren am Tag 29 p.i. alle drei Genprodukte und am Tag 36 nur noch IE 1 und IE 3 detektierbar. In einer späteren Versuchsserie [64] traten im gleichen Modell ab Tag 21 p.i. keine Genprodukte mehr auf. Der unterschiedliche Verlauf der Primärinfektion in diesem Mausmodell kann vermutlich damit erklärt werden, dass die subletale Infektion von den Mäusen unterschiedlich gut verkräftet wurde.

Bemerkenswert ist, dass in der vorliegenden jetzigen Versuchsserie an den Tagen 36, 43, 50 p.i. nur in den infizierten und nicht therapierten Mäusen noch Genprodukte (IE 1, gB) von MCMV gefunden wurden, während diese in den therapierten Mäusen fehlten. Es ist somit anzunehmen, dass die Genexpression des MCMV unter die Nachweisgrenze sank oder das MCMV sogar vollständig aus der Maus eliminiert wurde. Die nicht mehr nachweisbare MCMV-Infektion zeigte außerdem, dass der antivirale Wirkstoff N_3 keine

Stimulation einer möglichen latenten MCMV-Infektion auslöste, die eventuell von toxischen Metaboliten des Wirkstoffs AZT-Lipid-PFA verursacht werden könnte. Im Gegenteil, man kann vermuten, dass der Wirkstoff die Eliminierung des Virus begünstigte, da ab Tag 29 p.i. im Lungengewebe der Therapiegruppe keine MCMV-Genprodukte nachgewiesen wurden, während die Infektionsgruppe diese noch aufwies. Bei den Betrachtungen ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Befunde nur bei einer von drei Mäusen auftraten. Für gesicherte Aussagen müsste man eine größere Zahl von Tieren einsetzen, was im vorliegenden Fall nicht möglich war.

Für den Fall, dass dieser Befund reproduzierbar ist, es spricht eigentlich alles dafür, würde sich die antivirale Wirkung von AZT-Lipid-PFA nicht nur auf die zu erwartende Replikationshemmung beschränken, sondern auch aktiv, nach einem unbekanntem Mechanismus, in die Viruseliminierung eingreifen. Der beobachtete Langzeiteffekt des Wirkstoffs könnte in einem letalen Mausmodell nicht gefunden werden, und lässt sich nur mit einem subletalen Modell nachweisen, wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

Die Aktivität von N_3 steht im Einklang mit den Beobachtungen von Cook [10]. Diese Arbeitsgruppe hat erstmals beschrieben, dass bei einer dreiwöchigen Prophylaxe, bei der täglich 10 mg GCV/kg subcutan appliziert wurden, die Reaktivierung des latent vorhandenen MCMV verhindert wurde. GCV kann bekanntlich auf der Ebene der Polymerasekettenverlängerung die Virusreplikation stoppen. PFA als eine der beiden Hauptkomponenten des neuen Wirkstoffs AZT-Lipid-PFA kann erwiesenermaßen kompetitiv einen zentralen Bereich der Polymerase blockieren. Falls PFA aus AZT-Lipid-PFA durch Metabolisierung freigesetzt wird, was zu vermuten ist, aber bisher noch nicht untersucht wurde, könnte der Wirkstoff auch bei der Polymerasereaktion eingreifen. Die antivirale Aktivität beider Substanzen kann somit bei der Primärinfektion die Hemmung der Replikation, bei der Viruslatenz die Reaktivierung blockieren, indem die Polymerase gehemmt wird. Trotz des weitgehend gleichen Targets kann die Blockade der Reaktivierung des Virus durch GCV nur bedingt als Vergleichswert herangezogen werden, da GCV und

PFA zwar die Polymerasereaktion hemmen, dazu aber einen unterschiedlichen Wirkmechanismus verwenden, der bekanntlich erst bei Arzneimittelresistenz zum Tragen kommt.

Im Unterschied zu der von Cook gewählten Dosierung von GCV (täglich 10 mg/kg s.c.) wurden vom AZT-Lipid-PFA 57 mg/kg jeden zweiten Tag i.p. appliziert. Vermutlich kann mit einer verminderten aber täglichen Medikation der gleiche Plasmaspiegel erzielt werden, der mit den hohen alternierenden Dosen erreicht wird. Die alternierende Therapie, die für AZT-Lipid-PFA gewählt wurde, ist einerseits für den Empfänger schonender, andererseits könnte der Wirkstoff einen Depoteffekt aufweisen, wodurch eine tägliche Therapie nicht erforderlich wäre, was allerdings noch untersucht werden müsste. Ungeklärt ist auch, ob der Wirkstoff als Gesamtmolekül oder seine Metabolite antiviral in vivo wirken. Für die Therapie von Transplantpatienten werden 60 mg/kg PFA alle 8 Stunden i.v. vorgeschlagen. Somit wird AZT-Lipid-PFA im Vergleich zu PFA im Mausmodell leicht unterdosiert eingesetzt [3].

Die eingangs erwähnten, früher verwendeten Mausmodelle zur ersten orientierenden Ermittlung der Wirkung neuer antiviraler Substanzen, basieren darauf, dass durch eine hohe letale Infektion mit MCMV die Tiere innerhalb von fünf Tagen nach der Infektion sterben. Eine lebensverlängernde Wirkung der applizierten Substanz wird als indirekter Beweis der antiviralen Aktivität gewertet. Mit dem Modell der letalen Infektion sind innerhalb von wenigen Tagen Aussagen zur Dosis-Wirkung-Abhängigkeit möglich. Außerdem ermöglicht dieses Modell die Ermittlung der relativen antiviralen Aktivität zweier oder mehrerer antiviraler Substanzen zueinander. Der wesentliche Nachteil des letalen Infektionsmodells ist aber darin zu sehen, dass dieses Modell den realen Infektionsverlauf bei Patienten nicht annähernd wiedergibt und keine Aussagen bezüglich der Wirkstoffaktivität bei Latenz und Reaktivierung ermöglicht. Abgesehen davon, ist die Genehmigung zur Durchführung solcher Tierexperimente heutzutage nicht ohne weiteres zu erhalten.

Zur Untersuchung der Langzeitwirkung von antiviralen Wirkstoffen ist die letale Infektion kein brauchbares Modell, zumal die antivirale Wirkung in den einzelnen betroffenen Organen nicht bestimmbar ist. Gerade für latente Infektionen benötigt man sehr sensible Modelle, zu denen das hier beschriebene zählt, mit dem für die Humantherapie entscheidende Fragen geklärt werden können. Die Ergebnisse zeigen, dass sich das Mausmodell mit i.n. Infektion grundsätzlich zur Untersuchung der antiviralen Aktivität neuer anti-CMV-Wirkstoffe eignet. Allerdings ist der Nachweis der Wirksamkeit auf molekularbiologischer Ebene mit Hilfe der RT-PCR, wie er in der vorliegenden Arbeit erstmals durchgeführt wurde, wesentlich arbeitsintensiver und methodisch aufwendiger als ein letales Mausmodell, das nur orientierende Aktivitätsdaten liefern kann.

Mit den gefundenen Ergebnissen ist die ursprüngliche Zielsetzung der Arbeit erreicht worden, die vorsah, die Aktivität des neuen, bisher in vivo ungeprüften antiviralen Multiplex-Wirkstoffs AZT-Lipid-PFA im Mausmodell der i.n. Cytomegalovirusinfektion zu ermitteln. Es konnte zum ersten Mal mit molekularbiologischen Techniken gezeigt werden, dass der Wirkstoff die MCMV-Replikation hemmt und möglicherweise auch zur Eliminierung des Virus beiträgt. Inwieweit die antivirale Hemmwirkung von N₃ die Wirksamkeit zugelassener anti-HCMV-Arzneimittel übertrifft, kann erst in sehr umfangreichen präklinischen Untersuchungen und späteren klinischen Studien geklärt werden.

Für die zukünftige Anwendung des Modells ist es wichtig, Schwachstellen zu erkennen und nach Lösungswegen zu suchen. Die molekularbiologische Arbeitstechnik ist mit verschiedenen Fehlerquellen behaftet, die die Interpretation der Testergebnisse verfälschen können. Die i.n. Applikation mit subletalen MCMV-Dosen führt in der Lunge zu einer Infektion, wobei das Virus seinen latenten oder replizierenden Zustand unregelmäßig wechseln kann, wie eingangs ausführlich beschrieben wurde [38]. Durch die unterschiedliche Verteilung der nachzuweisenden geringen Mengen an Genprodukten in den Lungenteilen stößt die Quantifizierung der MCMV-Infektion an ihre Grenzen.

Bei einem Anteil der Genprodukte in der cDNA einer Probe, der unterhalb einer nicht ermittelten Nachweisgrenze liegt, führt die primerspezifische Amplifikation der cDNA nicht zu ausreichend großen Mengen, die in der Gelelektrophorese identifiziert werden können. Im Chromatogramm fehlen dann die entsprechenden Amplifikationsprodukte, wodurch ein negatives Ergebnis vorgetäuscht wird. Um eine falsche Interpretation weitgehend auszuschließen, müssen Mehrfachbestimmungen durchgeführt werden.

Cook verwendet zur Identifizierung der viralen Genprodukte anstelle der normalen RT-PCR die nested RT-PCR als Alternative. Die Methode benötigt nicht wie die RT-PCR nur 2 sondern 4 MCMV spezifische Primer [10], wodurch zusätzliche Arbeitsschritte erforderlich werden. Amplifikationsprodukte, die mit der RT-PCR in nicht nachweisbaren Mengen erhalten werden, können mit der nested RT-PCR so vermehrt werden, dass sie detektierbar werden.

Zu den genannten Fehlerquellen kommen noch alle die hinzu, die beim molekularbiologischen Nachweis von Nukleinsäuren, das aus Gewebe isoliert wird generell auftreten können. So kann einerseits bereits bei der Isolierung die RNA durch RNase teilweise oder ganz abgebaut werden. Andererseits können bei der Isolierung der mRNA aus dem Lungengewebe, je nach der verwendeten Methodik (fraktionierte Fällung oder chromatographische Trennung an Oligo-T Trägermaterialien), sehr unterschiedliche mRNA-Mengen in unterschiedlicher Reinheit erhalten werden. Bei der Transkription, Amplifikation und Detektion sind ebenfalls falsch negative oder fälschlich niedrige Testergebnisse möglich.

Durch eine ungenaue photometrische Konzentrationsbestimmung sowie nicht optimierte Primer und Amplifikationsschritte oder schlecht aufgetrennte Gelbanden täuschen die auftretenden Intensitäten der Banden falsche Mengen an Replikationsprodukten vor. Einige dieser Fehlerquellen lassen sich weitgehend ausschließen, wenn die Daten in einer unabhängigen Mehrfachbestimmung reproduzierbar sind. Zur Kontrolle von Extraktions-, Amplifikations- und Detektionsschritten kann ein interner Standard verwendet

werden, wobei allerdings die Auswahl dieses Standards bekanntlich mit Schwierigkeiten verbunden ist [48].

Die Intensität der auftretenden Gelbanden lässt keine eindeutige Aussage darüber zu, bis zu welchem Grad die Virusreplikation in den therapierten Tieren gehemmt wird. Eine auftretende gB Bande deutet nur qualitativ an, dass eine Virusreplikation stattgefunden hat. Solange die Methode nicht quantifiziert ist, kann man aus Intensitätsunterschieden entsprechender Banden keine Aussage zu Aktivitätsunterschieden machen. Selbst wenn keine gB Bande auftritt, was eine totale Replikationshemmung vermuten lässt, ist nicht auszuschließen, dass die Replikation trotzdem stattfindet aber nicht detektierbar ist.

Vermutlich sind nur mit der äußerst sensitiven real-time PCR [46, 77] kleine Transkriptionsmengen quantifizierbar und geringe Veränderungen in der Genexpression erfassbar, so dass die Möglichkeiten, die dieses Mausmodell bietet mit dieser Methode voll ausgeschöpft werden können, wenn die benötigten internen Standards zur Verfügung stehen [39, 50]. Vliegen et al. kam am Ende seiner Untersuchung zur Detektion und Quantifizierung von MCMV mit der real-time PCR zu dem Ergebnis, dass diese Technik eine ausgesprochen nützliche Methode sein kann, um den Effekt neuer Wirkstoffe (dose-response relation) auf die totale Viruseliminierung zu prüfen [77]. Fleckenstein [18] hat aktuelle Entwicklungen zur Quantifizierung von CMV-Nukleinsäuren sowie die Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden ausführlich diskutiert und dabei aufgezeigt, dass die Methodik eine schnelle Entwicklung in Richtung Automatisierung durchläuft.

Gerade die zuverlässige, möglichst quantitative Aussage zur Replikationshemmung ist für die erste Beurteilung der antiviralen Aktivität eines neuen Wirkstoffs ausschlaggebend. Wenn keine eindeutige Aktivitätssteigerung oder Reduzierung der Nebenwirkung bei gleicher Aktivität beziehungsweise sonstige Vorteile bei der Therapie zu den derzeit angewendeten Arzneimitteln nachweisbar sind, fehlt die grundsätzliche Voraussetzung für die weitere langwierige, sehr teure Entwicklung eines neuen Wirkstoffs zum Arzneimittel.

Die Aufklärung der antiviralen Wirkung auf der differenzierten molekularbiologischen Ebene mit Hilfe hoch sensibler Mausmodelle kann das antivirale Potential eines Wirkstoffs ausloten. Es ist äußerst schwierig, die antivirale Aktivität eines ungetesteten Wirkstoffs in einem Tiermodell zu ermitteln, wenn weder für die Formulierung, Höhe der Dosierung noch für die Art des Therapieschemas Daten vorhanden sind, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall gewesen ist.

Die ermittelte antivirale Aktivität eines neuen Wirkstoffs lässt sich dadurch absichern, dass man bei der Testung einen Referenzwirkstoff mit verwendet. Im vorliegenden Fall würde der Einsatz von PFA als Referenzwirkstoff, der in der Humantherapie zugelassen ist, wertvolle und notwendige Orientierungsdaten für die in vivo Testung der unbekanntenen Wirkung von AZT-Lipid-PFA liefern, zumal PFA eine der beiden Hauptwirkstoffkomponenten des Multiplex-Wirkstoffs ist. Diese zusätzlichen sehr aufwendigen Untersuchungen würden aber den Rahmen der vorliegenden Arbeit weit überschreiten.

Abgesehen davon, dass das verwendete Mausmodell, bei einer einzigen Dosierung von N_3 nur orientierende Daten zur antiviralen Wirksamkeit von AZT-Lipid-PFA in der Lunge liefern kann, sind die mit dem Modell erhaltenen Aussagen zur Toxizität des Wirkstoffes eindeutig und äußerst positiv. Da bei den histopathologischen Untersuchungen von PD Dr. Vogel weder an Lungen noch an Nieren pathologische Veränderungen gefunden wurden, erweist sich der Wirkstoff in der gewählten vergleichbar hohen Dosierung als weitgehend untoxisch. Gerade aufgrund der hohen Nephrotoxizität der zugelassenen anti HCMV-Therapeutika (GCV, PFA, CDV), sind deren therapeutische Anwendung stark eingeschränkt [13], so dass weniger toxische anti-CMV wirksame Substanzen dringend gefordert werden. Durch das Ausbleiben einer Nephrotoxizität von AZT-Lipid-PFA bei der angewendeten Dosierung ist eine entscheidende Voraussetzung erfüllt, die weitere präklinische Untersuchungen des neuen Multiplex-Wirkstoffs rechtfertigen und wünschenswert erscheinen lassen.

Bei zukünftigen Untersuchungen müsste dann auch der antivirale Effekt der zweiten Hauptwirkstoffkomponente des Multiplex-Wirkstoffs AZT-Lipid-PFA, der von AZT, ermittelt werden, wozu aber ein Tiermodell für die HIV-Infektion benötigt würde. Vor allem dadurch, dass bei AIDS Patienten, die HIV-Infektion sehr häufig von der HCMV-Infektion begleitet ist, könnte der Multiplex-Wirkstoff neue Therapiechancen eröffnen. Unter diesem Aspekt wäre es vielleicht auch zweckmäßig, ein Tiermodell zur gleichzeitigen Testung von HIV- und HCMV-Infektion zu ermitteln. Man könnte auch darüber nachdenken, mit welchen Modellen man generell Multiplex-Wirkstoffe testen könnte, da alle bisherigen Tiermodelle auf die Monotherapie fixiert sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Eine Gruppe 70 gesunder Balb/c Mäuse wurde intranasal (i.n.) mit subletalen Dosen (2×10^4 PFU) des murinen Cytomegalovirus (MCMV) infiziert. Zur Ermittlung der antiviralen in vivo Wirkung des neuen Multiplex-Wirkstoffes AZT-Lipid-PFA, von dem bisher nur in vitro Daten bekannt waren, wurden von dieser Gruppe 35 Mäuse zusätzlich an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 p.i. mit jeweils ca. 57 mg/kg dieses Wirkstoffs i.p. therapiert. Zur Kontrolle wurde mit einer zweiten Gruppe von 70 nicht infizierten Mäusen analog verfahren. Das Allgemeinbefinden der Mäuse änderte sich im Verlauf von 50 Tagen weder durch die Infektion noch durch die Therapie, wie aus Gewichtsmessungen gefolgert wurde.

An den Tagen 1, 5, 15, 22, 29, 36, 43, 50 p.i. wurde die mRNA jeweils aus zehn verschiedenen Lungenabschnitten einer Lunge von jeweils drei getöteten Mäusen aus allen Gruppen isoliert. Die mRNA der verschiedenen Lungenabschnitte wurde mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers und der RT-PCR-Methode in cDNA transkribiert. Durch eine Amplifikation der cDNA, wobei verschiedene spezifische Primer für die MCMV-spezifischen immediate early Gene ie 1, ie 3 und das early Gen gB eingesetzt wurden und der anschließenden elektrophoretischen Trennung der Amplifikationsansätze wurden Gelchromatogramme erhalten, deren Bandenmuster Auskunft über den Verlauf der Virusinfektion gaben.

Die auftretenden Gelbanden zeigten, dass bei den intranasal infizierten Mäusen im Zeitraum von Tag 5 – 22 p.i. eine Virusreplikation (gB positiv) stattfand, das Virus ab Tag 29 mit der Ausnahme am Tag 43 (gB positiv), in den latenten Zustand (IE 1, IE 3 positiv) überging, der bis zum Versuchsende am Tag 50 in einigen wenigen Lungenabschnitten noch nachweisbar war. Bei den infizierten und therapierten Mäusen verlief die Virusinfektion analog bis auf zwei entscheidende Unterschiede. Am Tag 15 p.i. war die Virusreplikation (gB negativ) nicht detektierbar im Gegensatz zu den nicht therapierten Mäusen. Erst

3 Tage nach Beendigung der Therapie am Tag 22 p.i. wurde die Replikation wieder nachweisbar. Ab Tag 29 p.i. wurden keine Virusgene (IE 1, IE 3), die bei einer Viruslatenz zu erwarten waren, gefunden, die bei den infizierten, nicht therapierten Tieren in verschiedenen Lungenabschnitten mehr oder weniger deutlich detektierbar waren.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der neue Multiplex-Wirkstoff AZT-Lipid-PFA in vivo die charakteristische Wirkung eines Virusstatikums aufweist, d.h., eine Virusreplikation wird nur während der Dauer der Therapie teilweise oder völlig inhibiert. Das Virus wird aber hierbei nicht eliminiert. Es ist aber zu vermuten, dass der Wirkstoff die Eliminierung des Virus unterstützt.

Da mit dem verwendeten Mausmodell die antivirale Wirkung nicht quantifizierbar ist, muss mit einer quantitativen Methodik und entsprechenden Referenzvirusstatika die zwar gefundene, aber noch nicht endgültig bewiesene in vivo Wirksamkeit von AZT-Lipid-PFA weiter untersucht werden. Da im Verlauf der dreiwöchigen Therapie keine histopathologischen Auffälligkeiten in Lungen und Nieren aufgetreten sind, erfüllt der neue Wirkstoff eine wesentliche Voraussetzung, um weitere wünschenswerte präklinische Studien zu rechtfertigen.

6 ANHANG

Ergebnisse der RNA-Isolierung aus den 5 Lungenabschnitten (I - V Abb. 5), Angaben zum DNA Verdau und der RT-PCR der Mausgruppen:

- **P/PBS: Kontrollgruppe** = Applikation von PBS
- **P/N₃: Wirkstoffgruppe** = Therapie mit N₃
- **V/PBS: Infektionsgruppe** = Infektion + Applikation von PBS
- **V/N₃: Therapiegruppe** = Infektion + Therapie mit N₃

Tag 1 p.i.

Gruppe	Kennung	Lungenabschnitt	UV-Verhältnis 260nm/280nm**	Konzentration der isolierte RNA gelöst in 20µl H ₂ O [µg/µl]	DNA Verdau*		Identifizierte Genprodukte			
					RNA-Lösung in µl	H ₂ O - Zugabe in µl	β-actin	IE 1	IE 3	GB
Kontrollgruppe	P1/ PBS	I	1,54	1,26	4,0	2,2	+	RT-PCR ist erwartungsgemäß negativ		
	P1/ PBS	II	1,57	1,65	3,0	2,2	+			
	P1/ PBS	III	1,61	1,78	2,8	3,4	+			
	P1/ PBS	IV	1,58	0,50	Nicht weiterverarbeitet					
	P1/ PBS	V	1,57	1,29	3,9	2,3	+			
	P2/ PBS	I	1,56	1,35	3,7	2,5	+			
	P2/ PBS	II	1,56	1,70	2,9	3,3	+			
	P2/ PBS	III	1,56	1,24	4,0	2,2	+			
	P2/ PBS	IV	1,53	1,22	4,1	2,1	+			
	P2/ PBS	V	1,58	2,83	1,8	4,4	+			
	P3/ PBS	I	1,55	1,20	4,2	2,0	+			
	P3/ PBS	II	1,57	2,17	2,3	3,9	+			
	P3/ PBS	III	1,56	2,24	2,2	4,0	+			
	P3/ PBS	IV	1,58	2,21	2,3	3,9	+			
	P3/ PBS	V	1,55	1,85	2,7	3,5	+			
Infektionsgruppe	V1/PBS	I	1,54	0,66	Nicht weiterverarbeitet					
	V1/PBS	II	1,55	0,97	5,2	1,0	++	+		-
	V1/PBS	III	1,52	< 0,42 wurde nicht aufgearbeitet						
	V1/PBS	IV	1,48							
	V1/PBS	V	1,45							
	V2/PBS	I	1,50							
	V2/PBS	II	1,64					1,00	5,0	1,2
	V2/PBS	III	1,45	0,26	Nicht weiterverarbeitet					-
	V2/PBS	IV	1,54	0,67	4,5	1,7	++	+		-
	V2/PBS	V	1,52	0,38	Nicht weiterverarbeitet					
	V3/PBS	I	1,57	1,66	3,0	3,2	++	++		-
	V3/PBS	II	1,58	1,63	3,1	3,1	++	+		-
	V3/PBS	III	1,60	1,18	4,3	1,9	++	+		-
	V3/PBS	IV	1,60	0,93	3,2	3,0	++			-
	V3/PBS	V	1,56	0,66	4,5	1,7	++			-

*Inkubation mit 1µl DNase- Lösung und 0,8 µl DNase- Puffer

** gemessen in NFW

Tag 5 p.i.

Gruppe	Kennung	Lungen- abschnitt	UV- Verhältnis 260nm/ 280nm**	Konzentration der isolierte RNA gelöst in 20µl H ₂ O [µg/µl]	DNA Verdau*		Identifizierte Genprodukte				
					RNA- Lösung in µl	H ₂ O - Zugabe in µl	β- actin	IE 1	IE 3	GB	
Kontrollgruppe	P1/ PBS	I	1,59	1,57	3,2	3,0	++	RT-PCR ist erwartungsgemäß negativ			
	P1/ PBS	II	1,57	1,48	3,4	2,8	+				
	P1/ PBS	III	1,58	1,36	3,7	2,5	++				
	P1/ PBS	IV	1,62	2,05	2,4	3,8	++				
	P1/ PBS	V	1,59	1,60	3,1	3,1	++				
	P2/ PBS	I	1,57	1,09	4,6	1,6	++				
	P2/ PBS	II	1,61	1,61	3,1	3,1	++				
	P2/ PBS	III	1,53	1,48	3,4	2,8	++				
	P2/ PBS	IV	1,59	1,93	2,6	3,6	++				
	P2/ PBS	V	1,59	1,93	2,6	3,6	++				
	P3/ PBS	I	1,57	1,75	2,9	3,3	++				
	P3/ PBS	II	1,59	1,28	3,9	2,3	++				
	P3/ PBS	III	1,575	1,81	2,8	3,4	++				
	P3/ PBS	IV	1,580	2,03	2,5	3,7	++				
P3/ PBS	V	1,54	0,77	Nicht weiterverarbeitet							
Wirkstoffgruppe	P1/ N3	I	1,55	0,90							
	P1/ N3	II	1,56	1,44	3,5	2,7	++				
	P1/ N3	III	1,57	1,59	3,1	3,1	++				
	P1/ N3	IV	1,59	1,99	2,5	3,7	++				
	P1/ N3	V	1,55	1,92	2,6	3,6	++				
	P2/ N3	I	1,59	1,38	3,6	2,6	++				
	P2/ N3	II	1,60	1,21	4,1	2,1	++				
	P2/ N3	III	1,98	1,30	3,8	2,4	++				
	P2/ N3	IV	1,59	2,94	1,7	4,5	++				
	P2/ N3	V	1,56	1,46	3,4	2,8	++				
	P3/ N3	I	1,68	0,78	Nicht weiterverarbeitet						
	P3/ N3	II	1,51	0,93	5,4	0,8	++				
	P3/ N3	III	1,555	1,68	3,0	3,2	++				
	P3/ N3	IV	1,54	1,23	4,1	2,1	++				
P3/ N3	V	1,59	1,11	4,5	1,7	++					

Therapiegruppe	V1/N3	I	1,565	1,74	2,9	3,3	+	-	-	-	
	V1/N3	II	1,70	1,04	4,8	1,4	+	-	-	-	
	V1/N3	III	1,70	1,31	3,8	2,4	+	-	-	++	
	V1/N3	IV	1,616	4,10	1,2	5,0	++	++	+	++	
	V1/N3	V	1,59	1,47	3,4	2,8	++	++	++	+	
	V2/N3	I	1,560	2,05	2,4	3,8	++	+	+	+	
	V2/N3	II	1,650	3,11	1,6	4,6	++	+	+	-	
	V2/N3	III	1,570	2,47	2,0	4,2	++	-	+	-	
	V2/N3	IV	1,550	2,10	2,4	3,8	+	-	-	++	
	V2/N3	V	1,655	3,11	1,6	4,6	+	+	+	++	
	V3/N3	I	1,560	1,87	2,7	3,5	++	-	-	-	
	V3/N3	II	1,530	2,13	2,3	3,9	++	+	-	-	
	V3/N3	III	1,58	1,22	4,1	2,1	++	-	-	-	
	V3/N3	IV	1,55	2,06	2,4	3,8	++	-	-	-	
	V3/N3	V	1,575	2,23	2,2	4,0	++	-	-	+	
Infektionsgruppe	V1/PBS	I	1,585	2,08	2,4	3,8	++	+	+	-	
	V1/PBS	II	1,620	2,44	2,0	4,2	++	++	++	++	
	V1/PBS	III	1,580	1,90	2,6	3,6	++	-	+	-	
	V1/PBS	IV	1,605	2,49	2,0	4,2	++	-	+	+	
	V1/PBS	V	1,560	2,35	2,1	4,1	++	-	-	-	
	V2/PBS	I	1,535	1,81	2,8	3,4	++	-	-	-	
	V2/PBS	II	1,54	1,35	3,7	2,5	++	+	-	-	
	V2/PBS	III	1,585	1,87	2,7	3,5	++	-	-	-	
	V2/PBS	IV	1,575	1,74	2,9	3,3	++	++	-	-	
	V2/PBS	V	1,590	2,02	2,5	3,7	++	-	-	++	
	V3/PBS	I	1,505	1,55	3,2	3,0	++	-	-	--	
	V3/PBS	II	1,50	0,70	Nicht weiterverarbeitet						
	V3/PBS	III	1,58	0,56							
	V3/PBS	IV	1,50	0,19							
V3/PBS	V	1,50	0,32								

*Inkubation mit 1 μ l DNase- Lösung und 0,8 μ l DNase- Puffer

** gemessen in NFW

Tag 15 p.i.

Nr	Kennung	Lungen- abschnitt	UV- Verhältnis 260nm/ 280nm**	Konzentration der isolierte RNA gelöst in 20µl H ₂ O [µg/µl]	DNA Verdau*		Identifizierte Genprodukte				
					RNA- Lösung in µl	H ₂ O - Zugabe in µl	β- actin	IE 1	IE 3	GB	
Kontrollgruppe	P1/ PBS	I	1,595	1,84	2,7	3,5	++	RT-PCR ist erwartungsgemäß negativ			
	P1/ PBS	II	1,605	1,89	2,6	3,6	++				
	P1/ PBS	III	1,660	2,10	2,4	3,8	++				
	P1/ PBS	IV	1,595	2,08	2,4	3,8	++				
	P1/ PBS	V	1,54	0,89							
	P2/ PBS	I	1,62	1,65	3,0	3,2	++				
	P2/ PBS	II	1,62	1,62	3,1	3,1	++				
	P2/ PBS	III	1,61	2,17	2,3	3,9	++				
	P2/ PBS	IV	1,665	2,30	2,2	4,0	++				
	P2/ PBS	V	1,60	1,46	3,4	2,8	++				
	P3/ PBS	I	1,585	1,90	2,6	3,6	++				
	P3/ PBS	II	1,56	1,27	3,9	2,3	++				
	P3/ PBS	III	1,585	1,72	2,9	3,3	++				
	P3/ PBS	IV	1,595	1,73	2,9	3,3	++				
	P3/ PBS	V	1,585	2,61	1,9	4,3	++				
Wirkstoffgruppe	P1/ N3	I	1,610	1,72	2,9	3,3	++				
	P1/ N3	II	1,55	1,43	3,5	2,7	++				
	P1/ N3	III	1,605	2,66	1,9	4,3	++				
	P1/ N3	IV	1,570	1,79	2,8	3,4	++				
	P1/ N3	V	1,56	0,99	5,1	1,1	++				
	P2/ N3	I	1,56	1,22	4,1	2,1	++				
	P2/ N3	II	1,565	2,05	2,4	3,8	++				
	P2/ N3	III	1,570	1,93	2,6	3,6	++				
	P2/ N3	IV	1,62	1,26	4,0	2,2	++				
	P2/ N3	V	1,535	1,71	2,9	3,3	+				
	P3/ N3	I	1,575	1,82	2,7	3,5	++				
	P3/ N3	II	1,51	0,77	Nicht weiterverarbeitet						
	P3/ N3	III	1,54	1,10	4,5	1,7	++				
	P3/ N3	IV	1,570	2,25	2,2	4,0	++				
	P3/ N3	V	1,595	2,26	2,2	4,0	++				

Therapiegruppe	V1/N3	I	1,54	0,98	Nicht weiterverarbeitet					
	V1/N3	II	1,56	1,63	3,1	3,1	++	-	-	-
	V1/N3	III	1,60	1,37	3,6	2,6	++	-	-	-
	V1/N3	IV	1,53	1,23	4,1	2,1	++	-	-	-
	V1/N3	V	1,60	0,74	Nicht weiterverarbeitet					
	V2/N3	I	1,60	1,10	4,5	1,7	++	-	-	-
	V2/N3	II	1,55	0,80	Nicht weiterverarbeitet					
	V2/N3	III	1,54	0,77						
	V2/N3	IV	1,615	3,10	1,6	4,6	++	+	-	-
	V2/N3	V	1,59	1,49	3,4	2,8	++	-	-	-
	V3/N3	I	1,56	0,68	Nicht weiterverarbeitet					
	V3/N3	II	1,555	2,08	2,4	3,8	+	-	-	-
	V3/N3	III	1,57	2,03	2,5	3,7	+	-	-	-
	V3/N3	IV	1,56	1,37	3,6	2,6	++	-	-	-
	V3/N3	V	1,60	2,12	2,4	3,8	++	-	-	-
Infektionsgruppe	V1/PBS	I	1,59	1,37	3,6	2,6	+	-	+	-
	V1/PBS	II	1,66	1,67	3,0	3,2	+	-	-	++
	V1/PBS	III	1,64	2,40	2,1	4,1	+	-	-	-
	V1/PBS	IV	1,585	2,01	2,5	3,7	++	-	-	++
	V1/PBS	V	1,60	0,95	5,3	0,9	+	-	+	-
	V2/PBS	I	1,55	1,09	4,6	1,6	++	-	+	-
	V2/PBS	II	1,60	1,04	4,8	1,4	++	-	+	-
	V2/PBS	III	1,61	1,39	3,6	2,6	++	-	-	-
	V2/PBS	IV	1,615	2,24	2,2	4,0	++	-	-	-
	V2/PBS	V	1,56	0,35	Nicht weiterverarbeitet					
	V3/PBS	I	1,625	2,96	1,7	4,5	++	-	-	++
	V3/PBS	II	1,54	0,40	Nicht weiterverarbeitet					
	V3/PBS	III	1,59	1,70	2,9	3,3	++	-	-	-
	V3/PBS	IV	1,60	1,87	2,7	3,5	++	-	-	++
	V3/PBS	V	1,58	0,41	Nicht weiterverarbeitet					

*Inkubation mit 1, μ l DNase- Lösung und 0,8 μ l DNase- Puffer

** gemessen in NFW

Tag 22 p.i.

Nr	Kennung	Lungen- abschnitt	UV- Verhältnis 260nm/ 280nm**	Konzentration der isolierte RNA gelöst in 20µl H ₂ O [µg/µl]	DNA Verdau*		Identifizierte Genprodukte				
					RNA- Lösung in µl	H ₂ O - Zugabe in µl	β- actin	IE 1	IE 3	GB	
Kontrollgruppe	P1/ PBS	I	1,58	1,37	3,6	2,6	++	RT-PCR ist erwartungsgemäß negativ			
	P1/ PBS	II	1,565	1,83	2,7	3,5	++				
	P1/ PBS	III	1,54	0,54	Nicht weiterverarbeitet						
	P1/ PBS	IV	1,57	2,28	2,2	4,0	++				
	P1/ PBS	V	1,60	1,36	3,7	2,5	++				
	P2/ PBS	I	1,60	2,05	2,4	3,8	++				
	P2/ PBS	II	1,54	1,89	2,6	3,6	++				
	P2/ PBS	III	1,595	1,91	2,6	3,6	++				
	P2/ PBS	IV	1,590	1,76	2,8	3,4	++				
	P2/ PBS	V	1,605	2,68	1,9	4,3	++				
	P3/ PBS	I	1,58	1,01	5,0	1,2	++				
	P3/ PBS	II	1,65	3,19	1,6	4,6	++				
	P3/ PBS	III	1,565	1,70	2,9	3,3	++				
	P3/ PBS	IV	1,56	1,55	3,2	3,0	++				
P3/ PBS	V	1,685	2,81	1,8	4,4	++					
Wirkstoffgruppe	P1/ N3	I	1,615	2,08	2,4	3,8	++				
	P1/ N3	II	1,66	1,76	2,8	3,4	++				
	P1/ N3	III	1,630	2,33	2,1	4,1	++				
	P1/ N3	IV	1,675	2,36	2,1	4,1	++				
	P1/ N3	V	1,665	2,39	2,1	4,1	++				
	P2/ N3	I	1,655	3,01	1,7	4,5	++				
	P2/ N3	II	1,59	1,55	3,2	3,0	++				
	P2/ N3	III	1,59	1,54	3,2	3,0	++				
	P2/ N3	IV	1,630	2,37	2,1	4,1	++				
	P2/ N3	V	1,695	3,34	1,5	4,7	++				
	P3/ N3	I	1,615	3,05	1,6	4,6	++				
	P3/ N3	II	1,59	1,62	3,1	3,1	++				
	P3/ N3	III	1,59	2,10	2,4	3,8	++				
	P3/ N3	IV	1,59	1,99	2,5	3,7	++				
P3/ N3	V	1,605	3,06	1,6	4,6	++					

Therapiegruppe	V1/N3	I	1,625	2,17	2,3	3,9	++	-	-	-
	V1/N3	II	1,75	1,27	3,9	2,3	++	-	-	-
	V1/N3	III	1,54	1,15	4,3	1,9	++	-	-	-
	V1/N3	IV	1,66	1,32	3,8	2,4	++	-	-	-
	V1/N3	V	1,64	2,58	1,9	4,3	++	-	-	+
	V2/N3	I	1,635	2,97	1,7	4,5	++	-	-	-
	V2/N3	II	1,645	1,70	2,9	3,3	++	-	-	-
	V2/N3	III	1,620	4,26	1,2	5,0	++	-	-	+
	V2/N3	IV	1,654	1,84	2,7	3,5	++	-	-	-
	V2/N3	V	1,71	3,12	1,6	4,6	++	-	-	-
	V3/N3	I	1,625	1,01	5,0	1,2	++	-	-	-
	V3/N3	II	1,55	2,51	2,0	4,2	++	-	-	+
	V3/N3	III	1,595	2,70	1,9	4,3	++	-	-	-
	V3/N3	IV	1,660	1,78	2,8	3,4	++	-	-	-
V3/N3	V	1,655	1,68	3,0	3,2	nd	-	-	-	
Infektionsgruppe	V1/PBS	I	1,555	1,49	3,4	2,8	++	-	-	-
	V1/PBS	II	1,55	1,35	3,7	2,5	++	-	-	-
	V1/PBS	III	1,57	1,84	2,7	3,5	++	-	-	-
	V1/PBS	IV	1,59	2,43	2,1	4,1	++	-	-	+
	V1/PBS	V	1,635	2,01	2,5	3,7	++	-	-	++
	V2/PBS	I	1,575	1,50	3,3	2,9	++	-	-	-
	V2/PBS	II	1,56	2,11	2,4	3,8	++	-	-	-
	V2/PBS	III	1,55	1,51	3,3	2,9	++	-	-	-
	V2/PBS	IV	1,55	2,28	2,2	4,0	++	-	-	-
	V2/PBS	V	1,54	1,50	3,3	2,9	++	-	-	-
	V3/PBS	I	1,55	1,43	3,5	2,7	++	-	-	-
	V3/PBS	II	1,63	1,95	2,6	3,6	++	-	-	++
	V3/PBS	III	1,58	1,49	3,4	2,8	++	-	-	++
	V3/PBS	IV	1,66	2,30	2,2	4,0	++	-	-	+
V3/PBS	V	1,56	1,40	3,6	2,6	++	-	-	++	

*Inkubation mit 1 μ l DNase- Lösung und 0,8 μ l DNase- Puffer-
 ** gemessen in NFW

Tag 29 p.i.

Nr	Kennung	Lungen- abschnitt	UV- Verhältnis 260nm/ 280nm**	Konzentration der isolierte RNA gelöst in 20µl H ₂ O [µg/µl]	DNA Verdau*		Identifizierte Genprodukte				
					RNA- Lösung in µl	H ₂ O - Zugabe in µl	β- actin	IE 1	IE 3	GB	
Kontrollgruppe	P1/ PBS	I	1,38	1,38	3,6	2,6	++	RT-PCR ist erwartungsgemäß negativ			
	P1/ PBS	II	1,39	0,83	6,0	0,2					
	P1/ PBS	III	1,38	0,45	Nicht weiterverarbeitet						
	P1/ PBS	IV	1,40	1,24	4,0	2,2	++				
	P1/ PBS	V	1,415	1,53	3,3	2,9	++				
	P2/ PBS	I	1,40	1,34	3,7	2,5	++				
	P2/ PBS	II	1,405	1,45	3,4	2,8	++				
	P2/ PBS	III	1,41	1,37	3,6	2,6	++				
	P2/ PBS	IV	1,39	1,15	4,3	1,9	++				
	P2/ PBS	V	1,41	1,25	4,0	2,2	++				
	P3/ PBS	I	1,40	0,91	5,5	0,7	++				
	P3/ PBS	II	1,40	0,86	5,8	0,4	++				
	P3/ PBS	III	1,39	0,88	5,7	0,5	++				
	P3/ PBS	IV	1,43	1,03	4,9	1,3	++				
P3/ PBS	V	1,425	1,53	3,3	2,9	++					
Wirkstoffgruppe	P1/ N3	I	1,5	0,91	5,5	0,7	++				
	P1/ N3	II	1,49	0,83	6,0	0,2	++				
	P1/ N3	III	1,495	2,11	2,4	3,8	++				
	P1/ N3	IV	1,505	1,89	2,6	3,6	++				
	P1/ N3	V	1,49	1,08	4,6	1,6	++				
	P2/ N3	I	1,46	1,36	3,7	2,5	++				
	P2/ N3	II	1,465	1,69	3,0	3,2	++				
	P2/ N3	III	1,465	1,85	2,7	3,5	++				
	P2/ N3	IV	1,475	1,88	2,7	3,5	++				
	P2/ N3	V	1,47	1,37	3,6	2,6	++				
	P3/ N3	I	1,88	1,97	2,5	3,7	++				
	P3/ N3	II	1,91	1,44	3,5	2,7	++				
	P3/ N3	III	1,595	1,67	3,0	3,2	++				
	P3/ N3	IV	1,615	2,29	2,2	4,0	++				
P3/ N3	V	1,625	2,11	2,4	3,8	++					

Therapiegruppe	V1/N3	I	1,49	1,37	3,6	2,6	++	-	-	-
	V1/N3	II	1,49	1,43	3,5	2,7	++	-	-	-
	V1/N3	III	1,50	1,59	3,1	3,1	++	-	-	-
	V1/N3	IV	1,49	1,37	3,6	2,6	++	-	-	-
	V1/N3	V	1,49	1,31	3,8	2,4	++	-	-	-
	V2/N3	I	1,48	1,39	3,6	2,6	++	-	-	-
	V2/N3	II	1,49	1,27	3,9	2,3	++	-	-	-
	V2/N3	III	1,475	1,48	3,4	2,8	++	-	-	-
	V2/N3	IV	1,48	2,29	2,2	4,0	++	-	-	-
	V2/N3	V	1,485	1,71	2,9	3,3	++	-	-	-
	V3/N3	I	1,70	3,29	1,5	4,7	++	-	-	-
	V3/N3	II	1,61	2,07	2,4	3,8	++	-	-	-
	V3/N3	III	1,59	1,28	3,9	2,3	++	-	-	-
	V3/N3	IV	1,665	2,69	1,9	4,3	++	-	-	-
Infektionsgruppe	V1/PBS	I	1,48	1,07	4,7	1,5	++	-	-	-
	V1/PBS	II	1,495	1,54	3,2	3,0	++	-	-	-
	V1/PBS	III	1,48	1,30	3,8	2,4	++	-	-	-
	V1/PBS	IV	1,50	1,07	4,7	1,5	++	-	-	-
	V1/PBS	V	1,48	0,95	5,3	0,9	++	-	-	-
	V2/PBS	I	1,48	1,45	3,4	2,8	++	-	-	-
	V2/PBS	II	1,49	2,10	2,4	3,8	++	-	-	-
	V2/PBS	III	1,475	1,63	3,1	3,1	++	-	-	-
	V2/PBS	IV	1,48	2,04	2,5	3,7	++	-	-	-
	V2/PBS	V	1,485	1,29	3,9	2,3	++	-	-	-
	V3/PBS	I	1,595	1,52	3,3	2,9	++	-	-	-
	V3/PBS	II	1,590	1,74	2,9	3,3	++	-	-	-
	V3/PBS	III	1,630	2,31	2,2	4,0	++	-	-	-
	V3/PBS	IV	1,68	3,28	1,5	4,7	++	-	-	-
V3/PBS	V	1,68	2,47	2,0	4,2	++	-	-	-	

* Inkubation mit 1 μ l DNase- Lösung und 0,8 μ l DNase- Puffer

** gemessen in NFW sowie gemessen in TE-Puffer, hier nicht dargestellt liegen alle Werte > 1,90

Tag 36 p.i.

Nr	Kennung	Lungen- abschnitt	UV- Verhältnis 260nm/ 280nm**	Konzentration der isolierte RNA gelöst in 20µl H ₂ O [µg/µl]	DNA Verdau*		Identifizierte Genprodukte			
					RNA- Lösung in µl	H ₂ O - Zugabe in µl	β- actin	IE 1	IE 3	GB
Therapiegruppe	V1/N3	I	1,58	1,33	3,8	2,4	++	-	-	-
	V1/N3	II	1,59	2,16	2,3	3,9	++	-	-	-
	V1/N3	III	1,715	1,67	3,0	3,2	++	-	-	-
	V1/N3	IV	1,676	1,99	2,5	3,7	++	--	-	-
	V1/N3	V	1,575	1,68	3,0	3,2	++	-	-	-
	V2/N3	I	1,56	1,96	2,6	3,6	++	-	-	-
	V2/N3	II	1,63	2,42	2,1	4,1	++	-	-	-
	V2/N3	III	1,58	2,60	1,9	4,3	++	-	-	-
	V2/N3	IV	1,632	2,52	2,0	4,2	++	-	-	-
	V2/N3	V	1,57	2,18	2,3	3,9	++	-	-	-
	V3/N3	I	2,07	1,39	3,6	2,6	++	-	-	-
	V3/N3	II	2,08	1,73	2,9	3,3	++	-	-	-
	V3/N3	III	2,08	1,71	2,9	3,3	++	-	-	-
	V3/N3	IV	2,05	2,50	2	4,2	++	-	-	-
	V3/N3	V	2,06	1,75	2,9	3,3	++	-	-	-
Infektionsgruppe	V1/PBS	I	1,64	1,96	2,6	3,6	++	++	-	-
	V1/PBS	II	1,54	1,51	3,3	2,9	++	-	-	-
	V1/PBS	III	1,63	3,10	1,6	4,6	++	-	-	-
	V1/PBS	IV	1,62	2,66	1,9	4,3	++	-	-	-
	V1/PBS	V	1,54	1,97	2,5	3,7	++	-	-	-
	V2/PBS	I	1,55	1,01	5,0	1,2	++	-	-	-
	V2/PBS	II	1,54	2,29	2,2	4,0	++	-	-	-
	V2/PBS	III	1,55	2,68	1,9	4,3	++	-	-	-
	V2/PBS	IV	1,56	1,73	2,9	3,3	++	-	-	-
	V2/PBS	V	1,676	1,76	2,8	3,4	++	-	-	-
	V3/PBS	I	1,94	0,85	5,9	0,3	++	-	-	-
	V3/PBS	II	1,98	1,24	4,0	2,2	++	-	-	-
	V3/PBS	III	2,08	1,51	3,3	2,9	++	-	-	-
	V3/PBS	IV	2,07	2,38	2,1	4,1	++	-	-	-
	V3/PBS	V	2,07	1,41	3,6	2,6	++	-	-	-

* Inkubation mit 1µl DNase- Lösung und 0,8 µl DNase- Puffer

** gemessen in NFW

Tag 43 p.i.

Nr	Kennung	Lungen- abschnitt	UV- Verhältnis 260nm/ 280nm**	Konzentration der isolierte RNA gelöst in 20µl H ₂ O [µg/µl]	DNA Verdau*		Identifizierte Genprodukte			
					RNA- Lösung in µl	H ₂ O - Zugabe in µl	β- actin	IE 1	IE 3	GB
Therapiegruppe	V1/N3	I	1,525	1,81	2,8	3,4	++	-	-	-
	V1/N3	II	1,55	1,52	3,3	2,9	++	-	-	-
	V1/N3	III	1,57	2,16	2,3	3,9	++	-	-	-
	V1/N3	IV	1,58	2,23	2,2	4,0	++	-	-	-
	V1/N3	V	1,585	2,71	1,8	4,4	++	-	-	-
	V2/N3	I	1,55	2,49	2,0	4,2	++	-	-	-
	V2/N3	II	1,53	1,01	5,0	1,2	++	-	-	-
	V2/N3	III	1,56	1,82	2,7	3,5	++	-	-	-
	V2/N3	IV	1,676	1,71	2,9	3,3	++	-	-	-
	V2/N3	V	1,605	4,62	1,1	5,1	++	-	-	-
Infektionsgruppe	V1/PBS	I	1,57	1,61	3,1	3,1	++	-	-	-
	V1/PBS	II	1,658	1,59	3,1	3,1	++	-	-	-
	V1/PBS	III	1,660	1,90	2,6	3,6	++	-	-	-
	V1/PBS	IV	1,602	3,44	1,5	4,7	++	-	-	-
	V1/PBS	V	1,65	2,54	2,0	4,2	++	-	-	-
	V2/PBS	I	1,89	0,95	5,3	0,9	++	-	-	-
	V2/PBS	II	1,676	1,46	3,4	2,8	++	-	-	-
	V2/PBS	III	1,54	1,86	2,7	3,5	++	-	-	-
	V2/PBS	IV	1,59	1,58	3,2	3,0	++	-	-	++
	V2/PBS	V	1,605	3,04	1,6	4,6	++	-	-	-

*Inkubation mit 1µl DNase- Lösung und 0,8 µl DNase- Puffer

** gemessen in NFW

Tag 50 p.i.

Nr	Kennung	Lungen- abschnitt	UV- Verhältnis 260nm/ 280nm**	Konzentration der isolierte RNA gelöst in 20µl H ₂ O [µg/µl]	DNA Verdau*		Identifizierte Genprodukte			
					RNA- Lösung in µl	H ₂ O - Zugabe in µl	β- actin	IE 1	IE 3	GB
Kontrollgruppe	P1/ PBS	I	1,55	1,9	n.b.					
	P1/ PBS	II	1,53	2,8						
	P1/ PBS	III	1,67	1,7						
	P1/ PBS	IV	1,59	2,5						
	P1/ PBS	V	1,58	0,1						
	P2/ PBS	I	1,62	0,7						
	P2/ PBS	II	1,62	1,4						
	P2/ PBS	III	1,62	2,4						
	P2/ PBS	IV	1,60	2,6						
	P2/ PBS	V	1,64	3,7						
	P3/ PBS	I	1,67	2,7						
	P3/ PBS	II	1,89	1,6						
	P3/ PBS	III	1,70	2,0						
	P3/ PBS	IV	1,65	2,4						
	P3/ PBS	V	1,70	1,9						
Wirkstoffgruppe	P1/ N3	I	1,57	2,4						
	P1/ N3	II	1,69	1,7						
	P1/ N3	III	1,78	2,9						
	P1/ N3	IV	1,79	2,9						
	P1/ N3	V	1,63	3,9						
	P2/ N3	I	1,65	0,5						
	P2/ N3	II	1,68	1,4						
	P2/ N3	III	1,89	2,3						
	P2/ N3	IV	1,56	5,8						
	P2/ N3	V	1,62	2,1						
	P3/ N3	I	1,65	1,8						
	P3/ N3	II	1,58	1,4						
	P3/ N3	III	1,53	1,7						
	P3/ N3	IV	1,67	2,0						
	P3/ N3	V	1,59	2,4						

Therapiegruppe	V1/N3	I	1,595	2,33	2,1	4,1	++	-	-	-
	V1/N3	II	1,635	3,13	1,6	4,6	++	-	-	-
	V1/N3	III	1,625	2,56	2,0	4,2	++	-	-	-
	V1/N3	IV	1,615	3,07	1,6	4,6	++	-	-	-
	V1/N3	V	1,595	2,18	2,3	3,9	++	-	-	-
	V2/N3	I	1,98	0,52	9,2	-3,4**	++	-	-	-
	V2/N3	II	1,58	1,79	2,8	3,4	++	-	-	-
	V2/N3	III	1,63	2,97	1,7	4,5	++	-	-	-
	V2/N3	IV	1,59	2,29	2,2	4,0	++	-	-	-
	V2/N3	V	1,59	2,64	1,9	4,3	++	-	-	-
	V3/N3	I	1,555	1,85	2,7	3,5	++	-	-	-
	V3/N3	II	1,53	0,83	6,0	0,2	++	-	-	-
	V3/N3	III	1,595	2,39	2,1	4,1	++	-	-	-
	V3/N3	IV	1,63	2,94	1,7	4,5	++	-	-	-
V3/N3	V	1,61	2,68	1,9	4,3	++	-	-	-	
Infektionsgruppe	V1/PBS	I	1,734	3,83	1,3	4,9	++	-	-	-
	V1/PBS	II	1,590	2,10	2,4	3,8	++	-	-	-
	V1/PBS	III	1,585	2,06	2,4	3,8	++	-	-	-
	V1/PBS	IV	1,555	1,82	2,7	3,5	++	-	-	-
	V1/PBS	V	1,58	1,58	3,2	3,0	++	-	-	-
	V2/PBS	I	1,99	0,83	6,2	0	++	+	-	-
	V2/PBS	II	1,52	0,95	5,3	0,9	++	-	-	-
	V2/PBS	III	1,585	2,01	2,5	3,7	++	-	-	-
	V2/PBS	IV	1,575	2,24	2,2	4,0	++	-	-	-
	V2/PBS	V	1,642	3,29	1,5	4,7	++	-	-	-
	V3/PBS	I	1,595	2,12	2,4	3,8	++	-	-	-
	V3/PBS	II	1,585	1,73	2,9	3,3	++	-	-	-
	V3/PBS	III	1,585	2,11	2,4	3,8	++	-	-	-
	V3/PBS	IV	1,575	2,23	2,2	4,0	++	-	-	-
V3/PBS	V	1,605	2,54	2,0	4,2	++	-	-	-	

*Inkubation mit 1 µl DNase- Lösung und 0,8 µl DNase- Puffer

** gemessen in NFW

n.b. nicht weiter bearbeitet

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Angulo, A., Ghazal, P., and Messerle, M., *The major immediate-early gene ie3 of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 11129-36.
2. Azad, R.F., Driver, V.B., Tanaka, K., Crooke, R.M., and Anderson, K.P., *Antiviral activity of a phosphorothioate oligonucleotide complementary to RNA of the human cytomegalovirus major immediate-early region*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(9): p. 1945-54.
3. Balfour, H.H., Jr., *Antiviral drugs*. N Engl J Med, 1999. **340**(16): p. 1255-68.
4. Britt, W.J. and Mach, M., *Human cytomegalovirus glycoproteins*. Intervirology, 1996. **39**(5-6): p. 401-12.
5. Bruggeman, C.A., *Cytomegalovirus and latency: an overview*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1993. **64**(6): p. 325-33.
6. Cannon, M.J. and Davis, K.F., *Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic*. BMC Public Health, 2005. **5**: p. 70.
7. Casado, J.L., Perez-Elias, M.J., Marti-Belda, P., Antela, A., Suarez, M., Ciancas, E., Frutos, B., Perez, M.D., and Guerrero, A., *Improved outcome of cytomegalovirus retinitis in AIDS patients after introduction of protease inhibitors*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998. **19**(2): p. 130-4.
8. Cobbs, C.S., Harkins, L., Samanta, M., Gillespie, G.Y., Bharara, S., King, P.H., Nabors, L.B., Cobbs, C.G., and Britt, W.J., *Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma*. Cancer Res, 2002. **62**(12): p. 3347-50.
9. Cook, C.H., Zhang, Y., McGuinness, B.J., Lahm, M.C., Sedmak, D.D., and Ferguson, R.M., *Intra-abdominal bacterial infection reactivates latent pulmonary cytomegalovirus in immunocompetent mice*. J Infect Dis, 2002. **185**(10): p. 1395-400.
10. Cook, C.H., Zhang, Y., Sedmak, D.D., Martin, L.C., Jewell, S., and Ferguson, R.M., *Pulmonary cytomegalovirus reactivation causes pathology in immunocompetent mice*. Crit Care Med, 2006. **34**(3): p. 842-9.
11. De Clercq, E., *Antivirals and antiviral strategies*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(9): p. 704-20.
12. De Clercq, E., *Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(4): p. 569-96.

13. De Clercq, E. and Field, H.J., *Antiviral prodrugs - the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy*. Br J Pharmacol, 2006. **147**(1): p. 1-11.
14. de Jong, M.D., Galasso, G.J., Gazzard, B., Griffiths, P.D., Jabs, D.A., Kern, E.R., and Spector, S.A., *Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus*. Antiviral Res, 1998. **39**(3): p. 141-62.
15. Docke, W.D., Prosch, S., Fietze, E., Kimel, V., Zuckermann, H., Klug, C., Syrbe, U., Kruger, D.H., von Baehr, R., and Volk, H.D., *Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor*. Lancet, 1994. **343**(8892): p. 268-9.
16. Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., and Liu, F., *Functional profiling of a human cytomegalovirus genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14223-8.
17. Einsele, H., Ehninger, G., Hebart, H., Wittkowski, K.M., Schuler, U., Jahn, G., Mackes, P., Herter, M., Klingebiel, T., Loffler, J., Wagner, S., and Muller, C.A., *Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation*. Blood, 1995. **86**(7): p. 2815-20.
18. Fleckenstein C., D.H., Preiser W., *Quantifizierung von CMV-DNA als diagnostisches Werkzeug zur verbesserten Behandlung und Überwachung von Risikopatienten*. J Lab Med, 2002. **26**(9/10): p. 486-494.
19. Fortunato, E.A., McElroy, A.K., Sanchez, I., and Spector, D.H., *Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus*. Trends Microbiol, 2000. **8**(3): p. 111-9.
20. Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., Britt, W.J., Boll, T.J., and Alford, C.A., *The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status*. N Engl J Med, 1992. **326**(10): p. 663-7.
21. Gerna, G., Parea, M., Percivalle, E., Zipeto, D., Silini, E., Barbarini, G., and Milanese, G., *Human cytomegalovirus viraemia in HIV-1-seropositive patients at various clinical stages of infection*. Aids, 1990. **4**(10): p. 1027-31.
22. Ghazal, P., Visser, A.E., Gustems, M., Garcia, R., Borst, E.M., Sullivan, K., Messerle, M., and Angulo, A., *Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 7182-94.
23. Grattan, M.T., Moreno-Cabral, C.E., Starnes, V.A., Oyer, P.E., Stinson, E.B., and Shumway, N.E., *Cytomegalovirus infection is associated with*

- cardiac allograft rejection and atherosclerosis*. *Jama*, 1989. **261**(24): p. 3561-6.
24. Hamprecht K., Jahn G., Schott H., WO 2004/000330 A1, 2003.
25. Hansen, K.K., Ricksten, A., Hofmann, B., Norrild, B., Olofsson, S., and Mathiesen, L., *Detection of cytomegalovirus DNA in serum correlates with clinical cytomegalovirus retinitis in AIDS*. *J Infect Dis*, 1994. **170**(5): p. 1271-4.
26. Harkins, L., Volk, A.L., Samanta, M., Mikolaenko, I., Britt, W.J., Bland, K.I., and Cobbs, C.S., *Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer*. *Lancet*, 2002. **360**(9345): p. 1557-63.
27. Heininger, A. and Hamprecht, K., *How cytomegalovirus reactivation could cause pulmonary pathology in septic hosts*. *Crit Care Med*, 2006. **34**(3): p. 929-30.
28. Heininger, A., Jahn, G., Engel, C., Notheisen, T., Unertl, K., and Hamprecht, K., *Human cytomegalovirus infections in nonimmunosuppressed critically ill patients*. *Crit Care Med*, 2001. **29**(3): p. 541-7.
29. Heininger, A., Vogel, U., Aepinus, C., and Hamprecht, K., *Disseminated fatal human cytomegalovirus disease after severe trauma*. *Crit Care Med*, 2000. **28**(2): p. 563-6.
30. Ho, M., *Epidemiology of cytomegalovirus infections*. *Rev Infect Dis*, 1990. **12 Suppl 7**: p. S701-10.
31. Jahn, G., Pohl, W., Plachter, B., von Hintzenstern, j., *Congenital cytomegalovirus infection with fatal outcome*. *Dtsch.Med. Wochenschr*, 1988. **133**: p. 424-427.
32. Jarvis, M.A. and Nelson, J.A., *Mechanisms of human cytomegalovirus persistence and latency*. *Front Biosci*, 2002. **7**: p. d1575-82.
33. Kern, E.R., *Animal Models for Cytomegalovirus Infection: Murine CMV*. *Handbook of animal models*. 1999: academic press.
34. Kern, E.R., Collins, D.J., Wan, W.B., Beadle, J.R., Hostetler, K.Y., and Quenelle, D.C., *Oral treatment of murine cytomegalovirus infections with ether lipid esters of cidofovir*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(9): p. 3516-22.
35. Kidd, I.M., Fox, J.C., Pillay, D., Charman, H., Griffiths, P.D., and Emery, V.C., *Provision of prognostic information in immunocompromised patients by routine application of the polymerase chain reaction for cytomegalovirus*. *Transplantation*, 1993. **56**(4): p. 867-71.

36. Kosugi, I., Shinmura, Y., Li, R.Y., Aiba-Masago, S., Baba, S., Miura, K., and Tsutsui, Y., *Murine cytomegalovirus induces apoptosis in non-infected cells of the developing mouse brain and blocks apoptosis in primary neuronal culture*. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1998. **96**(3): p. 239-47.
37. Krmptotic, A., Bubic, I., Polic, B., Lucin, P., and Jonjic, S., *Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection*. *Microbes Infect*, 2003. **5**(13): p. 1263-77.
38. Kurz, S.K., Rapp, M., Steffens, H.P., Grzimek, N.K., Schmalz, S., and Reddehase, M.J., *Focal transcriptional activity of murine cytomegalovirus during latency in the lungs*. *J Virol*, 1999. **73**(1): p. 482-94.
39. Kurz, S.K. and Reddehase, M.J., *Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence*. *J Virol*, 1999. **73**(10): p. 8612-22.
40. Landry, M.L. and Ferguson, D., *Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease*. *J Clin Microbiol*, 1993. **31**(11): p. 2851-6.
41. Lilley, B.N., Ploegh, H.L., and Tirabassi, R.S., *Human cytomegalovirus open reading frame TRL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein*. *J Virol*, 2001. **75**(22): p. 11218-21.
42. Ljungman, P., Deliliers, G.L., Platzbecker, U., Matthes-Martin, S., Bacigalupo, A., Einsele, H., Ullmann, J., Musso, M., Trenscher, R., Ribaud, P., Bornhauser, M., Cesaro, S., Crooks, B., Dekker, A., Gratecos, N., Klingebiel, T., Tagliaferri, E., Ullmann, A.J., Wacker, P., and Cordonnier, C., *Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation*. *Blood*, 2001. **97**(2): p. 388-92.
43. Ludwig P.S., Schott H., *US patent 6,787,525 B1*. 2004.
44. MacCormac, L.P. and Grundy, J.E., *Human cytomegalovirus induces an Fc gamma receptor (Fc gammaR) in endothelial cells and fibroblasts that is distinct from the human cellular Fc gammaRs*. *J Infect Dis*, 1996. **174**(6): p. 1151-61.
45. Melnick, J.L., Adam, E., and Debaeky, M.E., *Cytomegalovirus and atherosclerosis*. *Eur Heart J*, 1993. **14 Suppl K**: p. 30-8.
46. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.

47. Platzbecker, U., Bandt, D., Thiede, C., Helwig, A., Freiberg-Richter, J., Schuler, U., Plettig, R., Geissler, G., Rethwilm, A., Ehninger, G., and Bornhauser, M., *Successful preemptive cidofovir treatment for CMV antigenemia after dose-reduced conditioning and allogeneic blood stem cell transplantation*. *Transplantation*, 2001. **71**(7): p. 880-5.
48. Preiser, W., Rabenau, H.F., Vogel, J.U., Brixner, V., and Doerr, H.W., *Performance characteristics of an automated PCR assay for the quantification of cytomegalovirus DNA in plasma*. *J Virol Methods*, 2002. **101**(1-2): p. 149-57.
49. Prosch, S., Wendt, C.E., Reinke, P., Priemer, C., Oppert, M., Kruger, D.H., Volk, H.D., and Docke, W.D., *A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation*. *Virology*, 2000. **272**(2): p. 357-65.
50. Radonic, A., Thulke, S., Bae, H.G., Muller, M.A., Siegert, W., and Nitsche, A., *Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections*. *Virol J*, 2005. **2**: p. 7.
51. Rahman, A.A., Teschner, M., Sethi, K.K., and Brandis, H., *Appearance of IgG (Fc) receptor(s) on cultured human fibroblasts infected with human cytomegalovirus*. *J Immunol*, 1976. **117**(1): p. 253-8.
52. Rawlinson, W.D., Farrell, H.E., and Barrell, B.G., *Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus*. *J Virol*, 1996. **70**(12): p. 8833-49.
53. Reddehase, M.J., Podlech, J., and Grzimek, N.K., *Mouse models of cytomegalovirus latency: overview*. *J Clin Virol*, 2002. **25 Suppl 2**: p. S23-36.
54. Reefsclaeger, J., Bender, W., Hallenberger, S., Weber, O., Eckenberg, P., Goldmann, S., Haerter, M., Buerger, I., Trappe, J., Herrington, J.A., Haebich, D., and Ruebsamen-Waigmann, H., *Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action*. *J Antimicrob Chemother*, 2001. **48**(6): p. 757-67.
55. Revello, M.G. and Gerna, G., *Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection*. *J Clin Virol*, 2004. **29**(2): p. 71-83.
56. Revello, M.G., Percivalle, E., Zavattoni, M., Parea, M., Grossi, P., and Gerna, G., *Detection of human cytomegalovirus immediate early antigen in leukocytes as a marker of viremia in immunocompromised patients*. *J Med Virol*, 1989. **29**(2): p. 88-93.

57. Reyburn, H.T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D.M., Pazmany, L., and Strominger, J.L., *The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 514-7.
58. Roizman, B. and Sears, A.E., *An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency*. Annu Rev Microbiol, 1987. **41**: p. 543-71.
59. Rubin, R.H., *Preemptive therapy in immunocompromised hosts*. N Engl J Med, 1991. **324**(15): p. 1057-9.
60. Rybak, R.J., Zemlicka, J., Qiu, Y.L., Hartline, C.B., and Kern, E.R., *Effective treatment of murine cytomegalovirus infections with methylenecyclopropane analogues of nucleosides*. Antiviral Res, 1999. **43**(3): p. 175-88.
61. Salmon, D., Lacassin, F., Harzic, M., Leport, C., Perronne, C., Bricaire, F., Brun-Vezinet, F., and Vilde, J.L., *Predictive value of cytomegalovirus viraemia for the occurrence of CMV organ involvement in AIDS*. J Med Virol, 1990. **32**(3): p. 160-3.
62. Samanta, M., Harkins, L., Klemm, K., Britt, W.J., and Cobbs, C.S., *High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma*. J Urol, 2003. **170**(3): p. 998-1002.
63. Scott, G.M., Ng, H.L., Morton, C.J., Parker, M.W., and Rawlinson, W.D., *Murine cytomegalovirus resistant to antivirals has genetic correlates with human cytomegalovirus*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 8): p. 2141-51.
64. Seeger J., *persönliche Information*. 2006.
65. Simmons, R.L., Matas, A.J., Rattazzi, L.C., Balfour, H.H., Jr., Howard, J.R., and Najarian, J.S., *Clinical characteristics of the lethal cytomegalovirus infection following renal transplantation*. Surgery, 1977. **82**(5): p. 537-46.
66. Simon, C.O., Seckert, C.K., Dreis, D., Reddehase, M.J., and Grzimek, N.K., *Role for tumor necrosis factor alpha in murine cytomegalovirus transcriptional reactivation in latently infected lungs*. J Virol, 2005. **79**(1): p. 326-40.
67. Smee, D.F., Morris, J.L., Leonhardt, J.A., Mead, J.R., Holy, A., and Sidwell, R.W., *Treatment of murine cytomegalovirus infections in severe combined immunodeficient mice with ganciclovir, (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine, interferon, and bropirimine*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(9): p. 1837-42.
68. Smee, D.F. and Reist, E.J., *Potent anti-murine cytomegalovirus activity and reduced nephrotoxicity of ganciclovir cyclic phosphonate*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(8): p. 1964-6.

69. Smith, K.L. and Dunstan, R.A., *PCR detection of cytomegalovirus: a review*. Br J Haematol, 1993. **84**(2): p. 187-90.
70. Soderberg-Naucler, C., *Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer?* J Intern Med, 2006. **259**(3): p. 219-46.
71. Spector, S.A., Merrill, R., Wolf, D., and Dankner, W.M., *Detection of human cytomegalovirus in plasma of AIDS patients during acute visceral disease by DNA amplification*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(9): p. 2359-65.
72. Spiller, O.B., Morgan, B.P., Tufaro, F., and Devine, D.V., *Altered expression of host-encoded complement regulators on human cytomegalovirus-infected cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(7): p. 1532-8.
73. Stein, J., Volk, H.D., Liebenthal, C., Kruger, D.H., and Prosch, S., *Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 11): p. 2333-8.
74. Torriani, F.J., Freeman, W.R., Macdonald, J.C., Karavellas, M.P., Durand, D.M., Jeffrey, D.D., Meylan, P.R., and Schrier, R.D., *CMV retinitis recurs after stopping treatment in virological and immunological failures of potent antiretroviral therapy*. Aids, 2000. **14**(2): p. 173-80.
75. Trapp, J., Dieterich, H.J., Unertl, K., Haeberle, H., *Cytokine-induced Reactivation of Murine Cytomegalovirus in Lung Tissue of Healthy Mice*. Poster, IUMS, San Francisco, 2005.
76. van der Meer, J.T., Drew, W.L., Bowden, R.A., Galasso, G.J., Griffiths, P.D., Jabs, D.A., Katlama, C., Spector, S.A., and Whitley, R.J., *Summary of the International Consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and Prophylaxis and Cytomegalovirus Infection*. Antiviral Res, 1996. **32**(3): p. 119-40.
77. Vliegen, I., Hengreen, S., Grauls, G., Bruggeman, C., and Stassen, F., *Improved detection and quantification of mouse cytomegalovirus by real-time PCR*. Virus Res, 2003. **98**(1): p. 17-25.
78. Weber, O., Bender, W., Eckenberg, P., Goldmann, S., Haerter, M., Hallenberger, S., Henninger, K., Reefschlager, J., Trappe, J., Witt-Laido, A., and Ruebsamen-Waigmann, H., *Inhibition of murine cytomegalovirus and human cytomegalovirus by a novel non-nucleosidic compound in vivo*. Antiviral Res, 2001. **49**(3): p. 179-89.
79. Wilson, E.J., Medearis, D.N., Jr., Hansen, L.A., and Rubin, R.H., *9-(1-3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine prevents death but not immunity in murine cytomegalovirus-infected normal and immunosuppressed BALB/c mice*. Antimicrob Agents Chemother, 1987. **31**(7): p. 1017-20.

80. Winkler, I., Winkelmann, E., Scholl, T., Rosner, M., Jahne, G., and Helsberg, M., *Antiviral activity and pharmacokinetics of HOE 602, an acyclic nucleoside, in animal models*. Antiviral Res, 1990. **14**(2): p. 61-73.
81. Yurochko, A.D., Kowalik, T.F., Huong, S.M., and Huang, E.S., *Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5391-400.
82. Zurlo, J.J., O'Neill, D., Polis, M.A., Manischewitz, J., Yarchoan, R., Baseler, M., Lane, H.C., and Masur, H., *Lack of clinical utility of cytomegalovirus blood and urine cultures in patients with HIV infection*. Ann Intern Med, 1993. **118**(1): p. 12-7.

8 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung anästhesiologische Forschung der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Unertl durchgeführt.

Für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Material möchte ich ganz herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. med. H. Häberle für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. rer. nat. J. Trapp für die Einführung in die Handhabung des Mausmodells.

Bei den Mitarbeiter/Innen im Labor, die mir mit Rat und Tat beigestanden sind und für die gute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Herrn PD Dr. U. Vogel, Institut für Pathologie der Universität Tübingen, danke ich für die histopathologische Befundung, Herrn M. Eichner, Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen für die statistische Beratung und meinem Vater, Prof. Dr. H. Schott, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen für die Überlassung des N₃-Wirkstoffs.

9 LEBENS LAUF

S A R A H J U L I A S C H O T T

- Geburtstag: 17. Oktober 1981
- Geburtsort: Tübingen
- Eltern: Prof. Dr. rer. nat Herbert Schott, Dipl.–Volkswirtin Monika Schott
- Bruder: Timm C. Schott, Zahnarzt

SCHULISCHE AUSBILDUNG

- 1988 - 1992 Grundschule auf der Wanne, Tübingen
1992 - 1997 Uhlandgymnasium Tübingen
1997 - 1998 Bootham School York, GB
1998 - 2001 Keplergymnasium Tübingen
22. 06. 2001 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

TEILNAHME AN WETTBEWERBEN WÄHREND DER SCHULZEIT

1. Umweltwettbewerb der Sparkassen

1993 zum Thema „Müll“, 3. Bundessiegerin/ 1994 zum Thema „Artenschutz“, 3. Bundessiegerin/ 1995 zum Thema „Zeit für Umwelt und Natur“, 2. Landessiegerin

2. Umweltwettbewerb des Umweltministeriums Baden-Württemberg

1996 Sonderpreis

3. Wettbewerb „Jugend forscht“ Fachgebiet Chemie

1999/2000 mit der Arbeit „Gewinnung von Wirkstoffen aus nicht mehr verwendbaren Medikamenten am Beispiel des Anti-AIDS-Virusstatikums AZT“

2. Landessiegerin und YEER-Sonderpreis.

2000/2001 mit der Arbeit „Gewinnung von Wirkstoffen aus Altmedikamenten“
3. Bundessiegerin, Sonderpreis Umwelt, WYRE-Sonderpreis und Sonderpreis des Deutschen Museums

4. Auszeichnungen

09/2000 Auszeichnung vom Fonds der Chemischen Industrie auf dem Jung Chemiker Forum der Gesellschaft Deutscher Chemiker in Hamburg für einen hervorragenden Vortrag, Sonderpreis der BASF.

09/2001 BundesUmweltWettbewerb 2000/2001, Thema: „Recycling von Altmedikamenten“ Sonderpreis „Umwelt und Gesundheit“.

10/2001 Forschungsförderpreis und Ehrennadel in Gold der Bläse-Stiftung für die „beachtlichen, erfinderischen Leistungen zur Verbesserung unserer Lebensqualität“.

STUDIUM DER HUMANMEDIZIN WS 2001/2002 BIS 11.2007

10.09.2003 Erlangung der ärztlichen Vorprüfung

Famulaturen

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf:

2003 Radiologisches Zentrum, Prof. Dr. G. Adam;

2004 Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Prof. Dr. I. Moll

2004 Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Hämatologisch-onkologisches Zentrum, Prof. Dr. G. Ehninger

2004 Reha Klinik Damp, Abt. Innere Medizin, Dr. L. Jindrichovsky

Experimentelle Doktorarbeit

11.2005 - 07.2006 "Aktivität des neuen antiviralen Multiplex-Wirkstoffs AZT-Lipid-PFA im Mausmodell der intranasalen Cytomegalovirusinfektion", an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universität Tübingen, Prof. Dr. K. Unertl

Praktisches Jahr (07.2006 - 07.2007)

Erstes Tertial Innere Medizin an der Brown University Providence, Rhode Island, USA Clerkship Internal Medicine, Elective in Cardiology und Infectious Disease.

Zweites Tertial Wahlfach Klinische Pathologie am Institut für Pathologie der Universität Tübingen, Prof. Dr. B. Bültmann

Drittes Tertial Chirurgie an der BG Unfallklinik Tübingen, Prof. Dr. K. Weise und der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Prof. Dr. A. Königsrainer

08.11.2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Zusätzliches Engagement

WS 2003/2004 bis WS 2007/2008 Semester- und PJ-Sprecherin.

2002 – 2005 studentische Ortsgruppenleiterin Tübingen der Studienstiftung des Deutschen Volkes

2006 Teilnahme am versuchstierkundlichen Privatissimum zur Erlangung tierschutz- und versuchstierkundlicher Fachkenntnisse nach § 9 Abs. 1 des TSchG.

STIPENDIEN UND DRITTMITELFÖRDERUNG

2001 Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes

2001 – 2002 Projektförderung (20.000 DM) „Gewinnung von Wirkstoffen aus Altmedikamenten“ durch die Deutsche Kinder- und Jugendstiftung Berlin (www.dkjs.de, www.jijt.de)

08. - 10. 2005 von der Studienstiftung des Deutschen Volkes geförderter Forschungsaufenthalt an der VU University of Amsterdam, The Netherlands, Department of Medical Oncology, Prof. Dr. G.J. Peters

2006 Stipendium der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen für einen viermonatigen Auslandsaufenthalt an der Brown Medical School, Providence, RI, USA

2006 5-monatiges USA-Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes

16 Einladungen zur Teilnahme an Seminaren, Kursen, Ausstellungen

VERÖFFENTLICHUNGEN

Fachzeitschriften

1. *Bijnsdorp, IV., Schott, H., Schwendener, RA., Fichtner, I., Smid, K. **Schott, S., Laan, AC., Peters, GJ.*** In vivo and in vitro activity and mechanism of action of the multidrug Cytarabine-L-Fluorodeoxyuridine, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, (2007 im Druck)
2. ***Schott, SJ.*** Aktivität des neuen antiviralen Multiplex-Wirkstoffs AZT-Lipid-PFA im Mausmodell der intranasalen Cytomegalovirusinfektion, Inaugural Doktorarbeit, Universität Tübingen, (2007 im Druck)
3. ***Schott, S.*** Altmedikamente als Rohstoffe- Isolierung von antiviralen Wirkstoffen aus Altmedikamenten; Junge Wissenschaft, **65**, 15-18, (2002).
4. ***Schott, S.*** Wirkstoff-Recycling aus Altmedikamenten; Pharm. Ztg. **146**, **42**, 24-26, (2001).

Poster

1. *Bijnsdorp, IV., Schott, H., **Schott S.**, Schwendener, RA., Fichtner, I., Smid, K., Laan, AC., Peters, GJ.* In vitro cytotoxicity and mechanism of action of multidrugs, Poster at the PAMM Meeting in Edinburgh, (2006).