

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. L. Gürtler)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema: Untersuchungen zur Hemmung der Adenovirusreplikation durch
modifizierte Nukleosidanaloga auf zellulärer und molekularer Ebene.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2001

vorgelegt von:
Stefan Kurek
geb. am: 17.09.1968
in: Bernau

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Mentel

2. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Oberender

Raum: Friedrich Loeffler Institut der Medizinischen Mikrobiologie,
Seminarraum

Tag der Disputation: 06. 06. 2001

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. ADENOVIREN	2
2.1. <i>Aufbau und Eigenschaften von Adenoviren</i>	2
2.2. <i>Pathogenese und Klinik von Adenovirusinfektionen</i>	9
3. STRATEGIEN ZUR ENTWICKLUNG VON ANTIVIRALIA	13
4. ZIELSTELLUNG	24
5. MATERIAL UND METHODEN	25
5.1. TESTSUBSTANZEN.....	25
5.2. ZELLEN	28
5.2.1. <i>FL-Zellen</i>	28
5.2.2. <i>Spodoptera frugiperda-Zellen (Sf9)</i>	28
5.3. VIREN	28
5.3.1. <i>Adenoviren</i>	28
5.3.2. <i>Rekombinantes Ad pol Baculovirus</i>	28
5.4. ANTIVIRALE TESTUNGEN	29
5.4.1. <i>Fluoreszenzfokusreduktionsassay</i>	29
5.4.2. <i>Bestimmung der viralen DNA-Synthese</i>	31
5.4.3. <i>Bestimmung der Polymeraseaktivität</i>	32
5.4.3.1. <i>Präparation von rekombinanter Adenovirus Polymerase</i>	32
5.4.3.2. <i>Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)</i>	33
5.4.3.3. <i>Polymeraseassay</i>	33

6. ERGEBNISSE.....	35
6.1. EINFLUSS DER NUKLEOSIDANALOGA AUF DIE VIRUS-REPLIKATION VON ADV 7 UND ADV 19 IN FL-ZELLEN	35
6.1.1. Hemmbarkeit der Replikation von ADV 7.....	35
6.1.2. Hemmbarkeit der Replikation von ADV 19.....	36
6.2. EINFLUSS VON DDC AUF DIE DNA-SYNTHESE.....	41
6.3. UNTERSUCHUNGEN ZUR ETABLIERUNG EINES POLYMERASEASSAY	43
6.3.1. Gewinnung von ADV-Polymerase	43
6.3.2. Charakterisierung der Polymeraseextrakte mit <i>Polyacrylamidgel-Elektrophorese</i>	43
6.3.3. Enzymkinetische Charakterisierung der rekombinanten <i>ADV-Polymerasepräparation für den Einsatz im in-vitro-</i> <i>Polymeraseassay</i>	45
6.3.3.1. Einfluss der Proteinkonzentration auf die Inkorporation von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ dATP}$	45
6.3.3.2. Einfluss der Inkubationszeit auf die Inkorporation von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ dATP}$	46
6.3.3.3. Einfluss von Aphidicolin auf die Polymeraseaktivität	47
6.4. EVALUIERUNG DER NUKLEOSIDANALOGA IM POLYMERASEASSAY	48
7. DISKUSSION.....	50
8. LITERATURVERZEICHNIS	65
9. ZUSAMMENFASSUNG	78
10. ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	80

1. Einleitung

Trotz der erfolgreichen Zurückdrängung von virusbedingten Infektionskrankheiten durch prophylaktische Maßnahmen, insbesondere erfolgreiche Vakzinationsprogramme bzw. der Eradizierung im Falle der Pockenviren sind die Möglichkeiten einer gezielten Therapie viraler Infektionskrankheiten immer noch sehr beschränkt. Im Gegensatz zu einer fast unübersehbaren Vielzahl von Antibiotika gegen bakterielle Infektionen gibt es vergleichsweise wenige zugelassene Medikamente gegen virale Infektionen.

Bemerkenswert sind die Fortschritte, die auf der Suche nach therapeutischen Ansätzen gegen das humane Immunschwächevirus (HIV) gemacht worden sind. Die Synthese und Erprobung von neuen Substanzen gegen HIV übt eine starke Katalysatorwirkung für die gesamte Antiviraliaforschung aus (De Clercq, 1997).

Probleme bei der klinische Anwendung von potentiell antiviral wirksamen Substanzen sind vor allem starke Nebenwirkungen.

Die Notwendigkeit, die Suche nach Antiviralia fortzusetzen bzw. zu verstärken wird auch dadurch deutlich, dass bereits erste Resistenzentwicklungen bei Viren gegenüber eingesetzten Medikamenten beobachtet werden (Reusser, 1996; Tisdale, 2000).

Adenoviren (ADV) sind ubiquitär verbreitet und mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert. Von schweren, durch ADV-verursachten Bronchopneumonien sind insbesondere Säuglinge und Kleinkinder mit herabgesetzter Immunabwehr betroffen. Aber auch bei AIDS-Patienten und Transplantatempfängern spielen ADV-Infektionen eine Rolle. Es gibt bisher keine lizenzierte Vakzine oder Chemotherapie zur Prophylaxe oder Therapie von ADV-Infektionen.

2. Adenoviren

2.1. Aufbau und Eigenschaften von Adenoviren

Humane Adenoviren gehören zur Gattung Mastadenovirus der Familie Adenoviridae. Gegenwärtig sind 49 verschiedene Serotypen bekannt. Es sind hüllenlose dsDNA-Viren mit einem ikosaedral, symmetrisch aufgebautem Kapsid.

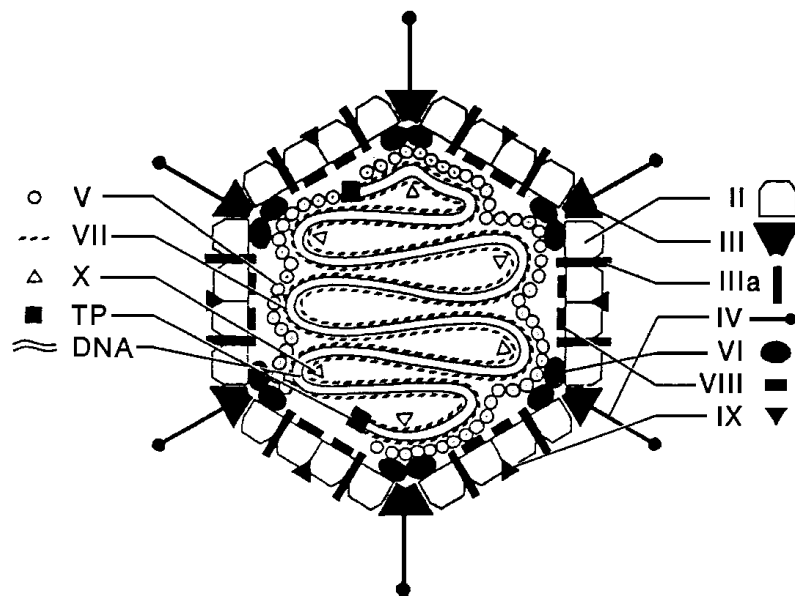


Abb. 1: Adenovirusmodell (nach Shenk, 1996)

Grundlage für die Einteilung in Serotypen ist die Neutralisationsreaktion. Eine Zuordnung der 49 Serotypen zu Subgruppen (A-F) erfolgt auf der Basis von Homologie-Untersuchungen mit der DNA-Hybridisierung sowie aufgrund der Fähigkeit zur Hämagglutination durch Bindung von Erythrozyten an das Fiberprotein der Viren (Crawford-Miksza *et al.*, 1996; Francki *et al.*, 1991).

Das Adenoviruskapsid ist symmetrisch, der Virusdurchmesser beträgt 70-100 nm. Das Kapsid besteht aus 252 Komponenten. Die Flächen und Kanten des Ikosaeders werden als Hexon bezeichnet und bestehen aus 240 Kapsomeren. Die an den Eckpunkten befindlichen 12 Kapsomeren werden als Pentone bezeichnet (Abb. 1).

Das Hexon besteht aus drei Molekülen des Polypeptid II. Die 3 Untereinheiten sind zur Stabilisierung in β -Faltblattstruktur zusammengelagert. Die Stützung und Verbindung des Kapsids mit dem Viruskern wird durch die Polypeptide VI, VIII und IX realisiert. Die Hexonstruktur bildet die Grundseiten des ikosaedralen Viruskörpers.

Vom Penton ragt das Fiberprotein antennenförmig in den Raum. Das Penton, eine komplexe Struktur aus dem Polypeptid III, bildet die Basis des Kapsids. Es enthält in vielen Serotypen eine hochkonservierte Aminosäuresequenz (Arg-Gly-Asp), die für die Anheftung des Virus an die Zelle nötig ist. Das Fiberprotein ist ein trimeres Protein des Polypeptids IV, das wie das Hexon in β -Faltblattstruktur angelegt ist. Die Basis des Fiberproteins ist mit dem Penton verankert. Der Schaft besteht aus Aminosäuresequenzen, die bei verschiedenen Serotypen in ihrer Länge differieren. Das Ende des Fiberproteins wird von einer knollenförmigen Auftreibung, dem Fiberkopf, gebildet. Penton und Fiberprotein werden Pentonkapsomer genannt (Henry *et al.*, 1994).

Der Kern des Virions enthält die genetische Information als DNA und Polypeptide, die zur Organisation und Realisierung der genetischen Information nötig sind. Alle Kernproteine sind mit der DNA verbunden. Die DNA des Adenovirus ist linear, doppelsträngig und mit dem Polypeptid VII assoziiert. Es ist das Hauptprotein und dient wahrscheinlich als Histon, um das die DNA gewunden ist. Die Verbindung zum Kapsid wird vom Polypeptid VI gebildet. Es bindet mit

dem Penton und der DNA und sichert so die räumliche Beziehung von Kern und Hülle zueinander.

Das terminale Protein ist kovalent durch eine Phosphodiesterbrücke mit dem 5'-Ende der DNA verbunden. Es vermittelt die zirkuläre Anordnung der DNA und dient als Primer bei der Replikation. Die DNA hat an beiden Enden auf einer Länge von 100 bis 140 bp „inverted terminal repeats“, einander komplementäre Abschnitte, die Einzelsträngen eine zirkuläre Anordnung erlauben. Diese zirkuläre Struktur hat Bedeutung für die Replikation von Einzelsträngen.

Das Genom des Adenovirus wird in frühe und späte Regionen unterteilt (Abb. 2). „Early“ Virusgenprodukte vermitteln virale Genexpression und DNA Replikation, blockieren Apoptose und antagonisieren eine Reihe von antiviralen Wirkmechanismen (Tollefson *et al.*, 1991).

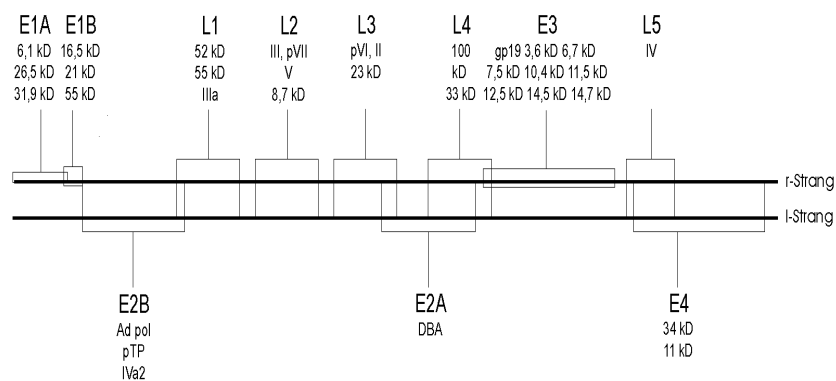


Abb. 2: Schematische Darstellung der kodierenden Bereiche des Adenovirusgenoms (nach Mentel und Döhner, 1994)

Der Replikationszyklus der Adenoviren kann in zwei Phasen eingeteilt werden, wobei der Beginn der DNA-Replikation als trennendes Ereignis zwischen früher und später Phase angesehen wird. Zur ersten oder frühen Phase gehören die Adsorption und anschließende Penetration des Virions in die Wirtszelle, der Transport und die Einschleusung der DNA in den Zellkern sowie die Transkription und Translation von frühen Genen, die für die Replikation der DNA wichtig sind. Die späte Phase umfasst dann die DNA-Replikation, die Synthese und Reifung viraler Proteine und die Zusammensetzung der Nachkommen. Ein Infektionszyklus ist spätestens nach 20 bis 24 Stunden beendet (Shenk, 1996).

Die Bindung der Viruspartikel an die Zelle erfolgt über das Fiberprotein. Ein Konzept für Virus-Zell-Interaktion ist, dass multiple Rezeptor-Bindungsabläufe für einen effizienten Zelleintritt erforderlich sind. ADV gehört mit zu den ersten Viren, für die eine Assoziation mit verschiedenen Rezeptoren gezeigt werden konnte.

Die Mehrzahl der ADV bindet über ein 46 kD Membranglykoprotein, das auf vielen Gewebetypen *in vivo* exprimiert wird. Dieses Protein, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamily wird auch CAR (Coxsackie Adenovirus Receptor) genannt, da es auch die Anheftung von Coxsackie B-Viren vermittelt. Trotz dieser Erkenntnisse bestehen weiterhin offene Fragen für das primäre Attachment von ADV. So ist nicht klar, welche Rolle dem CAR bei normalen Wirtszellfunktionen zukommt und wie seine Expression in den verschiedenen Geweben reguliert wird.

Es muß weiterhin das Vorhandensein alternativer ADV-Rezeptoren diskutiert werden, da CAR durch viele ADV-Typen erkannt wird, aber z.B. nicht als Rezeptor für bestimmte Subgruppen wie B (ADV 3, ADV 7) oder D (ADV 8, ADV 37) dient (Nemerow *et al.*, 1999).

Die Virusinternalisation wird durch die Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ in Assoziation mit dem Pentonbasisprotein vollzogen.

Nach der Adsorption kommt es zur Bildung von Endosomen, die das Virus enthalten und in das Zytosol transportieren. Die Geschwindigkeit ist vom pH-Wert in den Endosomen abhängig. Nach Lyse der Endosomen, die bei saurem pH-Wert gefördert wird, werden die Viruspartikel mit Teilen des Mikrotubulussystems der Zelle verbunden. Die Interaktion kommt wahrscheinlich über das Hexon zustande. Das Virion wird zum Nukleus transportiert. Während des gesamten Internalisierungsprozesses erfolgt eine schrittweise Dissoziation der viralen Polypeptide, so dass die stabile Proteinumhüllung der DNA abgebaut wird und die DNA in den Nukleus transportiert werden kann. Dieser Vorgang wird von der Protease L3/p23 vermittelt. Die Penton/Integrin Interaktion führt zu einer Konformationsänderung, wodurch das aktive Zentrum der Protease mit dem Protein VI in Verbindung kommt. Außerdem führt der Eintritt des Virion in die reduzierende Umgebung des Endosoms zu einer Aktivierung des Enzyms. Durch enzymatischen Abbau des Protein VI wird die Verbindung der DNA mit dem Penton gelöst und die DNA kann frei vom Kapsid in den Zellkern gelangen (Greber *et al.*, 1996). Hier vermittelt das terminale Protein eine Assoziation der viralen DNA mit der nuklearen Matrix.

Die Synthese von Genprodukten, die zur DNA-Replikation nötig sind, wird durch zwei Polypeptide der E1A Region, das 12S und 13S Polypeptid, katalysiert. Sie weisen beide gleichermaßen drei konservierte Regionen in ihrer Struktur auf (CR1, CR2 und CR3). Weiterhin sind Polypeptide der E2 und der E4 Region von Bedeutung. Es erfolgt eine Wechselwirkung mit einer großen Anzahl von zellulären Faktoren, die ihrerseits aktiviert, die DNA-Transkription vorbereiten (Shenk, 1996).

Proteine der E3 Region (14,7, 10,4/14,5 und gp19K) greifen in die Abwehrvorgänge des Organismus ein. Sie besitzen keine Funktion bei der Replikation der viralen DNA. Ihre Aufgabe ist es, die Zell-Lyse von ADV-infizierten Zellen durch den Tumornekrosefaktor und die Expression von MHC-Klasse I Antigenen zu verhindern. Dadurch sind persistente Infektionen möglich. Außerdem bewirkt der Tumornekrosefaktor eine verstärkte Genexpression der E3 Region. Der Proteinkomplex 10,4/14,5 führt zu einer verminderten Expression des EGF (Epidermal growth factor) an der Zelloberfläche. Damit wird die Signaltransduktion verringert, die den Zellstoffwechsel aktiviert (Deryckere *et al.*, 1995; Gooding *et al.*, 1991; Wold und Gooding, 1991).

Etwa 5 Stunden nach der Infektion beginnt die DNA-Replikation im Zellkern. Nur einer von den beiden DNA-Strängen dient als Template für die Synthese. So sind die Produkte der Replikation ein Duplex- und ein Einzelstrang.

Es bildet sich ein Doppelstrang, der aus Mutter- und Tochterstrang besteht. Anschließend wird der Einzelstrang komplementiert.

Zur Initiation der Reaktion sind ein zelluläres Protein (ORP-A) und zwei Proteine der E2 Region nötig. Das terminale Protein, als präterminales Protein synthetisiert und dann durch Proteolyse zu einem 55 kD Fragment abgebaut, ist kovalent mit dem 5'-Ende des DNA-Stranges verbunden (Challberg *et al.*, 1980; Rekosh *et al.*, 1977). Das andere Protein ist die Adenovirus DNA-Polymerase, ein 140 kD Protein. Sie hat 5'-3'-Polymeraseaktivität und 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Diese 3 Faktoren binden an die Domäne A der DNA. Die Domäne B bindet den nuklearen Faktor I (NFI), ein zelluläres Protein. Diese Interaktion wird durch das DNA-bindende Protein stimuliert. Es wird von der E2 Region codiert. Die Bindung des NFI führt zu einer Stabilisierung des

Komplexes aus Polymerase und präterminalem Protein (Chen *et al.*, 1990; Mul und Van der Vliet, 1992; Temperley und Hay, 1992). An die Domäne C bindet der nukleare Faktor III (NFIII). Insgesamt wird durch NFI und NFIII die Effektivität der DNA-Bildung erhöht. Das präterminale Protein dient als Primer. Die Bindung erfolgt am 5'-Ende des DNA-Stranges an eine dCMP Gruppe (Challberg *et al.*, 1982; Tamanoi und Stillman, 1982). Es kommt zur Komplexbildung mit der DNA-Polymerase. Zur Verlängerung der Kette sind außer der Polymerase und dem DNA-bindenden Protein noch ein zelluläres Protein, der nukleare Faktor II nötig. Es handelt sich um eine Topoisomerasefunktion, die benötigt wird nach intensiver DNA-Replikation.

Die Expression der späten Genprodukte beginnt mit der Bildung von 18 verschiedenen m-RNA, die in 5 Gruppen von L1 bis L5 eingeteilt werden. Sie haben einen gemeinsamen Promotor. Die Akkumulation zellulärer m-RNA ist dann vollkommen blockiert, so dass keine wirtseigene Proteinsynthese erfolgt. Außerdem wirken eine Reihe von Faktoren regulierend auf die Transkription der viralen m-RNA.

Nach DNA-Replikation und Akkumulation viraler Polypeptide in der Zelle kommt es zur Formung neuer Viruspartikel. Die Zusammenlagerung der Hexon- und Pentonbasisproteine und die Verbindung mit den trimeren Fiberproteinen erfolgt im Zellkern. Der Eintritt der DNA in die leere Hülle erfolgt unter Vermittlung einer Erkennungssequenz von 400 Basenpaaren am Ende der DNA. Durch den Einbau der Pentone wird die Virushülle geschlossen.

Das E3 11.6 K Protein, das erst in der späten Phase exprimiert wird, führt zum Zelltod durch Lyse der Zelle und damit zur Freisetzung der Viren (Tollefson *et al.*, 1996).

2.2. Pathogenese und Klinik von Adenovirusinfektionen

Adenoviren kommen ubiquitär vor und ihre Übertragung kann direkt durch Inhalation oder orale Aufnahme von infektiösen Partikeln und indirekt über kontaminierte Hände, Taschentücher, Nahrungsmittel und fäkal-oral erfolgen. Die Inkubationszeit liegt bei 6 Tagen. Die Virusausscheidung beginnt wenige Tage vor Einsetzen der ersten Symptome und kann bis zu 18 Monaten dauern.

Tab. 1: ADV-verursachte Erkrankungen und häufige Serotypen

Organsystem	Erkrankung	häufige Serotypen
respiratorische Erkrankungen	akute febrile Pharyngitis	1, 2, 3, 5, 6, 7
	Pharyngokonjunktivalfieber	3, 7, 14
	akute respiratorische Erkrankung	3, 4, 7, 14, 21
	Pneumonie	1, 2, 3, 4, 7
ophthalmologische Erkrankungen	follikuläre Konjunktivitis	3, 4, 7
	epidemische Keratokonjunktivitis	3, 7, 19, 8
	Pharyngokonjunktivalfieber	3, 7, 14
gastrointestinale Erkrankungen	Gastroenteritis	40, 41
	Hepatitis (Lebertransplantate)	1, 2, 5
	urogenitale Erkrankungen	hämorrhagische Zystitis

Das epidemiologische Verhalten ist vom Serotyp abhängig. Jahreszeitliche Unterschiede und die Empfänglichkeit in den verschiedenen Altersgruppen spielen eine große Rolle. Der Befall von verschiedenen großen Organsystemen ist möglich (Tab. 1).

Die pathologische Reaktion auf eine ADV-Infektion läßt sich in eine frühe Phase, die charakterisiert ist durch perivaskuläre und perialveoläre lymphozytäre Infiltration sowie durch Induktion von TNF, Il-1 und Il-6 und in eine späte Phase, bei der eine zytotoxische T-Zellantwort vorherrscht einteilen.

Häufig verläuft eine Infektion subklinisch und es kommt zur Bildung von spezifischen Antikörpern, die eine Immunität gegen den entsprechenden Serotyp hervorbringt. Targetorgane sind der Respirationstrakt, das Auge, das gastrointestinale- und das urogenitale System (Tab. 1). Persistenz ist bei einer Schwächung des Immunsystems möglich.

Die *akute febrile Pharyngitis* ist bei Kindern durch Symptome wie Schnupfen und Halsschmerzen gekennzeichnet. Weitere Begleitsymptome sind Fieber, Kopfschmerz, Schwäche und Myalgien.

Enger Kontakt in überfüllten Räumen erhöht das Risiko für ADV-Infektionen.

Adenoviruspneumonien können bei Erwachsenen und Kindern vorkommen (Zarraga *et al.*, 1992) und sind oft auf eine Abwehrschwäche des Organismus zurückzuführen.

Neben der Symptomatik am Respirationstrakt kann es zusätzlich zu einer Entzündung der Konjunktiven kommen. Es handelt sich dann um das *Pharyngokonjunktivalfieber*, an dem hauptsächlich Kinder im Schulalter erkranken. Bei der *akuten folliculären Konjunktivitis* treten die Symptome am Auge isoliert auf. Bei beiden Formen handelt es sich

um eine eher milde Erkrankung und Heilung ohne bleibende Folgen ist die Regel.

Bleibende Visuseinschränkungen kann dagegen eine Folge der *epidemischen Keratokonjunktivitis* sein. Sie tritt in jedem Alter auf und ist hochkontagiös. Nach 8-10 Tagen Inkubationszeit kommt es zu einer folliculären Konjunktivitis. Der klassische Beginn ist das „rote Auge“ mit Lidödemen, Schmerzen, Fremdkörpergefühl, Tränenfluß und Photophobie. Die Infiltrate verbleiben subepithelial. Es kommt zu präaurikulären Lymphadenopathien. Differential-diagnostisch ist an eine durch Herpesviren oder Chlamydien verursachte Keratokonjunktivitis zu denken (Viswalingam, 1993).

Kinder, jünger als 4 Jahre, erkranken häufig an *Diarrhöe*, verursacht durch Adenoviren. Es handelt sich um die Serotypen 40 und 41. Erbrechen und Fieber sind weitere häufige Symptome. Das klinische Bild ist ähnlich der durch Rotaviren verursachten Erkrankung. Es ist möglich, Adenoviren aus Stuhlproben in allen Altersgruppen zu isolieren. Bei jeder systemischen Adenovirus-infektion kann Diarrhöe ein begleitendes Symptom sein. (Grimwood *et al.*, 1995).

Es gibt wenige Kasuistiken über eine Beteiligung von ADV-Serotypen 11 und 21 bei akuter hämorrhagischer *Zystitis*. Sie ist gekennzeichnet durch Makrohämaturie und nicht von systemischen Symptomen wie Fieber oder Hypertonie begleitet. Auch renale Ausscheidungs- und Harnkonzentrationsfunktionen sind normal. Nach immunsuppressiver Therapie im Anschluß an eine Knochenmarks- oder Nierentransplantation kann häufig der Typ 11 verantwortlich für die Erkrankung sein (Kitabayashi *et al.*, 1994). Andere Serotypen können häufig aus dem Urin während systemischer Adenovirusinfektionen isoliert werden.

ADV-Infektion bei *Immunschwäche* kommt eine besondere Bedeutung zu. Epidemiologische Studien zeigten keine gehäufte Inzidenz der Infektion verglichen mit immunkompetenten Patienten, aber die Verläufe der ADV-Erkrankungen waren bedeutend schwerer.

Während angeborene Immundefekte selten sind, sind erworbene oder sekundäre Immundefekte durch Radio- oder Chemotherapie bei Tumorpatienten und Organtransplantatempfänger und durch Infektion mit HIV häufiger. Das Erkrankungsbild ist bei allen immungeschwächten Patienten ähnlich, obwohl es Unterschiede in der Häufigkeit einzelner Serotypen gibt.

Auch die neu hinzugekommenen Adenoviruserotypen ADV 48 und ADV 49 sind von AIDS-Patienten isoliert worden (Crawford-Miksza und Schnurr, 1996).

Das klinische Bild der Erkrankung ist abhängig vom Grundleiden. Bei Transplantationen ist es möglich, dass ADV mit dem Organtransplantat übertragen wird und dann im Empfänger eine Infektion auslöst. Häufig werden interstitielle Pneumonien, Hepatitiden, Zystitis, Meningoencephalitis oder die Entwicklung generalisierter, disseminierter Infektionen beobachtet. Die Folge ist oft fatal (Siegal *et al.*, 1981; Zahradnik *et al.*, 1980; Matsuse *et al.*, 1994; Montone *et al.*, 1995).

Adenoviren besitzen die besondere Fähigkeit zur Latenz im infizierten Organismus. Sie können in verschiedenen Geweben, besonders in Lymphgeweben, Nieren- oder Lungengewebe persistieren. Bei eingetretener Immunschwäche ist eine Reaktivierung möglich, die zum Ausbruch der Erkrankung führt (Hierholzer, 1992).

3. Strategien zur Entwicklung von Antiviralia

Da die Vermehrung von Viren intrazellulär erfolgt und sie für ihren Replikationszyklus weitgehend Strukturen und Mechanismen der Wirtszelle nutzen müssen, leiten sich Probleme bei der Entwicklung von Antiviralia ab. Detailliertes Wissen über den viralen Lebenszyklus und die Wechselwirkungen von Viren mit den Zellen des Wirtsorganismus sind eine wichtige Voraussetzung, um mögliche Angriffspunkte selektiver antiviraler Wirkung zu finden.

Als Targets für Antiviralia kommen verschiedene Schritte im viralen Replikationszyklus in Betracht.

Blockade des Zell-Rezeptors

Beim Attachment, dem ersten Schritt, kommt es zu einer Wechselwirkung der Viren mit Zellrezeptoren. Diese Interaktion kann verhindert werden, wenn der Zell-Rezeptor blockiert ist. Versuche mit löslichem CD4 und einem gp 120 ähnlichem Protein haben Bindung und nachfolgende Aufnahme von HIV in die Zelle verhindert. Auch sulfatierte Polysaccharide können die Anheftung behindern. So konnte für Dextransulfat, Heparin und andere Stoffe gezeigt werden, dass sie Zellrezeptoren blockieren. Es erfolgt eine Konformationsänderung der Rezeptoren, die die Anheftung und nachfolgend den Schritt der Internalisierung der Viruspartikel verhindert. Eine Blockade ist auch mit Antikörpern, die entweder gegen die bindenden viralen Epitope oder gegen Zell-Rezeptoren gerichtet sind, möglich. So wurde z.B. mit rekombinantem Adenovirus-Fiberprotein eine Blockade des Rezeptors erreicht und eine nachfolgende Infektion verhindert (De Clercq, 1993; Henry *et al.*, 1994; Nara *et al.*, 1989).

Hemmung der Aktivität viraler Enzyme

Es hat sich inzwischen gezeigt, dass effektive, selektive Ziele für eine antivirale Therapie viruskodierte Enzyme, wie Polymerasen und Proteasen, sind.

Mit Nukleosidanaloga ist es möglich, die Polymeraseaktivität zu hemmen oder durch Einbau einen Kettenabbruch zu erreichen (z.B. Acyclovir, Azidothymidin, Ribavirin).

Proteasen sind am posttranslationalen „cleavage“ von Precursor-Proteinen und Reifung von Viren beteiligt. Für ADV konnte nachgewiesen werden, dass ein proteolytisches Prozessing des Kapsids für die Membran Interaktion bei pH 5 erforderlich ist. ADV-Kapsid, das nicht dieser Spaltung unterlag, war defizient in seiner Fähigkeit, die Membran bei pH 5 zu zerstören (Cotten und Weber, 1995). Eine Behandlung von reifen Viruspartikeln mit Proteaseinhibitoren führte zu nichtinfektiösen Viruspartikeln.

Für die Chemotherapie bei HIV-Infektion stehen neben nukleosidalen und nichtnukleosidalen Hemmern der Reversen Transkriptase Inhibitoren der HIV-Protease zur Verfügung. In Monotherapie weisen Saquinavir, Ritonavir und Indinavir deutliche antivirale Effekte auf, die durch Kombination mit Nukleosidanaloga erhöht werden können.

Hemmung der m-RNA Synthese

Die Expression von viralen Genen wird von Regulatorgenen bestimmt. Diese Regulatorgene sind DNA-Abschnitte deren Proteinprodukte für die spätere Transkription und Translation nötig sind. Eine Hemmung der Expression dieser Regulatorgene kann die normale Virusreplikation beeinflussen.

Ein anderer Ansatz besteht darin, Virus-DNA komplementäre Oligonukleotide (Antisensenukleotide) zu synthetisieren, die dann an

virale m-RNA binden und so das Spleißen, den Transport oder die Translation verhindern können.

Ionenkanalinhibitor

Bei Influenzaviren konnte nachgewiesen werden, dass das virale M2-Protein einen Ionenkanal bildet. Amantadin verhindert die Ausbildung des transmembranösen Ionenkanals, so dass der nötige pH-Gradient nicht aufgebaut werden kann.

Verhinderung der Ausschleusung der Virusproteine durch Interferon

Dass Interferone die Antwort der Zelle auf eine virale Infektion beeinflussen und eine „Virusresistenz“ der Zelle gegenüber Virusinfektion hervorrufen können, ist seit 1957 durch Arbeiten von Lindenmann bekannt (Isaacs und Lindenmann, 1957). Die Interferone werden in 2 Gruppen eingeteilt. Interferonklasse Typ I mit den Interferonen α , β und ω wird durch virale Infektion aktiviert, während Interferone Typ II (γ) durch antigene Stimulation von T-Lymphozyten oder natürlichen Killerzellen gebildet werden. Interferone induzieren über rezeptorvermittelte Signaltransduktion die Synthese von Interferon-regulierten Proteinen (IRP), wie die Protein-Kinase C, die Oligoadenylat-Synthetase, das Protein Mx und MHC-Antigene. Mx-Proteine hemmen Infektionen durch Influenzaviren und beeinflussen wahrscheinlich zelluläre Prozesse, die Aufnahme und Transport der Viren in der Zelle realisieren (Mayer *et al.*, 1992; Samuel, 1991).

Hemmung der Polymeraseaktivität

Nukleoside dienen der Polymerase als Substrat bei der semikonservativen Replikation der DNA zur Bildung des komplementären Stranges. Voraussetzung ist ihre Aktivierung zum entsprechenden Nukleosidtriphosphat durch zelluläre Kinasen.

Phosphorylgruppendonor für die Reaktion ist ATP. Diese Reaktion stellt häufig den limitierenden Faktor für die antivirale Aktivität von Nukleosidanaloga dar. Eine unzureichende Phosphorylierung verhindert den Kettenabbruch bei der Synthese (Polymerisation) mit der Polymerase.

Die Verbindung der Nukleotide zum DNA-Strang erfolgt jeweils zwischen der freien 3'-OH-Gruppe des bestehenden Strangfragmentes und dem innersten Phosphoratom des Desoxyribonukleotid durch Phosphodiesterbindung. Die Kette wächst bei ADV in 3'-5'-Richtung. Der DNA-Doppelstrang wird durch Basenpaarung zwischen den jeweils komplementären Basen durch Wasserstoffbrückenbindung gebildet. Eine strukturelle Veränderung an den entsprechenden Positionen bei den Basen oder am Pentosering in 3'- oder 5'-Position kann folglich die Synthese des DNA-Stranges stark beeinträchtigen.

Durch chemische Modifikation lassen sich Substanzen synthetisieren, die in ihrer Struktur den natürlichen Nukleosiden verwandt sind, aber durch diese Strukturveränderung selektiv in den viralen Replikationszyklus eingreifen (Tab. 2).

Tab. 2: Substitutionsstellung am Pyrimidin- oder Purinring

Thymin und Adenin	<u>Thymin</u>	<u>Adenin</u>
	N-H (3-Stellung) C=O (4-Stellung)	C-NH ₂ (1-Stellung) N (6-Stellung)
Cytosin und Guanosin	<u>Cytosin</u>	<u>Guanin</u>
	C=O (2-Stellung) N (3-Stellung)	C-NH ₂ (2-Stellung) N-H (1-Stellung)
	C-NH ₂ (4-Stellung)	C=O (6-Stellung)

Die Pyrimidinbasen Uracil, Thymin und Cytosin können in 5-Position substituiert werden. Mögliche Substituenten sind Chlor, Brom, Jod, Methyl- oder Ethylgruppen (Abb. 3). Substanzen wie 5-Iod-2'-desoxyuridin (*Idoxuridine*), 5'-Amino-5-iod-2',5'-didesoxyuridin (*Aminoidoxuridine*) oder 5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin (*Trifluridine*) zeichnen sich durch gute Wirksamkeit gegen DNA-Viren, besonders Herpes simplex, aus. 5-substituierte Cytidinderivate wie 5-Iod-2'-desoxycytidin oder 5-Brom-2'-desoxycytidin sind ebenfalls antiviral wirksam. Sie werden aber von der zellulären Cytidineaminase in nicht infizierten Zellen zu Uridinderivaten deaminiert und sind stark zytotoxisch.

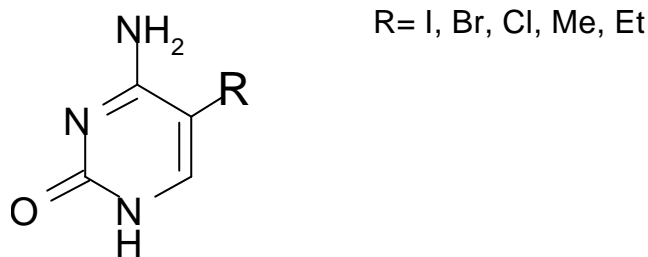


Abb. 3: Pyrimidinsubstituenten in 5-Position

Komplexere Substituenten an der entsprechenden 5-Position sind Vinyl-Gruppen. Vinyl-substituierte Substanzen haben ebenfalls gute Wirksamkeit gegen Herpesviren. Es hat sich gezeigt, dass ein ungesättigter Substituent am Pyrimidinring mit einer elektronegativen Funktion, Hydrophobie und einer Größe von nicht mehr als 4 Kohlenstoffatomen ein Optimum an antiviraler Aktivität auslöst. Auch die Transposition (E) der Kohlenstoffatome der Vinylgruppe spielen eine Rolle. (E)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxy-uridin (*BVDU*, *Brivudin*), (E)-5-(2-Iodvinyl)-2'-desoxyuridin (*IVDU*) oder (E)-5-(2-Bromvinyl)-2'-

desoxycytidin (*BVDC*) sind Substanzen mit entsprechenden chemischen Strukturen.

Die Verbindung mit karbozyklischem Zucker oder Arabino-furanosylzucker bieten weitere Modifikationsmöglichkeiten in dieser Stoffgruppe. Beispiele für andere Substituenten können Formyl-, Nitro-, Cyano-, Methylthio- oder Methylaminogruppen sein, die alle ein ähnliches Aktivitätsspektrum wie *BVDU* oder *IVDU* haben (Carmine *et al.*, 1982; Herdewijn, 1992; Kimura *et al.*, 1988).

Am Zuckermolekül besteht ebenfalls die Möglichkeit zu strukturellen Veränderungen (Abb. 4). Substitution der Pentose durch Arabinose, Unterbrechung der 5'-Ringstruktur, wodurch es zur Bildung von azyklischen und karbozyklischen Strukturen kommt oder die Einführung von Substituenten und Synthese von Didesoxy-, Didehydro- oder Azido-Strukturen sind Modifikationsvarianten.

Der Austausch der Ribose durch Arabinose führt zu einem Nukleosid mit einer Konformation im Zuckermolekül, die eine DNA-Kettenverlängerung nicht mehr erlaubt.

Ein Pyrimidinanalogon ist *Ara*-thymidin. Es ist wirksamer Hemmer von Herpes-simplex-Virus 1 und 2, Varicella-Zoster-Virus und Epstein-Barr-Virus. *Ara*-thymidin wird von der viralen Thymidinkinase phosphoryliert und ist aus diesem Grunde in infizierten Zellen aktiv und nur schwach toxisch in nicht infizierten Zellen. Es hemmt die Polymerase und wird in die DNA inkorporiert.

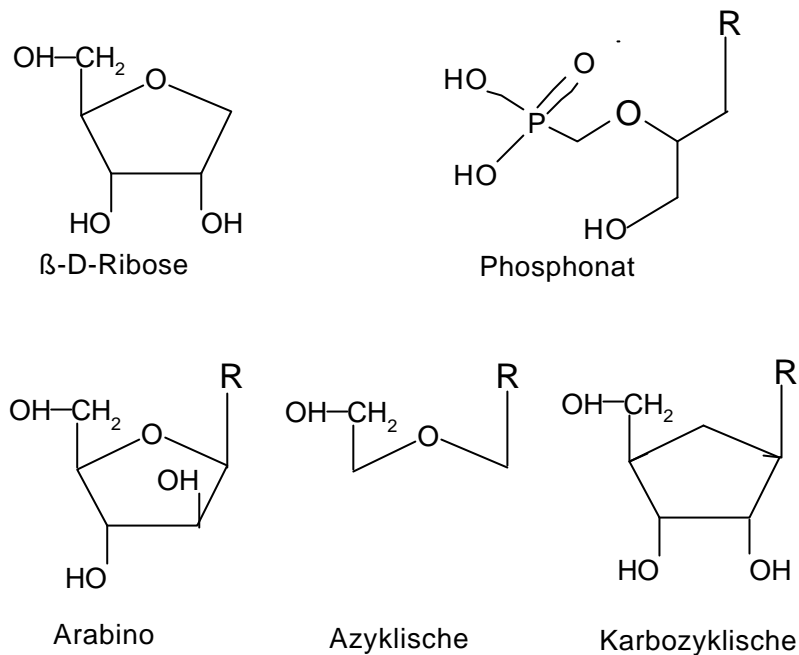


Abb. 4: Strukturmodifikationen

Andere Pyrimidine mit Arabinose Molekülen sind z.B. 2'-Fluor-2'-desoxy-5-iod-*ara*-cytidin (*FIAC*) und 2'-Fluor-2'-desoxy-5-methyl-*ara*-uridin (*FMAU*). Beide sind ebenfalls gegen Herpesviren, Varicella-Zoster-Virus und gegen Zytomegalie-Virus wirksam.

Ein Purinanalogen ist *Ara*-adenosin (*Vidarabin*). Es wird klinisch lokal bei Herpesvirus Keratitis und systemisch bei Herpesvirus Encephalitis angewandt. Die Kasuistik einer erfolgreichen Therapie einer Adenovirusinfektion wurde berichtet (Kitabayashi *et al.*, 1994). Es wirkt über eine Hemmung der Polymerase. *Ara*-adenosin wird in die DNA inkorporiert, was zu einer helikalen Verdrehung des DNA-Stranges führt. Weiterhin werden die Ribonukleotid-Reduktase, die S-Adenosylhomocysteinase und andere RNA-Enzyme beeinflusst. *Ara*-

adenosin wird zu *Ara*-hypoxanthin deaminiert, das ebenfalls noch antiviral wirksam ist (Herdewijn, 1992).

Bekannter Vertreter azyklischer Nucleosidanaloga ist Acyclovir (*Zovirax*[®], 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanosin). Kennzeichnend für diese Gruppe von Substanzen ist der azyklische Pentosering.

Strukturverwandte Nucleoside sind das R-Enantiomer des Acyclovir Buciclovir (*DHBG*, 9-(3,4-Dihydroxybutyl)guanin), Ganciclovir (*DHPG*, 9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin) oder Penciclovir (*3HM-HBG*, 9-(4-Hydroxy-3-hydroxymethylbutyl)guanin). Alle 4 genannten Substanzen sind Guanin Analoga. Penciclovir weist als Besonderheit eine „Karbo-azyklische“ Gruppe auf. Die Sauerstoffgruppe ist durch ein Kohlenstoffatom ersetzt. Das Aktivitätsspektrum ist bei allen Substanzen ähnlich und erstreckt sich auf Herpesviren. Die Aktivierung erfolgt durch die Thymidin-Kinase der Herpesviren und Phosphorylierung durch zelluläre Enzyme. Acyclovir wirkt über kompetitive Hemmung von Guanosin. Es erfolgt ein Einbau in die DNA. Die 3'-Gruppe der Substanz erlaubt keine weitere Kettenverlängerung.

Buciclovir und Ganciclovir wirken ebenfalls auf die Polymeraseaktivität. Buciclovir kann aufgrund seiner Struktur nicht als Substrat zur DNA-Synthese verwandt werden. Ganciclovir, das in 3'-Position eine OH-Gruppe aufweist, die einen Einbau in die DNA zulässt, bewirkt nur eine Verlangsamung der DNA-Synthese. Es ist wirksam gegen Zytomegalie-Virus. Andere verwandte Substanzen sind Cyclobut-G (*BHCG*) oder 2'-CDG als azyklische Guanosinanaloga.

Anders wirken azyklische Adenosinanaloga. Vertreter sind *DHPA* ((S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl)adenin) und *AHPA* (3-Adenin-9-yl-2-hydroxypropanolsäure). Ihr Ziel ist die S-Adenosylhomocystein-Hydrolase, deren Hemmung zu einem Anstieg der Konzentration von S-Adenosylhomocystein führt. Dadurch wird besonders die Methylierung

der viralen m-RNA beeinträchtigt, die für die Reifung der RNA-Moleküle nötig ist. DHPA und AHPA sind die aktiven Metaboliten. Das Wirkungsspektrum betrifft vor allem RNA-Viren wie Paramyxoviren, Rhabdoviren, Arenaviren und Reoviren. Von DNA-Viren sind Cytomegalieviren und Pockenviren sensitiv (De Clercq, 1993; Hobbs, 1997).

Bei der Substanzgruppe der karbozyklischen Nukleosidanaloga wird das Sauerstoffatom, das den Ringschluss des Pentosemoleküls vermittelt, mit Kohlenstoff substituiert. Oft sind andere Substituenten für die Eigenschaften dieser Nukleosidanaloga wichtig.

Karbozyklische Adenosinanaloga hemmen wie DHPA oder AHPA ebenfalls die S-Adenosylhomocystein-Hydrolase. Vertreter dieser Substanzklasse sind z.B. Karbozyklisches 3-Deazaadenosin (*C-c³Ado*), Neplanocin (*NpcA*), 3-Deazaneplanocin A (*c³NpcA*) sowie die beiden 5'-nor-Derivate von Karbozyklischem Adenosin (*nor C Ado*) und Karbozyklischem 3-Deazaadenosin (*norC-c³Ado*). Sie haben das gleiche Wirkspektrum wie DHPA oder AHPA.

Karbozyklische Guanosinderivate sind die schon erwähnten Substanzen Buciclovir und Penciclovir. Bei diesen beiden Substanzen ist zusätzlich zur azyklischen Struktur die Sauerstoffgruppe durch Kohlenstoff substituiert. *BHCG* ((±)-(1 α ,2 β ,3 α)-9-[2,3bis(Hydroxymethyl)-cyclobutyl]guanin) hat dagegen einen geschlossenen 4-Ring. Diese Substanzen wirken wie ihre azyklischen Analoga (De Clercq, 1993).

Phosphonoformat (*PFA*) und Phosphonoformsäure (*PAA*) sind als Pyrophosphatanaloga schon lange bekannte DNA-Polymerasehemmer. Sie wirken nicht kompetitiv mit Desoxynukleosiden. Es kommt wahrscheinlich zur Bindung der DNA-Matrize an die Pyrophosphat-Bindestelle. Bei Übertragung der Phosphonylgruppe auf DHPA kommt

es zur Bildung eines Nukleosidanalogs mit breitem antiviralem Spektrum.

(S)-9-(3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenin (*HPMPA*) wirkt bedeutend stärker als die Ausgangsstruktur. Das Wirkspektrum betrifft Poxviren (*Vaccinia*), Herpesviren (HSV 1, HSV 2, VZV, CMV und EBV), Adenoviren, Iridoviren und Hepadnaviren.

Das Guanosinanalogon (S)-9-(3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)guanosin (*HPMPG*) und das Cytosinanalogon (S)-9-(3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosin (*HPMPC*) weisen ein ähnlich weites antivirales Spektrum auf.

Wird statt der Propylgruppe eine Methylgruppe als Substituent verwendet, so erhält man 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin (*PMEA*). Diese Substanz ist nicht gegen Adenoviren und Pockenviren wirksam, zeigt aber deutliche Aktivität gegen HIV 1, HIV 2 und andere Retroviren. *PMEA* wirkt als DNA-Kettenterminator, da die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, die für eine Verlängerung nötig ist. *HPMPA* enthält dagegen diese Gruppe und kann in die DNA eingebaut werden. Der genaue Wirkmechanismus von *HPMPA* ist nicht bekannt.

Mit der Einführung eines Fluorsubstituenten verändert sich das Wirkspektrum. (RS)-9-(3-Fluor-2-phosphonylmethoxypropyl)adenin (*FPMPA*) ist nur noch gegen die RNA-Viren HIV 1 und HIV 2 wirksam. Es ist wie *PMEA* ein Kettenterminator in der Reaktion mit der Reversen Transkriptase (Balzarini *et al.*, 1991; De Clercq, 1995; Mul *et al.*, 1989).

Die Gruppe der Didesoxynukleoside und strukturverwandter Substanzen spielt eine große Rolle bei der Therapie von HIV-Infektionen. Gemeinsamkeit der Gruppe ist das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe. Wenn es als Polymerasesubstrat in die DNA-Kette eingebaut wird, ist die Ausbildung der 3'-5'-Phosphodiesterbindung

nicht möglich, und führt zum Kettenabbruch. Außerdem führt eine Konkurrenz um Enzyme des Nucleosidstoffwechsels zur Störung des endogenen Nucleosidpools.

Azidothymidin (*Zidovudin*, 3'-Azido-3'-desoxythymidin, *AZT*) wurde von Mitsuya und Broder als effektiver HIV-Hemmer beschrieben (Mitsuya und Broder, 1987). Die Azidogruppe (N_3) befindet sich in 3'-Position des Pentoseringes. Zalcitabin (2',3'-Didesoxycytidin, *ddC*) und Didanosin (2',3'-Dideoxyinosin, *ddI*) sind ebenfalls als Therapeutika gegen HIV zugelassen. Das 2'- und das 3'-Atom des Zuckerringes ist reduziert. Bei Stavudin (2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidin, *dddT*) ist zusätzlich eine Doppelbindung zwischen den Zuckeratomen eingefügt (Sommadossi, 1993).

4. Zielstellung

Adenovirus-assoziierte Infektionen führen in immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten zu signifikanter Morbidität und Mortalität. In der Neonatalperiode kann es zu fatalen disseminierten Infektionen kommen. Bisher gibt es keine effektive spezifische topische oder systemische antivirale Therapie.

Die Entwicklung von Antiviralia gegen die große Gruppe der humanen Adenoviren ist somit ein dringendes Erfordernis.

Ziellstellung der Arbeit war es, verschiedene modifizierte Nukleosidanaloga auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber ADV 7 Vertreter der Subgruppe B und verantwortlich für febrile akute respiratorische Erkrankungen und ADV 19 Vertreter der Subgruppe D und verantwortlich für die epidemische Keratokonjunktivitis im *in-vitro*-Replikationsmodellsystem zu untersuchen.

20 Verbindungen waren verfügbar und zu evaluieren.

Weiterhin war von Interesse, bei nachgewiesenem inhibitorischem Effekt zu prüfen, ob der angenommene Wirkmechanismus über eine Hemmung der Polymerase zu belegen ist.

Dazu war es erforderlich, ein Adenovirus Polymerase *in-vitro*-Testsystem zu etablieren. Für diese Aufgabe sollte die Expression des ADV-Polymeraseproteins im Baculovirussystem genutzt werden.

5. Material und Methoden

5.1. Testsubstanzen

Zur Untersuchung auf antivirale Aktivität wurden 20 modifizierte Nucleosidanaloga eingesetzt, die zur Gruppe der Didesoxynucleoside gehören. Die Substanzen wurden uns von PD Dr. Matthes, Max Delbrück Institut für Molekulare Medizin in Berlin-Buch, zur Verfügung gestellt.

Die Substanzen wurden in sterilem Aqua dest. gelöst und zur Testung mit Medium (Opti-MEM 5% FCS) verdünnt. Die Stocklösung wurde in einer Stoffmengenkonzentration von 100 mM portioniert bei -20 °C aufbewahrt.

Die Verbindungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Aus der Gruppe der 3'-Fluor-2'-desoxynucleoside wurden FTdR (Abb. 5), FUdR, FGdR, FCdR und FAdR geprüft.

Als gemeinsames Kennzeichen haben sie eine Substitution der Hydroxylgruppe in 3'-Position des Pentoseringes durch ein Fluoratom.

Aus der Gruppe der 3'-Fluor-R-desoxynucleoside wurden FCIUdR, FCICdR, FBrUdR (Abb. 6) und FMetCdR evaluiert. Zusätzlich zur Veränderung im Zuckermolekül mit dem Fluoratom wird der Pyrimidinring substituiert. Es wird eine Ringsubstitution in 5-Position vorgenommen. Substituent sind Chlor- und Bromatome und Methylgruppen.

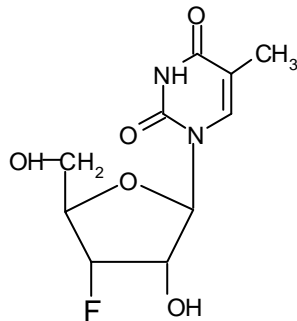


Abb. 5: FTdR

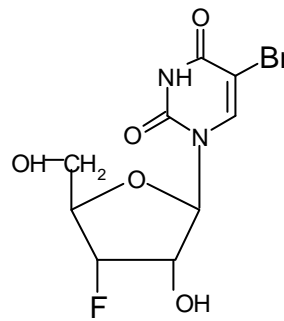


Abb. 6: FBrUdR

Aus der Gruppe der 3'-Azido-2'-desoxynucleoside wurden N₃TdR, N₃AdR (Abb. 7) und N₃GdR untersucht.

Gemeinsames Merkmal ist der Substituent, die Azidogruppe in 3'-Stellung des Zuckerrestes. Eine Veränderung der Pyrimidin- oder Purinbase erfolgt nicht. Aus der Gruppe der 2',3'-Didesoxynucleoside wurden ddC (Abb. 8), ddA, ddG und ddT evaluiert.

Hier sind die Hydroxylgruppen in 2'- und 3'-Stellung reduziert.

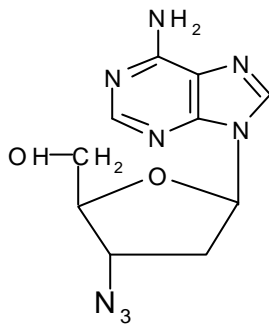


Abb. 7: N₃AdR

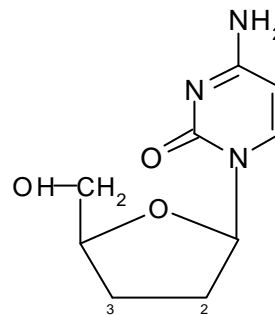


Abb. 8: ddC

Aus der Gruppe der 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxynucleoside wurden ddeT, ddeC und ddeA (Abb. 9) evaluiert. Im Unterschied zu den Didesoxynucleosiden ist eine zusätzliche Doppelbindung zwischen dem C2- und dem C3-Atom des Pentoseringes eingeführt.

2,6-Diaminopurin-2',3'-dideoxy-3'-fluorodesoxyribosid (Abb. 10) ist als Prodrug von FGdR anzusehen. In die Purinbase sind in 2- und in 6-Position Aminogruppen als Substituenten eingefügt. Am Pentosering befindet sich in 3'-Position ein Fluorsubstituent.

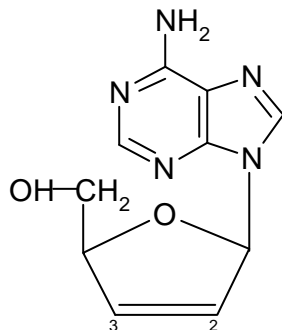


Abb. 9: ddeA

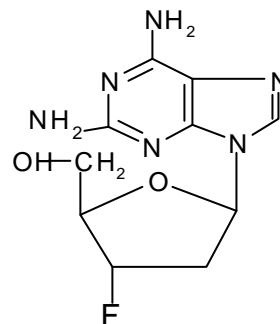


Abb. 10: FddDAPR

Tab. 3: Zusammenstellung der evaluierten Nukleosidanaloga nach Stoffgruppen

Stoffgruppe	Name	Abkürzung
3'-Fluor-2'-desoxynukleoside	3'-Fluor-2'-desoxythymidin	FTdR
	3'-Fluor-2'-desoxyuridin	FUdR
	3'-Fluor-2'-desoxycytidin	FCdR
	3'-Fluor-2'-desoxyguanosin	FGdR
	3'-Fluor-2'-desoxyadenosin	FAdR
3'-Fluor-5-R-desoxynukleoside	3'-Fluor-5-chlor-2'-desoxyuridin	FCIUdR
	3'-Fluor-5-brom-2'-desoxyuridin	FBrUdR
	3'-Fluor-5-chlor-2'-desoxycytidin	FCICdR
	3'-Fluor-5-methyl-2'-desoxycytidin	FMetCdR
3'-Azido-2'-desoxynukleoside	3'-Azido-2'-desoxythymidin	N ₃ TdR
	3'-Azido-2'-desoxyguanosin	N ₃ GdR
	3'-Azido-2'-desoxyadenosin	N ₃ AdR
2',3'-Didesoxy-nukleoside	2',3'-Didesoxycytidin	ddC
	2',3'-Didesoxyguanosin	ddG
	2',3'-Didesoxyadenosin	ddA
	2',3'-Didesoxythymidin	ddT
2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxy-nukleoside	2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxythymidin	ddeT
	2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxycytidin	ddeC
	2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxyadenosin	ddeA
	2,6-Diaminopurin-2',3'-didesoxy-3'-fluorodesoxyribosid	FDAPdR

5.2. Zellen

5.2.1. FL-Zellen

FL-Zellen, American Type Culture Collection ATCC CCL 62, wurden mit MEM (Eagle, Gibco) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS) bei 37 °C passagiert. Zum antiviralen Screening wurden sie als Zellsuspension 300000 Zellen/ml in Opti-MEM mit 5 % FCS eingesetzt.

5.2.2. Spodoptera frugiperda-Zellen (Sf9)

Die Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda* wurden in TC 100 Medium (Gibco UK) unter Zusatz von 10 % FCS und 50 mg/ml Gentamycin bei 28 °C passagiert.

5.3. Viren

5.3.1. Adenoviren

Die ADV Serotypen 7 und 19 wurden in FL-Zellen vermehrt unter Einsatz von MEM (Eagle, Gibco) mit 2 % FCS-Zusatz. Virus-infiziertes Zellmaterial wurde getaut und gefroren und der Virustiter bestimmt. Die Virussuspension wurde aliquotiert und bei – 70 °C aufbewahrt.

5.3.2. Rekombinantes Ad pol Baculovirus

Das rekombinante Ad pol Baculovirus wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Hay, Universität St. Andrew (UK) zur Verfügung gestellt. Es enthält ein Fragment, das die gesamte kodierende Region der ADV 2 Polymerase umfasst und für ein 140 kD großes Polymeraseprotein kodiert.

5.4. Antivirale Testungen

5.4.1. Fluoreszenzfokusreduktionsassay

Als Screeningtest zur Evaluierung der antiviralen Wirkung wurde ein Fluoreszenzfokusreduktionsassay unter Verwendung von 16-Loch gekammerten Gewebekulturträgern eingesetzt (Mentel *et al.*, 1996).

Die Substanzstammlösungen wurden zunächst in Medium (Opti-MEM 5 % FCS) in einem Verhältnis 1:1000 verdünnt. Um eine bakterielle Kontamination des Testes auszuschließen, wurden die verdünnten Testlösungen vor dem Ansetzen durch Mikroporenfilter (Porengröße 45µm) steril filtriert.

Es wurden logarithmische Verdünnungen auf der Basis 10 im Bereich 100 µM bis 0,001 µM hergestellt. 100 µl der jeweiligen Substanzverdünnung wurden in die Kammerobjektträger pipetiert.

Die FL-Zellen wurden abtrysiniert und auf 300000 Zellen/ml eingestellt. 50 µl dieser Zellsuspension wurde in jede Kammer pipetiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen, wurden die Arbeiten auf einer mittels Wasserwaage kontrollierten Unterlage durchgeführt.

Es erfolgte eine Vorinkubation der Zellen mit der Substanzlösung für 30 min bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre.

Nach dieser Inkubationszeit wurden 50 µl Adenovirus-Suspension hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit 50 µl Medium aufgefüllt, so dass ein Endvolumen von 250 µl vorlag. Die Kulturen wurden für 48 Std. bei 37 °C in CO₂-Atmosphäre gehalten. Alle Experimente wurden als Doppelansatz ausgeführt und mehrfach wiederholt.

Der Zell-Überstand wurde dekantiert und die Objektträger 60 min. im Luftstrom getrocknet. Die Fixierung erfolgte mit eisgekühltem Azeton bei -20 °C für 20 min.

Zum Virusnachweis wurden die infizierten Zellen mit fluoreszeinkmarkierten ADV-Antihexonantikörpern inkubiert. Es wurden 75 µl der in sterilem Aqua dest. gelösten Antikörper je Kammer eingesetzt, um eine gleichmäßige Bedeckung der Oberfläche zu erreichen. Nach einer Stunde Reaktionszeit bei 4 °C wurde der Objektträger 3 mal für jeweils 5 min. in PBS gespült zur Entfernung des Überschusses an nichtgebundenen Antikörpern.

Nach Trocknen wurden die Objektträger mit Elvanol eingedeckelt.

Zur Auswertung wurden mittels Fluoreszenzmikroskop 10 verschiedene Gesichtsfelder ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Adenovirusinfizierte Zellen zeigen eine deutliche Fluoreszenz des Zellkerns.

Die Zellkontrolle, das Feld ohne Testsubstanz und ohne Virussuspension, wurde zur Beurteilung der Qualität des Ansatzes herangezogen.

Zur Berechnung der antiviralen Wirksamkeit der Substanzen wurde die Anzahl der infizierten Zellen der Viruskontrolle als 100 % Wert definiert. Die Ermittlung der prozentualen Hemmung der Infektion durch die jeweilige Substanzkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

(foci in virusinfizierten Zellen - foci in virusinfizierten Zellen mit Testsubstanz)

$$\text{foci in virusinfizierten Zellen} \times 100$$

Die Ermittlung der 50 % inhibitorischen Substanzkonzentration erfolgte graphisch.

Die Berechnung des Selektivitätsindex erfolgte durch Quotientenbildung aus dem IC₅₀ –Wert und dem CC₅₀ –Wert der Testsubstanz.

5.4.2. Bestimmung der viralen DNA-Synthese

Die Menge der ADV-DNA-Synthese wurde mittels Polymerasekettenreaktion analysiert.

FL-Zellen (10^6 Zellen) wurden nach zweimaligem Waschen in Gegenwart von verschiedenen Substanzkonzentrationen mit Adenovirus-Suspension 1:10, 1:100 und 1:1000 in einem Endvolumen von 100 μ l für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurde jede Probe mit 1 ml Medium MEM / 10 % FCS versetzt und mit Zusatz der entsprechenden Substanzkonzentrationen (10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M) für 19 Stunden bei 37 °C in 5 % CO₂-gesättigter Atmosphäre inkubiert.

Nach der Inkubation wurden alle Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt.

Die Zerstörung der Adenovirus infizierten Zellen erfolgte mit 200 μ l Proteinase K und Lysispuffer im Wasserbad für 60 min. bei 50 °C und 20 min. bei 65 °C.

Zur DNA-Extraktion wurden die Proben mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 2 min. geschüttelt, 5 min. im Eisbad gehalten und bei 13000 U/min bei 4 °C für 10 min. zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 versetzt und wie oben verfahren. Zur Fällung wurde der nach Zentrifugation erhaltene Überstand mit dem zweifachen Volumen von eiskaltem (100 %) Ethanol und 0,03 M NaCl versetzt und bei -70 °C über Nacht inkubiert.

Nach Zentrifugation für 30 min. bei 13000 U/min und 2 maligem Waschen mit 70 % Ethanol erfolgte eine Vakuumtrocknung der DNA. Das erhaltene Sediment wurde in 20 μ l sterilem Aqua dest. gelöst.

Zur Amplifikation wurden die Oligonucleotid-Primer der Region 18858-18883 und 19136-19158 des Hexon-Gens eingesetzt. Primernamen sind H1 und H2.

Die Nukleotidsequenzen sind

H1: 5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3'

H2: 5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT-3'.

Mit diesem Primersatz resultierte eine 300 bp-Sequenz.

Das Reaktionsgemisch hatte folgende Zusammensetzung: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM jedes Desoxynukleosidtriphosphates, 100 ng jedes Oligonukleotid-Primers, 1 Unit Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim) und je 5 μl der extrahierten DNA.

Es erfolgten 30 Amplifikationszyklen in einem 3 Schrittprofil (45 sec. bei 94 °C, 90 sec. bei 55 °C, 90 sec. bei 72 °C) (Thermo cycler Gene Amp PCR System 2400, Perkin-Elmer, Norwalk).

Die Bestimmung des Amplifikats wurde in Ethidiumbromid gefärbten 3 %-igem Agarosegel vorgenommen.

5.4.3. Bestimmung der Polymeraseaktivität

5.4.3.1. Präparation von rekombinanter Adenovirus Polymerase

Zur Gewinnung der Polymerase wurden *Spodoptera frugiperda*-Zellen mit rekombinantem Baculovirus Acpol 14A infiziert und 48 Std. bei 27 °C in TC 100 Medium inkubiert. Die geernteten Zellen wurden zweimal mit eiskalter PBS pH 6,2 gewaschen und bei 1800 U/min zentrifugiert. Nach Resuspension in 1,5 ml Lysispuffer (20 mM Hepes pH 7,5, 5 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,35 mM PMSF) und Inkubation für 10 min. im Eisbad wurden mittels

Dounce-Homogenisator die Zellen aufgebrochen und die Kerne durch Zentrifugation bei 2000 U/min für 15 min. sedimentiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugation bei 26000 U/min für 20 min. entfernt. Zytoplasmatischer Extrakt wurde mit 10 % Glycerol, 10 % Sucrose, 2 mM DDT versetzt und dann portioniert eingefroren. Der Kernextrakt wurde erhalten durch Inkubation des Sediments in 250 µl 50 mM Hepes pH 7.5, 10 % Sucrose, 2 mM DTT und 0.2 M NaCl für 60 min. Nach 5 min. Zentrifugation wurden Aliquots bei -70 °C eingefroren (Watson und Hay, 1990).

5.4.3.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Spodoptera frugiperda-Zellen (10^6 Zellen) wurden mit Acpol 14A und AcNPV (jeweils 10 Plaque bildende Einheiten pro Zelle) infiziert. Nach 18 Stunden Inkubation bei 37 °C erfolgte die Entfernung des Mediums. Zur Proteinmarkierung wurde ^{35}S -Methionin in 100 µl PBS (pH 6,2) zugesetzt. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert. Das erhaltene Sediment wurde in 100 µl PBS (pH 6,2) resuspendiert. Durch Zugabe von SDS und Mercaptoethanol erfolgte die Proteinlysierung. Nach Erwärmung auf 100 °C für 2 min. erfolgte Polyacrylamidgel-Elektrophorese in 10 %-igem Gel (Molekulargewichtsmarker: RainbowTM RPN 756, Amersham Life Science). Die Proteinanalyse erfolgte nach Coomassieblaufärbung.

5.4.3.3. Polymeraseassay

Das Reaktionsgemisch von einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt: 50 mM Tris HCl pH 7.8, 7 mM MgCl_2 , 19 mM DTT, 40 µM je dGTP, dATP, dCTP, dTTP, 1 µCi (α - ^{32}P) dATP (3000 Ci/mmol), 4 µg aktivierte Lachssperma-DNA, 2,5 µl Kern-

extrakt sowie je nach Ansatz verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz.

Tris HCl, MgCl₂, DTT und die dNTP's waren in entsprechenden Konzentrationen portioniert eingefroren bis zum Gebrauch. Zu jedem Ansatz wurden Leerwert Proben ohne Kernextrakt, ohne DNA-Template und ohne radioaktiv markiertes dATP mitgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 500 µl eisgekühlter 20 % Trichloressigsäure mit einem Zusatz von 0,5 % Tetranatriumpyrophosphat für 30 min. im Eisbad abgestoppt. Anschließend wurde die säurefällbare DNA auf Glasfiberfilterpapier (Whatman GF/C) aufgefangen. Das erhaltene Präzipitat wurde mit eiskalter 5 % Trichloressigsäure mit einem Zusatz von 0,5 % Tetranatriumpyrophosphat gespült. Nach Trocknung der Filterplättchen erfolgte die Messung der in die DNA inkorporierten Radioaktivität in Szintillationsflüssigkeit mit einem Flüssigkeitsszintillationscounter. Als Szintillator wurde Toluol verwendet (Watson und Hay, 1990).

6. Ergebnisse

Es wurden 20 Nucleosidanaloga auf antivirale Wirksamkeit gegenüber ADV 7 und ADV 19 untersucht. Als Screeningassay zur Bestimmung der antiviralen Aktivität der Verbindungen wurde ein zellbiologischer Test, der Fluoreszenzfokusreduktionsassay eingesetzt (Abb. 11).

Die Zytotoxizität dieser Verbindungen war in früheren Untersuchungen mittels des quantitativen Farbaufnahmeassay unter Nutzung von Neutralrot ermittelt worden (Mentel *et al.*, 1997). Als einzige Substanz hatte FTdR gegenüber FL-Zellen einen geringen antiproliferativen Effekt mit einer IC_{50} von 89 μM gezeigt. Bei den anderen Substanzen konnten im getesteten Bereich bis 100 μM keine antiproliferativen Effekte nachgewiesen werden.

6.1. Einfluss der Nucleosidanaloga auf die Virusreplikation von ADV 7 und ADV 19 in FL-Zellen

In Gegenwart von Nucleosidanaloga wurden Zellen mit Adenoviren infiziert und nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden analysiert. Es wurden Substanzkonzentrationen von 0,001 μM bis 100 μM untersucht und die 50 % Hemmkonzentration (IC_{50}) bestimmt.

6.1.1. Hemmbarkeit der Replikation von ADV 7

Gegenüber ADV 7 erwiesen sich 6 Verbindungen als antiviral wirksam (Tab. 3). Die ermittelten 50 % Hemmkonzentrationen lagen im Bereich von 2,8 μM bis 61 μM .

Aus der Gruppe der 2',3'-Didesoxynucleoside waren ddA und ddC mit IC_{50} -Werten von 2,8 μM und 3,1 μM die wirksamsten Nucleosidanaloga gegenüber ADV 7. Auch das 3'-Azido-substituierte Adenosinanalogen $N_3\text{AdR}$ und das 3'-Fluor-

substituierte Thymidinanalogon FTdR zeigten mit IC_{50} -Werten von 4,75 μM und 6,1 μM hohe inhibitorische Aktivität auf die Adenovirusreplikation. Für die 3'-Fluorsubstituierten Guanosin- (FGdR) und Cytidinanaloga (FCdR) wurden IC_{50} -Werte von 25 μM und 61 μM ermittelt. Die Dosis-Wirkungskurve für ddC und FTdR gegen ADV 7 ist in Abb. 12 demonstriert.

6.1.2. Hemmbarkeit der Replikation von ADV 19

Beim Screening der Hemmeffekte der Substanzen auf die Replikation von ADV 19 konnten für 7 Substanzen antivirale Wirksamkeit ermittelt werden (Tab. 3).

Die höchste Aktivität zeigten die 3'-Fluorsubstituierten FGdR und FTdR. Die kalkulierten IC_{50} -Hemmdosen liegen für FGdR bei 1,0 μM und für FTdR bei 1,3 μM . Für das Cytidinanalogon ddC lag der IC_{50} -Wert in derselben Größenordnung (5,5 μM).

Das 3'-Fluoranalogon von Cytidin (FCdR), die 2',3'-Didesoxynukleoside ddG, ddA und das 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxynukleosid ddeC zeigen mit Werten zwischen 53 μM bis 67 μM noch eine deutliche, aber geringere antivirale Aktivität. Die Dosis-Wirkungskurve für ddC und FTdR gegen ADV 19 ist in Abb. 13 dargestellt. Den Abbildungen 12 und 13 liegen jeweils ein repräsentativer Versuch zugrunde.

Die Berechnung des Selektivitätsindex für die Substanzen mit antiviraler Hemmwirkung FTdR, ddC, ddA und $N_3\text{AdR}$ gegen ADV 7 ergab einen Faktor >10 . Gegen ADV 19 war für die Substanzen FTdR, FGdR und ddC ein Selektivitätsindex >10 ermittelt worden (Tab. 4).

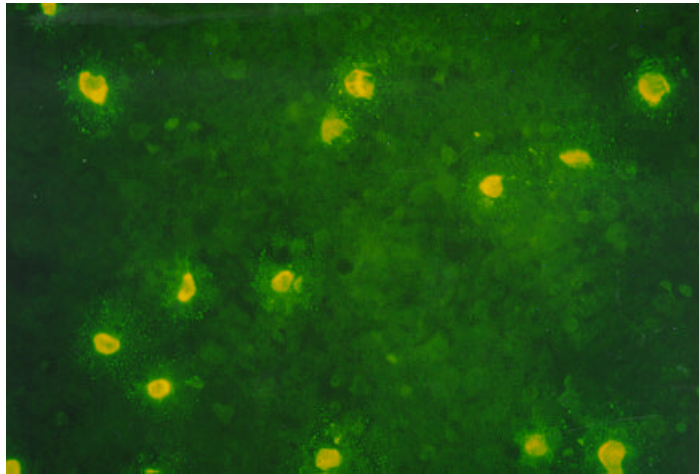


Abb. 11/1

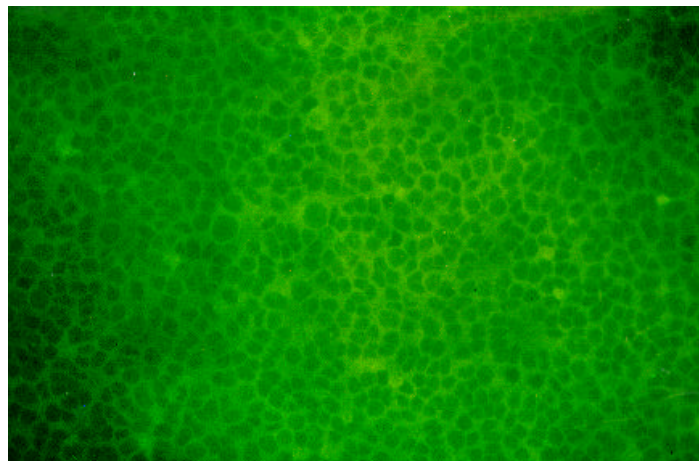


Abb. 11/2

Abb. 11: Fokusreduktionsassay

11/1: FL-Zellen infiziert mit Adenovirus

11/2: FL-Zellen nicht infiziert

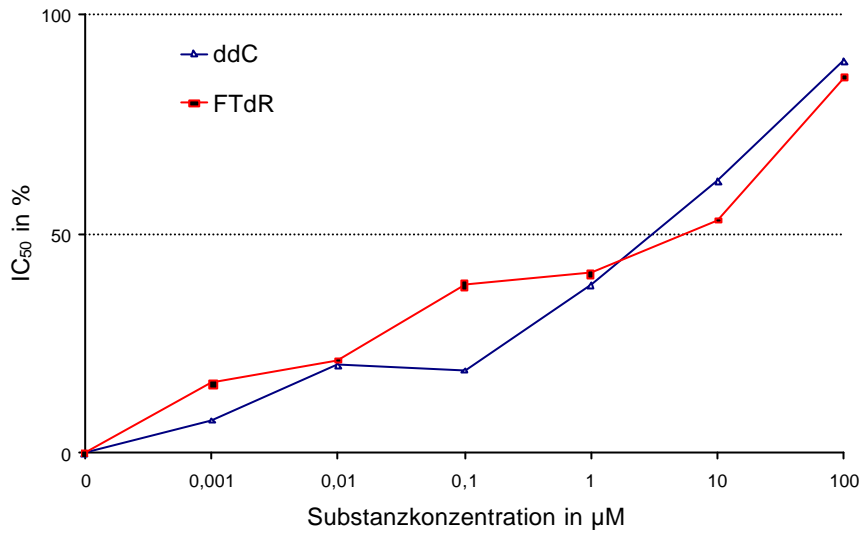


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Beziehung im Fokusreduktionsassay für ddC und FTdR gegen ADV 7.

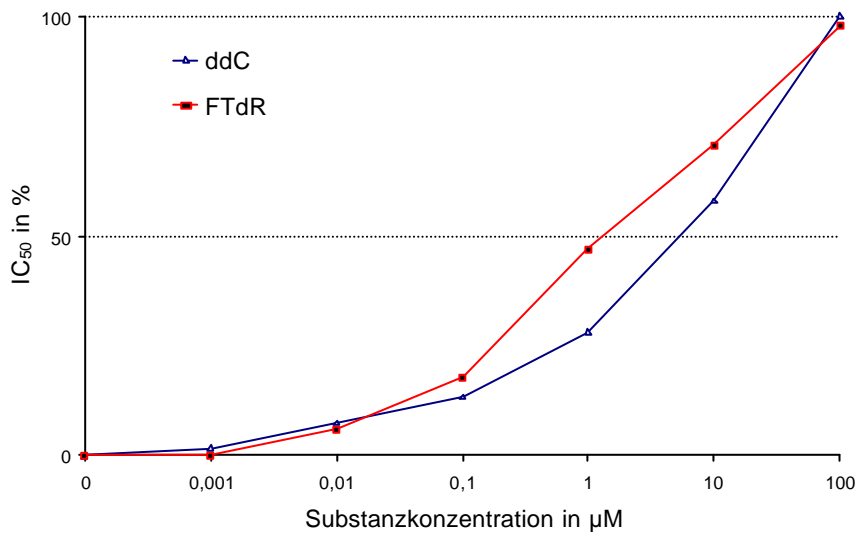


Abb. 13: Dosis-Wirkungs-Beziehung im Fokusreduktionsassay für ddC und FTdR gegen ADV 19.

Tab. 3: Ergebnisse der Untersuchung der antiviralen Aktivität von Nukleosidanaloga im Fluoreszenzfokusreduktionsassay gegen Adenovirus Typ 7 und 19 in FL-Zellen.

Testsubstanz	Abkürzung	Zytotoxizität CC ₅₀ (µM)	Antivirale Aktivität IC ₅₀ (µM)	
			ADV 7	ADV 19
3'-Fluor-2'-desoxythymidin	FTdR	89,0	6,1	1,3
3'-Fluor-2'-desoxyuridin	FUdR	>100	>100	>100
3'-Fluor-2'-desoxycytidin	FCdR	>100	61	53
3'-Fluor-2'-desoxyguanosin	FGdR	>100	25	1,0
3'-Fluor-2'-desoxyadenosin	FAdR	>100	>100	>100
3'-Fluor-5-chlor-2'-desoxyuridin	FCIUdR	>100	>100	>100
3'-Fluor-5-brom-2'-desoxyuridin	FBrUdR	>100	>100	>100
3'-Fluor-5-chlor-2'-desoxycytidin	FCICdR	>100	>100	>100
3'-Fluor-5-methyl-2'-desoxycytidin	FMetCdR	>100	>100	>100
2,6-Diaminopurin-2',3'-didesoxy-3'-fluorodesoxyribosid	FDAPdR	>100	>100	>100

Fortsetzung Tab. 3

Testsubstanz	Abkürzung	Zytotoxizität CC ₅₀ (µM)	antivirale Aktivität IC ₅₀ (µM)	
			ADV 7	ADV 19
3'-Azido-2'-desoxythymidin	N ₃ TdR	>100	>100	>100
3'-Azido-2'-desoxyguanosin	N ₃ GdR	>100	>100	>100
3'-Azido-2'-desoxyadenosin	N ₃ AdR	>100	4,75	>100
2',3'-Didesoxycytidin	ddC	>100	3,1	5,5
2',3'-Didesoxyguanosin	ddG	>100	>100	67
2',3'-Didesoxyadenosin	ddA	>100	2,8	62
2',3'-Didesoxythymidin	ddT	>100	>100	>100
2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxythymidin	ddeT	>100	>100	>100
2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxycytidin	ddeC	>100	>100	62
2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxyadenosin	ddeA	>100	>100	>100

CC₅₀ = 50 % inhibitorische Dosis der Zellproliferation

IC₅₀ = 50 % inhibitorische Dosis der Virusreplikation

Tab. 4: Ermittelter Selektivitätsindex von Nukleosidanaloga, für die im Fluoreszenzfokusreduktionsassay eine antivirale Aktivität gegenüber ADV 7 oder ADV 19 ermittelt worden ist.

Substanz	Selektivitätsindex	
	ADV 7	ADV 19
FTdR	14,5	68,5
FCdR	1,6	1,88
FGdR	4	100
ddC	32,25	18,2
ddA	35,7	1,61
N ₃ AdR	21,05	-----
ddG	-----	1,5
ddeC	-----	1,61

6.2. Einfluss von ddC auf die DNA-Synthese

Der Einfluss von ddC auf die virale DNA-Synthese wurde mittels PCR untersucht.

Dabei wurden ddC Konzentrationen von 10 µM, 1 µM und 0,1 µM eingesetzt.

FL-Zellen wurden in Gegenwart von Substanz mit Adenovirus mit Infektionsdosen von 10⁴, 10³ und 10² FFU infiziert für 1 h bei 37 °C adsorbiert und für weitere 19 h in Gegenwart der Substanz inkubiert.

Die aus infizierten Zellkulturen extrahierte DNA wurde amplifiziert. Das Primerpaar aus der Region des Hexon-Gens ergab ein Amplifikationsprodukt von 300 bp. Es war bei einer Infektionsdosis von 10⁴ FFU von ADV in infizierten Zellen ohne Substanzzusatz deutlich erkennbar. In Gegenwart der Testsubstanz ddC war kein Amplifikat nachweisbar (Abb. 14, Bande 6-8).

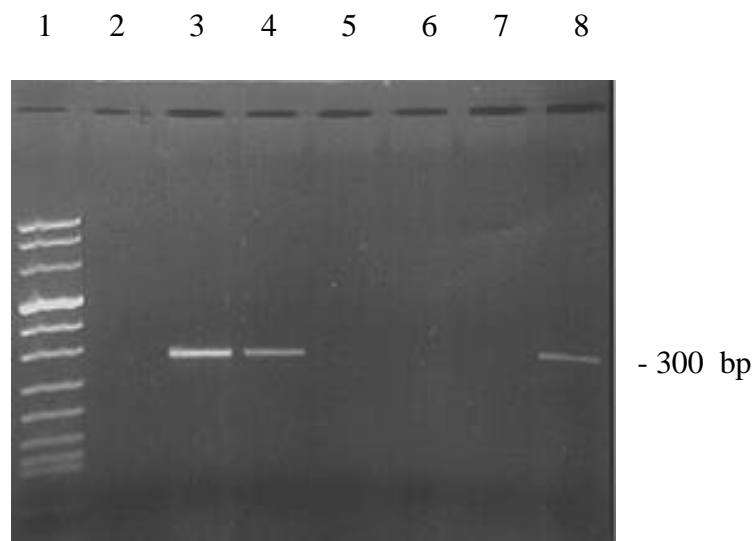


Abb. 14: Einfluss von ddC auf die Adenovirus-DNA-Synthese in FL-Zellen

1: Molekulargewichtsmarker; 2: nichtinfizierte Zellen;

3, 4 und 5: Zellen infiziert mit 10^4 FFU, 10^3 FFU und 10^2 FFU;

6, 7 und 8: Zellen infiziert mit 10^4 FFU, inkubiert in

Gegenwart von 10 μ M ddC, 1 μ M ddC und 0,1 μ M ddC

6.3. Untersuchungen zur Etablierung eines

Polymeraseassay

6.3.1. Gewinnung von ADV-Polymerase

Um ADV-Polymerase in ausreichender Menge für einen *in-vitro*-Polymeraseassay zu erhalten, wurde versucht, rekombinantes ADV-Polymeraseprotein in einem Baculovirusexpressionssystem zu gewinnen. Es wurden Kern- und Zellextrakte aus *Spodoptera frugiperda*-Zellen nach Infektion mit rekombinantem Baculovirus Acpol 14A präpariert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit Lysispuffer behandelt und in einem Dounce-Homogenisator aufgebrochen. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation vom Zytoplasma getrennt. Die Kern- und Zellextrakte wurden für enzymkinetische Untersuchungen eingesetzt.

6.3.2. Charakterisierung der Polymeraseextrakte mit

Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Charakterisierung der rekombinanten ADV-Polymerasepräparation wurde eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (10 % SDS-PAGE) durchgeführt.

Bei der Auftrennung der verschiedenen Proteinfractionen erschien im Bandenmuster der mit dem rekombinanten Baculovirus (Acpol 14A) infizierten Zellen eine neue Proteinbande bei 140 kD. Sie entspricht dem synthetisierten ADV-Polymeraseprotein (Abb. 15).

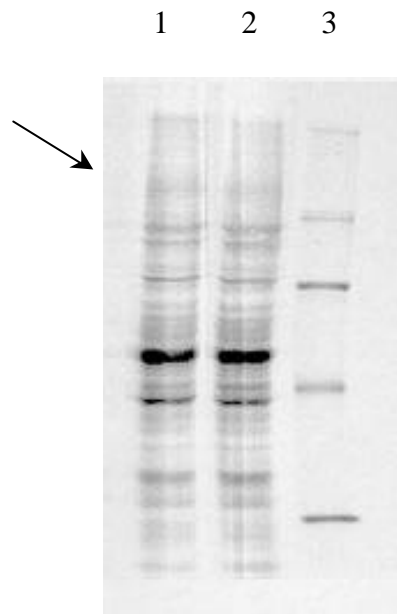


Abb. 15: Proteinanalyse von *Spodoptera frugiperda*-Zellen infiziert mit Acpol 14A. 1 und 2: infizierte Zellysate, 3: Molekulargewichtsmarker. Pfeil markiert Bande bei 140 kD.

6.3.3. Enzymkinetische Charakterisierung der rekombinanten ADV-Polymerasepräparation für den Einsatz im *in-vitro*- Polymeraseassay

Zur weiteren Charakterisierung der angereicherten Polymerase wurde die Enzymaktivität unter dem Gesichtspunkt der Ermittlung optimaler Proteinkonzentration und Inkubationszeit untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Aphidicolin geprüft, gegen das ADV-Polymerase resistent ist. Die DNA-Polymeraseaktivität der Präparation wurde bestimmt durch die Messung der Inkorporation von radioaktiv markiertem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ mit aktivierter Lachssperma-DNA als Template.

6.3.3.1. Einfluss der Proteinkonzentration auf die Inkorporation von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$

Von dem Konzentrat des Kernextraktes wurde eine Verdünnungsreihe auf der Basis 2 hergestellt. Die getesteten Proteinkonzentrationen lagen im Bereich von 0,156 bis 5 μg . Abb. 16 zeigt die Abhängigkeit der DNA-Bildung von der eingesetzten Proteinmenge. Der Einsatz von 1,25 μg Kernextrakt wurde als Basis für die nachfolgenden Untersuchungen definiert.

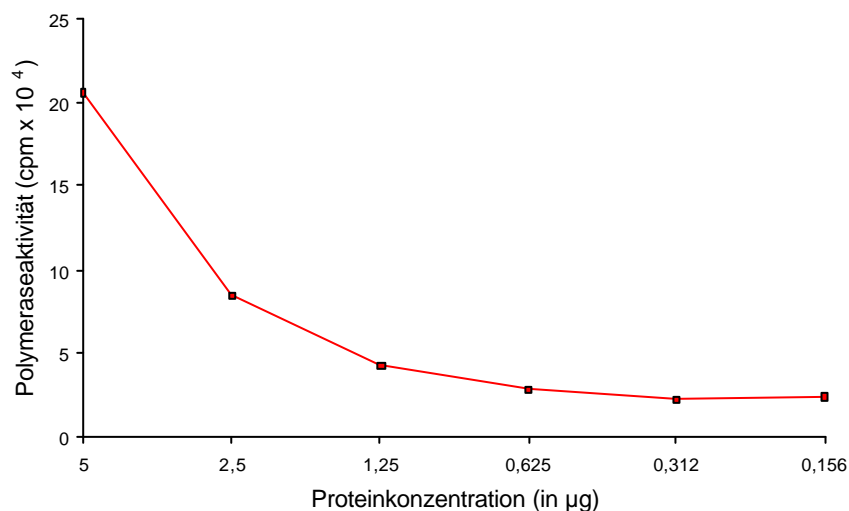


Abb. 16: Polymeraseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten
Proteinmenge

6.3.3.2. Einfluss der Inkubationszeit auf die Inkorporation von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit für den *in-vitro*-Polymeraseassay wurden die Reaktionszeiten 10, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten evaluiert. Nach den angegebenen Zeiten erfolgte die DNA-Fällung. Es bestand eine deutliche Zeitabhängigkeit. Der Anstieg der Kurve verlief linear bis 120 min. Danach war ein Abfall zu beobachten. Ein Maximum der Einbaurrate von dATP in die DNA liegt bei 120 min.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde als Zeitparameter 60 min. definiert.

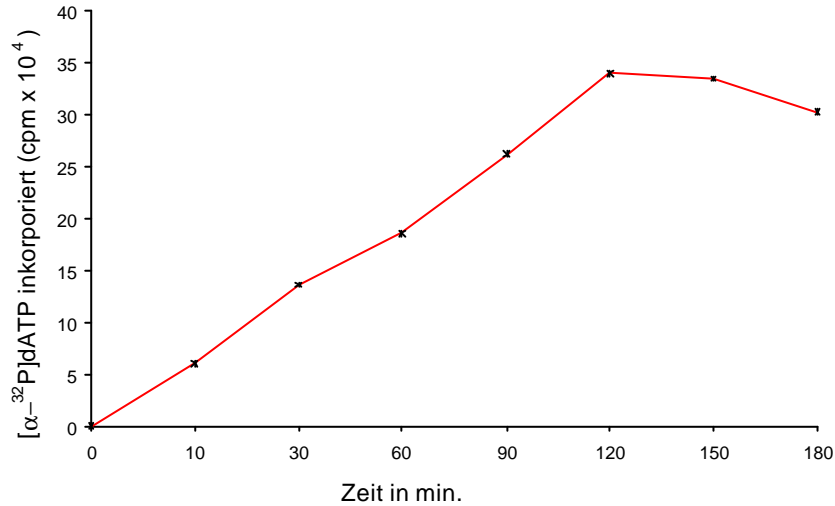


Abb. 17: Einfluss der Inkubationszeit auf den Einbau von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$

6.3.3.3. Einfluss von Aphidicolin auf die Polymeraseaktivität

Um die Spezifität der im Baculovirussystem exprimierten rekombinanten Polymerase mit einem weiteren Test zu belegen, wurden Untersuchungen in Gegenwart von Aphidicolin durchgeführt. Adenovirus DNA-Polymerase ist resistent gegen die Wirkung von Aphidicolin, während AcNPV spezifische DNA-Polymerase und die zellulären Polymerasen α und δ empfindlich gegenüber dieser Substanz sind.

Abb. 18 zeigt, dass auch in Gegenwart von 1 μg Aphidicolin die Aktivität des Enzyms erhalten blieb. Das beweist, dass ausreichend rekombinantes ADV-Polymeraseprotein gebildet wurde.

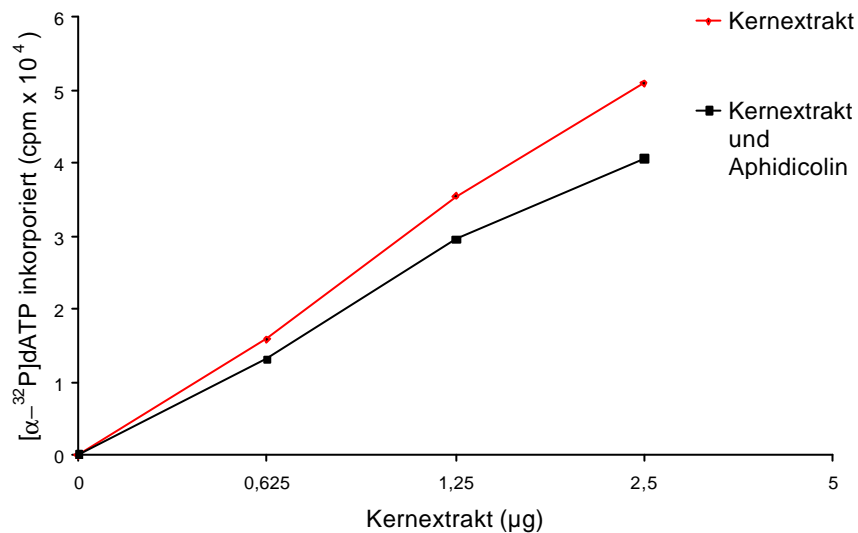


Abb. 18: ADV-DNA-Polymeraseassay durchgeführt unter Einsatz von 0,625; 1,25 und 2,5 μg Kernextrakt in Gegenwart und Abwesenheit von Aphidicolin

6.4. Evaluierung der Nukleosidanaloga im

Polymeraseassay

Um die im Fokusreduktionsassay ermittelte antivirale Aktivität zu bestätigen und den Wirkmechanismus über die Polymerase zu belegen, wurden die Triphosphate der als antiviral wirksam evaluierten Substanzen ddT, ddG, ddC, FGdR, FdR und FTdR im *in-vitro*-Polymeraseassay hinsichtlich einer Hemmung der Enzymaktivität untersucht.

Zur Auswertung wurde die säurepräzipitierbare Aktivität (cpm) der Probe ohne Substanzzugabe als 100 % Aktivität gesetzt und die Aktivität für die Substanzkonzentration ermittelt.

Die kalkulierten IC₅₀-Werte sind in Tab. 5 zusammengefasst. Sie liegen im Bereich von 0,63 bis 2,75 µM.

Die Dosis-Wirkungsbeziehungen sind in Abb. 19 und Abb. 20 dargestellt. Alle untersuchten Nukleosidtriphosphatanaloga weisen eine konzentrationsabhängige Hemmung der ADV-Polymerase auf.

Tab. 5: Einfluss von Nukleosidtriphosphatanaloga auf die ADV 2 DNA-Polymeraseaktivität (IC₅₀ in µM)

Inhibitor	Abkürzung	IC ₅₀ (µM)
3'-Fluor-2'-desoxythymidintriphosphat	FdTTP	0,63
3'-Fluor-2'-desoxyguanosintriphosphat	FdGTP	0,71
3'-Fluor-2'-desoxyuridintriphosphat	FdUTP	2,96
2',3'-Didesoxythymidintriphosphat	ddTTP	1,82
2',3'-Didesoxyguanosintriphosphat	ddGTP	2,75
2',3'-Didesoxycytidintriphosphat	ddCTP	1,0

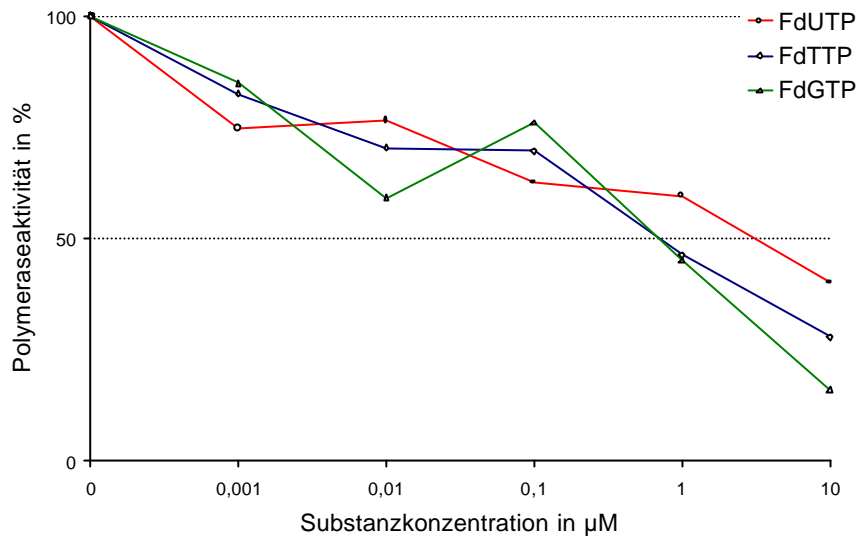


Abb. 19: Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Hemmung der Polymerase für die phosphorylierten Derivate der Substanzen FdUTP, FdTTP und FdGTP.

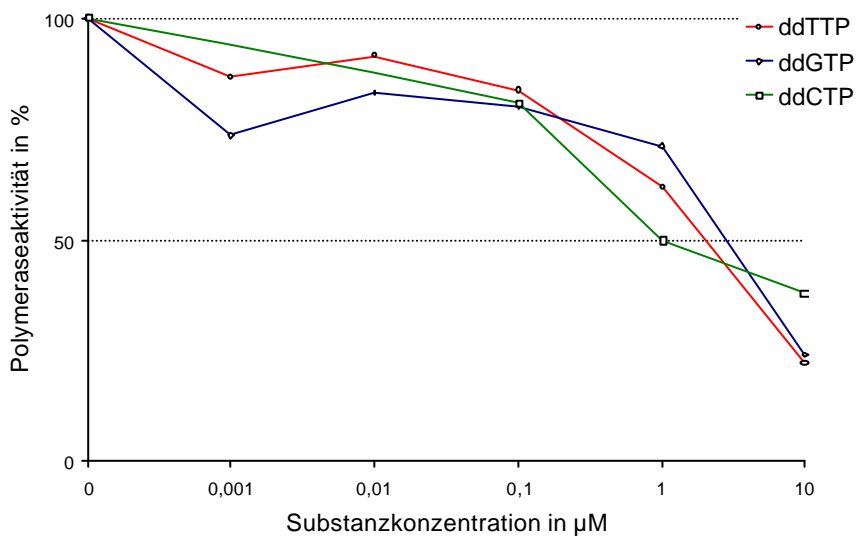


Abb. 20: Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Hemmung der Polymerase für die phosphorylierten Derivate der Substanzen ddTTP, ddGTP und ddCTP.

7. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 20 strukturmodifizierte Nukleosidanaloga auf ihre antivirale Aktivität gegenüber Adenoviruserotypen 7 und 19 evaluiert.

Zur Evaluierung wurde ein Fluoreszenzfokusreduktionsassay verwendet (Mentel *et al.*, 1996). Im Vergleich zu anderen Screeningverfahren für antivirale Wirkstoffe wie dem Plaqueassay oder kolorimetrischen Verfahren sind die Vorteile beim Fluoreszenzfokusreduktionsassay geringer Zeitbedarf, geringer Aufwand an Substanzen, Medium und Chemikalien. Insbesondere ist aber das Testverfahren durch eine hohe Spezifität gekennzeichnet. Während des Replikationszyklus der Adenoviren wird das Hexon als Struktur des ADV-Kapsid in großem Überschuss synthetisiert und ist im Kern anzutreffen. Die Verwendung von Fluoreszein-markierten monoklonalen Antihexon-antikörpern erlaubt eine spezifische und sichere Identifizierung Adenovirus-infizierter Zellen (Cepko *et al.*, 1983; Mentel *et al.*, 1996). Dadurch ist eine reproduzierbare Quantifizierung möglich.

Eine wichtige Bezugsgröße bei der Evaluierung von Antiviralia ist die Bestimmung der toxischen Wirkung auf den Stoffwechsel der Zelle. Für die virale Replikation sind auch zelluläre Stoffwechselleistungen erforderlich. Eine mögliche Inkorporation des Virusgenoms in zelluläre DNA wie bei den Retroviren und die Replikation des Virusgenoms unter Nutzung des zellulären Nukleosidtriphosphatpools zeigen die enge Verbindung, die zwischen dem viralen Lebenszyklus und zellulären Stoffwechselfvorgängen besteht.

Erforderlich für wirksame Antiviralia ist die selektive Hemmung des viralen Replikationszyklus ohne bzw. mit geringer Beeinflussung der Zellfunktion.

Der Selektivitätsindex hat Bedeutung für die Weiterbearbeitung wirksamer Verbindungen für eine mögliche klinische Anwendung, die häufig durch toxische Nebenwirkungen limitiert ist. So ist z.B. bei der Verabreichung von ddC und ddeT über das Auftreten von peripheren Polyneuropathien als unerwünschte Nebenwirkung berichtet worden. Die Anwendung von AZT ist durch das Auftreten von Knochenmarkssuppression besonders der Erythrozyten- und der Granulozytenreihe eingeschränkt (Copeland *et al.*, 1992, Vazquez-Padua *et al.*, 1990).

In der chemischen Struktur der Nukleosidanaloga findet sich als kennzeichnende Gemeinsamkeit der Verlust der 3'-Hydroxylgruppe im Zuckermolekül. Durch Hemmung einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung zum nächsten Nukleosid der DNA-Kette wird ein Abbruch, „chain termination“ und daraus resultierend eine Unterbrechung der viralen Replikation erreicht. Trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten kann aber für jede der Didesoxynukleosidanaloga keine allgemeine Aussage hinsichtlich Effektivität der Hemmung der Virusreplikation gemacht werden. Es ist individuelle Testung der Substanzen erforderlich.

Verschiedene zelluläre Faktoren beeinflussen den Stoffwechsel der Nukleosidanaloga. Dazu gehören z.B.:

- intrazelluläre Aufnahme der Substanzen durch zelluläre Transportsysteme
- Umbau und Abbau durch zelluläre Enzyme
- Phosphorylierungsschritte
- Störung des endogenen Nukleosidtriphosphatpools

Ein Vergleich von Werten nach antiviraler Aktivitätsbestimmung ist nur unter Berücksichtigung des jeweiligen verwendeten Zellsystems möglich. Die Verstoffwechslung im Sinne einer Aktivierung oder Inaktivierung ist in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich und abhängig vom jeweiligen zellspezifischen Enzymmuster und dessen Aktivierung (Balzarini *et al.*, 1988).

Die Affinität der Substanzen zu viralen Targets, dem Wirkort, bleibt hierbei unberücksichtigt.

Die Verstoffwechslung der Nukleosidanaloga wird durch Zellzyklus-abhängige Enzymaktivitäten bestimmt. Insbesondere zu nennen sind die Thymidin-Kinase, die für die Phosphorylierung der Nukleosidanaloga zu den korrespondierenden aktiven Triphosphatderivaten von großer Bedeutung ist.

Die Phosphorylierung ist ein entscheidender Schritt für die Aktivierung der Nukleosidanaloga, um antiviral wirksam zu werden.

Das wird auch durch unsere Untersuchung belegt. Während im Fluoreszenzfokusreduktionssystem die zellulären Kinasen die Phosphorylierung übernommen haben und dabei 6 Substanzen gegen ADV 7 und 7 Substanzen gegen ADV 19 antivirale Effekte auf die Virusreplikation zeigten, waren im zellfreien *in-vitro*-Polymeraseassay nichtphosphorylierte Nukleosidderivate nicht aktiv. Der Einsatz von phosphorylierten Nukleosidanaloga führte dagegen zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Hemmung der Polymeraseaktivität.

Auch das Verhältnis von Nukleosiden zu strukturmodifizierten Nukleosidanaloga ist von Bedeutung. So ist eine Steigerung der antiviralen Aktivität durch negativen feedback möglich. Durch eine kompetitive Hemmung wird das Verhältnis zugunsten der

Analogsubstanz verschoben und dadurch stärkere antivirale Aktivität verursacht.

Im Fluoreszenzfokusreduktionsassay haben von den *3'-Fluor-2'-desoxynukleosiden* die entsprechenden Thymidin- Cytosin und das Guanosinderivat antivirale Aktivität gezeigt, wohingegen Uridin- und Adenosinnukleosid nicht gegen ADV 7 und ADV 19 wirksam waren.

Von den Substanzen FGdR, FUdR und FTdR ist ebenfalls eine protektive Wirkung gegen HIV induzierten zytopathischen Effekt (Balzarini *et al.*, 1988; Matthes *et al.*, 1988) beschrieben worden. Diese Wirkung wird auf die Hemmung der Reversen Transkriptase zurückgeführt. Auch eine Hemmung der DNA-Polymerase des Hepatitis B Virus durch FTdR, FCdR und FGdR konnte nachgewiesen werden (Matthes *et al.*, 1991; Meisel *et al.*, 1990). In klinischen Versuchen wurde beobachtet, dass FTdR lebertoxisch ist (Sommadossi, 1995). Auch ein inhibitorischer Effekt auf den zellulären Nukleosidstoffwechsel ist bekannt.

Die Wirksamkeit der Substanzen gegen ADV-Wachstum liegt ebenfalls auf der Ebene der Polymerase.

FUdR ist Hemmer der Thymidylat-Synthetase und verhindert so die Umwandlung von dUMP zu dTMP. Durch diesen Mechanismus kommt es zu einer Beeinflussung des intrazellulären Thymidintriphosphatpools (Ahluwalia *et al.*, 1996). Gegen ADV hatte dieser Effekt aber keine Wirkung.

Aus der Gruppe 2',3'-Didesoxynukleoside waren das Cytidin-, das Guanosin- und das Adenosinderivat wirksam, wobei ddG nur gegen ADV 19 nicht aber gegen ADV 7 wirksam war.

Für alle verwendeten Testsubstanzen ist, wenn auch mit unterschiedlicher Aktivität Wirksamkeit gegen HIV beschrieben worden. Das Ziel ist, die Reverse Transkriptase zu hemmen.

ddC (Zalcitabin, Hivid[®]) wird als Therapeutikum gegen HIV verwendet (Jablonowski, 2000), häufig in Kombination mit Azidothymidin und anderen RT-Inhibitoren, um Resistenzentwicklungen zu vermeiden (Jablonowski, 1995; Shirasaka *et al.*, 1995; Törnevik und Eriksson, 1990). Es wird als ein starker HIV-Hemmer der dNTP Klasse angesehen (Hao *et al.*, 1988). Abhängig vom untersuchten Zelltyp wird *ddC* relativ schlecht zu seinen aktiven Metaboliten in Mono-, Di- und Triphosphatform umgewandelt. Die Phosphorylierung zum *ddCMP* erfolgt durch die Desoxycytidin-Kinase, ein Enzym der S-Phase des Zellzyklus. Die Phosphorylierung bis zum *ddCTP* erfolgt dann durch weitere Kinasen. Die Aktivität der Kinasen für *ddC* und *ddI*, welches nicht getestet wurde, ist unabhängig vom Zellzyklus konstant (Balzarini *et al.*, 1988; Sommadossi, 1995).

Der degradierende Stoffwechselweg von *ddC* zum Uridinderivat erfolgt durch die Deaminase. Er verläuft sehr langsam, wodurch eine Wirkungsverstärkung durch Akkumulation der aktiven Substanz möglich sein könnte. Nur 49% des in die Zelle aufgenommenen *ddC* werden phosphoryliert, die beiden anderen Abbauprodukte sind zu 45% Didesoxycytidindiphosphatethanolamin und zu 6% Didesoxycytidincholin (Törnevik und Eriksson, 1990).

Die Initialisierung der Adenovirus-DNA-Replikation wird durch die kovalente Bindung von *dCMP* über einen Serinrest des präterminalen Proteins eingeleitet. Das präterminale Protein hat die Funktion eines Primers (Challberg *et al.*, 1982; Tamanoi und Stillman, 1982). Eine Hemmung dieser Reaktion durch *ddC*, in aktiver Form als *ddCTP*,

würde die antivirale Wirkungsweise von ddC über eine Hemmung durch „chain Termination“ hinaus erklären. Analog wären auch die Hemmwirkung der anderen Cytidinanaloga, FCdR und ddeC.

ddA wird im Zellstoffwechsel zum Inosinderivat *ddI* umgewandelt und dieses dann schnell zu Hypoxanthin verstoffwechselt. Didesoxyinosin wird als Didanosin (Videx[®]) gegen HIV eingesetzt. In klinischen Versuchen hat sich gezeigt, dass *ddA* stark nierentoxisch ist. Während *ddA* wirksam gegen HIV ist, hat sich eine zusätzliche Substitution am 5'-Rest zu 2',3',5'-Tridesoxyadenosin als wirkungslos erwiesen (Masood *et al.*, 1990; Mitsuya und Broder, 1987). *ddT* und *ddG* sind ebenfalls antiviral wirksam, aber auch stärker zytotoxisch als *ddC* und *ddA*.

Allgemein kann die Wirkung der Purinderivate *ddA* und *ddG* durch eine Kombination mit Ribavirin gesteigert werden, während eine Kombination von Ribavirin und *ddC* eine Verringerung der antiviralen Wirkung verursacht. Alle *ddNTP*'s beeinflussen neben ihrer Wirkung auf die Polymerase auch die Exonukleasefunktion des Enzyms. Das bedeutet, dass eine Inkorporation in die DNA erfolgen kann, ohne dass der Antimetabolit anschließend wieder ausgeschnitten wird (Baba *et al.*, 1987).

Bei den 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxynukleosiden zeigte nur *ddeC* eine antivirale Wirksamkeit gegen ADV 19.

ddeT ist als Stavudin (D4T, Zerit[®]) in der Therapie gegen HIV zugelassen (Jablonowski, 2000). Es ist strukturverwandt mit Azidothymidin und sein Stoffwechselweg und das Aktivitätsschema sind AZT sehr ähnlich. Es wird von der Thymidin-Kinase zum Monophosphat, von der Thymidylat-Kinase zum Diphosphat und von

Pyrimidin-Diphosphat-Kinasen zum ddeTTP phosphoryliert. Da die Thymidin-Kinase ein Zellzyklus abhängiges Enzym ist, das nur in der S-Phase des Zellzyklus aktiv ist, zeigt ddeT nur in sich teilenden Zellen eine antivirale Wirkung. Besonders ist auch, dass ddeT in geringen Konzentrationen zu einem prozentual geringeren Anteil phosphoryliert wird als in hoher Konzentration (Ahluwalia *et al.*, 1996).

ddeT wird in die DNA inkorporiert. Im Gegensatz zu AZT wird aber die 3'→5' Exonukleasefunktion der DNA-Polymerase δ nicht beeinflusst, so dass in zelluläre DNA eingefügtes ddeT wieder ausgeschnitten wird. Das ist vermutlich ein Grund, warum ddeT geringer toxisch als AZT ist (Huang *et al.*, 1992).

ddeC (D4C) ist ebenfalls antiretroviral aktiv. Die Wirkung beider Pyrimidinderivate wird von Ribavirin gehemmt (Baba *et al.*, 1987).

Da die ADV-Polymerase ebenfalls über eine Exonukleasefunktion verfügt, würde eine Hemmung dieser Funktion durch die Testsubstanzen zu einem stärkeren Einbau der Nucleosidanaloga in den wachsenden DNA-Strang mit folgendem Kettenabbruch führen.

N₃AdR aus der Gruppe der 3'-Azido-2'-desoxynucleoside hat gegenüber ADV 7 einen Hemmeffekt gezeigt. Die anderen Substanzen dieser Gruppe haben sich als unwirksam erwiesen.

Die bekannteste Substanz dieser Gruppe ist *N₃TdR*, das als Azidothymidin (Retrovir[®]) in der Behandlung von HIV eingesetzt wird. Der lange Weg zur Anwendung wird dadurch deutlich, dass es schon vor etwa 30 Jahren synthetisiert und seit etwa 1990 klinisch eingesetzt wird. Zu seinen metabolischen Eigenschaften liegen Untersuchungen vor. Es wird intrazellulär von der Thymidin-Kinase, der Thymidylat-Kinase und der Pyrimidin-Diphosphat-Kinase schrittweise zum Triphosphat

phosphoryliert. Die intrazelluläre Halbwertszeit beträgt 3-4 Stunden. Durch die Einführung der Azidogruppe in 3'-Position ist die Lipophilie dieser Substanzgruppe im Vergleich zu den anderen Nukleosidanaloga größer und die Überwindung der Zellmembran durch Diffusion und Aufnahme in die Zelle erleichtert (Balzarini *et al.*, 1988). Die Aktivität der Thymidin-Kinase ist vom Zellzyklus abhängig. Das Ausmaß der Phosphorylierung ist demzufolge von der Zellproliferation abhängig, und die antivirale Wirkung ist in proliferierenden Zellen größer als in ruhenden Zellen. Toxischer Metabolit ist 3'-Amino-3'-desoxythymidin (AMP). An der Umwandlung sind das Cytochrom P450 und die NADPH Cytochrom P450 Reduktase beteiligt. Die antivirale Wirkung gegen HIV ist auf eine Hemmung der Reversen Transkriptase zurückzuführen. Es kommt zu einem Einbau in den wachsenden DNA-Strang, wodurch es zu einem Stopp der Kettenverlängerung kommt. Da auch eine Hemmung der Exonukleasefunktion der zellulären Polymerase nachgewiesen wurde, ist auch eine Inkorporation in zelluläre DNA möglich, was Nebenwirkungen wie Myelotoxizität mit Anämie und Neutropenie bei klinischer Anwendung von AZT erklärt. Es liegt eine kompetitive Hemmung von Thymidintriphosphat vor. Die Affinität zum viralen Polymeraseenzym ist bedeutend größer als die Affinität zu zellulären Polymerasen (Huang *et al.*, 1989).

Die fehlende Wirksamkeit gegenüber ADV 7 und ADV 19 könnte mit der fehlenden Phosphorylierung der Substanzen oder mit einer fehlenden Affinität zur ADV-Polymerase zu begründen sein.

Die Reaktion mit der Thymidylat-Kinase bewirkt eine Verringerung des Niveaus der natürlichen Pyrimidintriphosphate dTTP und dCTP und fördert die stärkere Verstoffwechslung der Analogsubstanz N₃TdR (Mitsuya und Broder, 1987).

Durch Beeinflussung des intrazellulären Stoffwechsels ist eine Änderung der Wirkung von N_3TdR möglich. Acyclovir als Guanosinanalogen verstärkt die Wirkung von N_3TdR . Der Mechanismus ist nicht bekannt (Goulaouic *et al.*, 1994). Hydroxyurea und Thymidin sind bekannte Hemmer der Ribonukleotid-Reduktase. Das dadurch veränderte Verhältnis von $dTTP/N_3TdR$ wirkt sich ebenfalls zugunsten einer Wirkungsverstärkung von N_3TdR aus. Ein anderer Einfluss von Hydroxyurea ist die Förderung der Aktivität der Thymidin-Kinase, wodurch eine verstärkte Phosphorylierung von N_3TdR zum N_3TdR -Triphosphat erfolgt (Gao *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1994). Diese Eigenschaft könnte für Kombinationsschemata genutzt werden. Antagonistisch wirkt dagegen die Kombination von Azidopyrimidinanaloga mit Ribavirin. Es kommt zu einer Hemmung der Phosphorylierung der Pyrimidinanaloga und dadurch zu einer Verminderung der antiviralen Wirkung (Baba *et al.*, 1987).

3'-Fluor-5-R-desoxynukleoside zeigten gegenüber ADV 7 und ADV 19 keine Wirksamkeit.

Die substituierten Gruppen sind Chlor bei FCIUdR und FCICdR, Brom bei FBrUdR und Methyl bei FMetCdR. Die daraus resultierende Struktur bewirkt zusätzlich zur Hemmung der 3'-5'-Phosphodiesterbindung eine Hemmung der Basenpaarung zwischen Nucleosiden in der DNA-Kette.

Durch eine Einführung dieser Gruppen wird auch die Affinität zur Desoxythymidin-Kinase erhöht. Durch erhöhte Phosphorylierung wird die antivirale Wirkung im Vergleich zu den Muttersubstanzen verstärkt. Damit weisen diese Substanzen eine ähnliche Struktur auf wie (E)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin (BVDU). BVDU ist ein starker, selektiver

Hemmer der Vermehrung von Herpesviren. Es kommt zur Hemmung der Polymerase und zum Einbau in die DNA (De Clercq, 1993; Kimura *et al.*, 1988). Auch FCIUdR und FMetCdR weisen ein antivirales Wirkungsspektrum gegen HIV und Hepatitis B Virus auf (Balzarini, 1989; Matthes *et al.*, 1991; Meisel *et al.*, 1990). Fehlende Replikationshemmung gegenüber ADV ist auf fehlende intrazelluläre Verstoffwechslung zurückzuführen.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der antiviralen Effekte im Hinblick auf die geprüften Serotypen ADV 7 und ADV 19 zeigt sich ein übereinstimmendes Wirkprofil für FTdR und ddC. Die IC₅₀-Werte von 1,3 µM und 6,1 µM bzw. 3,1 µM und 5,5 µM liegen in der gleichen Größenordnung.

Die IC₅₀-Werte der Substanz FCdR war für ADV 7 mit 61 µM zehnfach höher und für ADV 19 40-fach höher als für FTdR.

Unterschiede im Wirkprofil gegen beide ADV-Serotypen fanden wir bei dem Guanosinanalogen FGdR, bei dem für ADV 7 eine 25-fach höhere Dosis erforderlich war im Vergleich zu ADV 19.

Im Gegensatz dazu war für ddA der IC₅₀-Wert bei ADV 19 33-fach höher im Vergleich zu ADV 7.

Im Vergleich zu Untersuchungen mit ADV 2 und ADV 3 waren bei ADV 7 und ADV 19 höhere Substanzkonzentrationen zum Erreichen der IC₅₀ erforderlich. Während der für ADV 19 ermittelten Werte, das 2,6 bzw. 6,5 x 10¹-fache beträgt, waren bei ADV 7 eine 1,2 x 10² bzw. 3 x 10²-fache Substanzkonzentrationen erforderlich (Mentel *et al.*, 1997).

Eine Phosphorylierung der Nukleosidanaloga durch virale Enzyme vergleichbar der Thymidin-Kinase bei Herpesvirus 1 und Herpesvirus 2

mit unterschiedlicher Affinität zu Guanosinanaloga ist nicht anzunehmen. Von Adenoviren sind vergleichbare Enzyme, die in den zellulären Nucleosidstoffwechsel eingreifen bisher nicht bekannt.

Zur weiteren Spezifizierung der Wirkung der Nucleosidanaloga auf den viralen Replikationszyklus wurde auch der Einfluss auf die DNA-Synthese untersucht.

Bei Inkubation virusinfizierter Zellen in Gegenwart von ddC konnte keine ADV-DNA mehr nachgewiesen werden. Für die PCR-Amplifikation wurden Oligonucleotidprimer aus der hochkonservierten DNA-Region des Adenovirushexons genutzt. Die Sensitivität der PCR lag bei 400 Genomkopien. In Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Konzentration der Nucleosidanaloga kam es zur Reduktion oder völligen Blockade der Nucleinsäurebildung und belegt, dass die DNA-Synthese der Adenoviren das Target der Nucleosidanaloga ist. Der Angriffspunkt ist an verschiedenen Punkten der DNA-Synthese denkbar. Es ist möglich, dass es zum DNA-Kettenabbruch durch „chain termination“ kommt. Es ist auch eine direkte Hemmung der ADV-Polymeraseaktivität denkbar. Außerdem ist über einen Eingriff in den endogenen Nucleosidstoffwechsel durch kompetitive Enzymhemmung eine Störung im endogenen zellulären Nucleosidstoffwechsel und somit eine Hemmung der ADV-DNA-Synthese erklärbar. Diese Wirkungsweise gegenüber Adenoviren würde sich mit den Wirkmechanismen für Nucleosidanaloga gegenüber HIV oder Hepatitis B Virus decken. Auch für Herpesviren gibt es für Nucleosidanaloga einen ähnlichen Mechanismus.

Nach dem Beleg der Hemmung der ADV-DNA-Synthese durch ddC war weiterführend von sehr großem Interesse, den Einfluss auf die ADV-Polymerase zu untersuchen.

Allgemein wird die antivirale Hemmung durch Nukleosidanaloga auf die Strukturmodifikation der Hydroxylgruppe in 3'-Position des Hexosemolekül zurückgeführt, wodurch die Ausbildung einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleosiden verhindert wird und es zum Kettenabbruch der synthetisierten DNA kommt. Diese Strukturmodifikation ist allen untersuchten Substanzen gemeinsam.

In infizierten Zellen wird ADV-Polymerase nur in sehr geringen Mengen exprimiert. Das behindert strukturelle und funktionelle Studien.

Watson und Hay entwickelten 1990 ein heterologes System für High-level Expression von Ad pol in Insektenzellen. Das Baculovirus *Autographica Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV) ist vielfach erfolgreich als Expressionsvektor eingesetzt worden. Unter der Kontrolle des sehr starken Promotors des Polyhedrin-Gens können relativ hohe Spiegel von Fremdprotein synthetisiert werden. Insektenzellen infiziert mit rekombinantem Baculovirus sind deshalb ein gutes System für Überexpression.

Wir nutzten zur Etablierung des Polymeraseassay eine Ad pol Rekombinante zur Präparation von Adenovirus Polymerase.

In wildtypinfizierten Zellen wird das Polyhedrin erst 48 Stunden nach Infektion nachweisbar. Das Niveau der Proteinsynthese erreicht seinen Höhepunkt nach 72 Stunden und erlischt nach 96 Stunden. Das Profil für die Polymeraseexpression sieht ähnlich aus, aber wahrscheinlich kommt es durch intrazelluläre Proteinakkumulation schon nach 48 Stunden zu einem Abfall der Nachweisbarkeit (Watson und Hay, 1990).

Nach Proteinextraktion aus den Ad pol vektorinfizierten Zellen war es möglich, mit DNA Template, dNTP's und radioaktiv markiertem [α - 32 P]dATP radioaktiv markierte DNA zu synthetisieren.

Eine aktive Polymerase im Proteinextrakt war damit nachgewiesen.

Für kernhaltige Zellen sind verschiedene Polymeraseformen bekannt. Für die Replikation der ADV-DNA wurde zunächst eine Beteiligung der zellulären Polymerasen α und γ diskutiert (Krokan *et al.*, 1979) obwohl die ADV-DNA-Synthese in intakten Zellen, vor allem HELA-Zellen, weniger durch die Wirkung von Aphidicolin zu hemmen war als die Synthese zellulärer DNA oder anderer viraler DNA in anderen Zellsystemen. Dies wurde auf einen möglichen degradativen Stoffwechselweg von Aphidicolin durch zelluläre Enzyme in HELA-Zellen zurückgeführt, der möglicherweise durch eine ADV 2 Infektion noch verstärkt würde. Später fand man in ADV 2 infizierten Zellen ein 140 kD Protein mit Aphidicolin resistenter DNA-Synthese-Aktivität, welches als ADV-Polymerase charakterisiert wurde.

Da neben der Expression der ADV-Polymerase im Baculovirusexpressionssystem auch zelluläre Polymerasen zu erwarten sind, erfolgte von uns auch eine Charakterisierung der ADV-Polymerase in Gegenwart von Aphidicolin.

Aphidicolin ist ein tetrazyklisches Diterpenoid und wird von dem Pilz *Cephalosporium Aphidicola* synthetisiert. Seine spezifische Wirkung auf verschiedene Polymeraseformen wurde genutzt, um die im Zellextrakt möglicherweise vorhandenen unterschiedlichen Polymeraseformen zu differenzieren. Gehemmt werden durch Aphidicolin die Wirkung der zellulären Polymerasen α , δ und die Baculovirus AcNPV Polymerase. Die Adenovirus Polymerase wird nicht von Aphidicolin beeinflusst (Lichy *et al.*, 1982).

Nach Infektion von *Spodoptera frugiperda*-Zellen mit rekombinantem Baculovirus erhielten wir ein zur DNA-Synthese befähigtes Protein. Dieses Polymerasepräparat bildet auch in Gegenwart von Aphidicolin DNA und belegt die Expression von ADV-Polymerase in den infizierten Zellen.

Dieser etablierte Assay wurde zur Evaluierung der Nukleosidanaloga auf hemmende Aktivität gegenüber Adenoviren eingesetzt. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse des Fokusreduktionsassay und Polymeraseassay ist nur bedingt möglich. Während im intrazellulären Milieu im Fluoreszenzfokusreduktionsassay Nukleosidanaloga dem Einfluss aktivierender und abbauender Enzyme ausgesetzt sind, ist der Polymeraseassay frei von zellulären Einflüssen.

Für 6 Nukleosidanaloga konnte eine hemmende Wirkung auf die ADV-Polymerase nachgewiesen werden. Ob sich diese Wirkung in einer Blockierung des Enzyms oder durch Kettenabbruch der DNA-Synthese auswirkt, ist nicht geklärt. Beide Hemmmechanismen sind möglich.

In weiter führenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte inzwischen gezeigt werden, dass eine kompetitive Hemmung der Adenovirus-DNA-Polymerase durch ddC-Triphosphat vorliegt. Interessant ist, dass die Untersuchung von L-Enantiomeren von FTdR und ddC keine inhibitorische Wirkung gegen Adenoviren im Polymeraseassay zeigte, während die D-Enantiomere potente Inhibitoren waren. (Mentel *et al.*, 2000).

Darüber hinaus konnte die potente Wirkung von ddC gegen ADV auch im Modell nachgewiesen werden.

Die orale Applikation von ddC an Balb c Mäusen reduzierte nicht nur deutlich histologisch sichtbare Lungenläsionen im Mausmodell sondern auch die Ausprägung der Lungenkonsolidierung. Die Menge von TNF α

in der ddC behandelten Adenovirus infizierten Maus war um das dreifache reduziert (Mentel und Wegner, 2000).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass ddC ein potentielles Antivirustatikum gegen Adenoviren bei Immunsuprimierten sein kann, bei denen ADV-Infektionen mit schweren Verläufen und fatalem Ausgang beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass ddC vor allem das Beherrschen von disseminierten Adenovirusinfektionen in immunsupprimierten und immunkompetenten Patienten ermöglichen könnte.

8. Literaturverzeichnis

Ahluwalia, G. S., Gao, W. Y., Mitsuya, H., and Johns, D. G. (1996). 2',3'-Didehydro-3'-deoxythymidine: Regulation of its metabolic activation by modulators of thymidine-5'-triphosphate biosynthesis. *Mol. Pharmacol.* **50**, 160-165.

Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Herdewijn, P., De Clercq, E., and Desmyter, J. (1987). Ribavirin antagonizes inhibitory effects of pyrimidine 2',3'-dideoxynucleosides but enhances inhibitory effects of purine 2',3'-dideoxynucleosides on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1613-1617.

Balzarini, J., van Aerschot, A., Pauwels, R., Baba, M., Schols, D., Herdewijn, P. and De Clercq, E. (1989). 5-Halogeno-3'-fluoro-2',3'-dideoxyuridines as inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV): Potent and selective anti-HIV activity of 3'-fluoro-2',3'-dideoxy-5-chlorouridine. *Mol. Pharmacol.* **35**, 571-577.

Balzarini, J., Baba, M., Pauwels, R., Herdewijn, P., Wood, S. G., Robins, M. J., and De Clercq, E. (1988). Potent and selective activity of 3'-azido-2,6-diaminopurine-2',3'-dideoxyriboside, 3'-fluoro-2,6-diaminopurine-2',3'-dideoxyriboside, and 3'-fluoro-2',3'-dideoxyguanosine against human immunodeficiency virus. *Mol. Pharmacol.* **33**, 243-249.

Balzarini, J., Holy, A., Jindrich, J., Dvorakova, H., Hao, Z., Snoeck, R., Herdewijn, P., Johns, D. G., and De Clercq, E. (1991). 9-[(2RS)-3-fluoro-2-phosphonylmethoxypropyl] derivatives of purines: A class of highly selective antiretroviral agents in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**, 4961-4965.

Balzarini, J., Pauwels, R., Baba, M., Herdewijn, P., De Clercq, E., Broder, S., and Johns, D. G. (1988). The in vitro and in vivo anti-retrovirus activity, and intracellular metabolism of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine and 2',3'-dideoxycytidine are highly dependent on the cell species. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 897-903.

Carmine, A. A., Brogden, R. N., Heel, R. C., Speight, T. M., and Avery, G. S. (1982). Trifluridine: A review of its antiviral activity and therapeutic use in the topical treatment of viral eye infections. *Drugs* **23**, 329-353.

Cepko, C. L., Whetstone, C. A., and Sharp, P. A. (1983). Adenovirus hexon monoclonal antibody that is group specific and potentially useful as a diagnostic reagent. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 360-364.

Challberg, M. D., Desiderio, S. V., and Kelly, T. J. Jr. (1980). Adenovirus DNA replication in vitro: Characterization of a protein covalently linked to nascent DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **77**, 5105-5109.

Challberg, M. D., Ostrove, J. M., and Kelly, T. J. Jr. (1982). Initiation of adenovirus DNA replication: Detection of covalent complexes

between nucleotide and the 80-kilodalton terminal protein. *J. Virol.* **41**, 265-270.

Chen, M., Mermod, N., and Horwitz, M. S. (1990). Protein-protein interactions between adenovirus DNA polymerase and nuclear factor I mediate formation of the DNA replication preinitiation complex. *J. Biol. Chem.* **265**, 18634-18642.

Copland, W. C., Chen, M. S., and Wang, T. S. F. (1992). Human DNA polymerase α and β are able to incorporate anti-HIV deoxynucleotides into DNA. *J. Biol. Chem.* **267**, 21459-21464.

Cotton, M., and Weber, J. M. (1995). The adenovirus protease is required for virus entry into host cells. *Virology* **213**, 494-502.

Crawford-Miksza, L., and Schnurr, D. P. (1996). Seroepidemiology of new AIDS-associated adenoviruses among the San Francisco Men's Health Study. *J. Med. Virol.* **50**, 230-236.

De Clercq, E. (1993). Antiviral Agents: Characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact. *Advances in Virus Research* **42**, 1-52.

De Clercq, E. (1996). Therapeutic potential of Cidofovir (HPMPC, VistideTM) for the treatment of DNA Virus (i.e. Herpes-, Papova-, Pox-, and Adenovirus) infections. *Verhelingen Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België* **58**, 19-49.

De Clercq, E. (1997). In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 674-693.

Deryckere, F., Ebenau-Jehle, C., Wold, W. S. M., and Burgert, H. G. (1995). Tumor necrosis factor α increases expression of adenovirus E3 proteins. *Immunobiology* **193**, 186-192.

Francki, R. I. B., Fauquet, D. L., Knudson, D. L., and Brown, F. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. 140-144.(Abstract)

Gao, W. Y., Johns, D. G., Chokekijchai, S., and Mitsuya, H. (1995). Disparate actions of hydroxyurea in potentiation of purine and pyrimidine 2',3'-dideoxynucleoside activities against replication of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**, 8333-8337.

Gao, W. Y., Johns, D. G., and Mitsuya, H. (1994). Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of hydroxyurea in combination with 2',3'-dideoxynucleosides. *Mol. Pharmacol.* **46**, 767-772.

Gooding, L. R., Ranheim, T. S., Tollefson, A. E., Aquino, L., Duerksen-Hughes, P., Horton, T. M., and Wold, W. S. M. (1991). The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus function together to protect many but not all mouse cell lines against lysis by tumor necrosis factor. *J. Virol.* **65**, 4114-4123.

Goulaouic, H., Subra, F., Mouscadet, J. F., Carteau, S., and Auclair, C. (1994). Potentiation of 2',3'-dideoxycytidine (ddC) by hydroxyurea and thymidine on the Moloney murine leukemia virus (MoMLV) early replicative steps. *C. R. Acad. Sci. III.* **317**, 430-436.

Greber, U. F., Webster, P., Weber, J., and Helenius, A. (1996). The role of the adenovirus protease in virus entry into cells. *EMBO J.* **15**, 1766-1777.

Grimwood, K., Carzino, R., Barnes, G. L., and Bishop, R. F. (1995). Patients with enteric adenovirus gastroenteritis admitted to an Australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 131-136.

Hao, Z., Cooney, D. A., Hartman, N. R., Perno, C. F., Fridland, A., DeVico, A. L., Sarngadharan, M. G., Broder, S., and Johns, D. G. (1988). Factors determining the activity of 2',3'-dideoxynucleosides in suppressing human immunodeficiency virus in vitro. *Mol. Pharmacol.* **34**, 431-435.

Henry, L. J., Xia, D., Wilke, M. E., Deisenhofer, J., and Gerard, R. D. (1994). Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **68**, 5239-5246.

Herdewijn, P. (1992). Novel nucleoside strategies for anti-HIV and anti-HSV therapy. *Antiviral research.* **19**, 1-14.

Hierholzer, J. C. (1992). Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 262-274.

Hobbs, J. B. (1997). Purine and Pyrimidine targets. in *Comprehensive medicinal Chemistry*, Pergamon Press. Vol.2, 299-331.

Huang, P., Farquhar, D., and Plunkett, W. (1990). Selective action of 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-triphosphate on viral reverse transcriptase and human DNA polymerases. *J. Biol. Chem.* **265**, 11914-11918.

Huang, P., Farquhar, D. and Plunkett, W. (1992). Selective action of 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidinetriphosphate on human immunodeficiency virus reverse transcriptase and human DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **267**, 2817-2822.

Hui, M. B., Lien, E. J., and Trousdale, M. D. (1994). Inhibition of human adenoviruses by 1-(2'-hydroxy-5'-methoxybenzylidene)-amino-3-hydroxyguanidine tosylate. *Antiviral Res.* **24**, 261-273.

Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **147**, 258-267.

Jablonowski, H. (1995). Studies of zidovudine in combination with didanosine and zalcitabine. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **10 Suppl 1**, 52-56.

Jablonowski, H. (2000). Antiretrovirale Therapie: Kurzprofil aller verfügbaren Medikamente. *MMW-Fortschr.Med.* **142 Sonderheft 1**, 18-29.

Kimura, T., Nishizawa, T., Yoshimizu, M., and De Clercq, E. (1988). Inhibitory activity of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine on the salmonid herpesviruses, *Oncorhynchus masou virus* (OMV) and *Herpesvirus salmonis*. *Microbiol. Immunol.* **32**, 57-65.

Kitabayashi, A., Hirokawa, M., Kuroki, J., Nishinari, T., Niitsu, H., and Miura, A. B. (1994). Successful vidarabine therapy for adenovirus type 11-associated acute hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **14**, 853-854.

Krokan, H., Schaffer, P., and DePamphilis, M. L. (1979). Involvement of eucaryotic deoxyribonucleic acid polymerases α and γ in the replication of cellular and viral deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **18**, 4431-4443.

Lichy, J. H., Field, J., Horwitz, M. S., and Hurwitz, J. (1982). Separation of the adenovirus terminal protein precursor from its associated DNA polymerase: Role of both proteins in the initiation of adenovirus DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **79**, 5225-5229.

Masood, R., Ahluwalia, G. S., Cooney, D. A., Fridland, A., Marquez, V. E., Driscoll, J. S., Hao, Z., Mitsuya, H., Perno, C. F., Broder, S., and Johns, D. G. (1990). 2'-Fluoro-2',3'-dideoxy-arabinosyladenine: A

metabolically stable analogue of the antiretroviral agent 2',3'-dideoxyadenosine. *Mol. Pharmacol.* **37**, 590-596.

Matsuse, T., Matsui, H., Shu, C. Y., Nagase, T., Wakabayashi, T., Mori, S., Inoue, S., Fukuchi, Y., and Orimo, H. (1994). Adenovirus pulmonary infections identified by PCR and in situ hybridisation in bone marrow transplant recipients. *J. Clin. Pathol.* **47**, 973-977.

Matthes, E., Lehmann, C., Scholz, D., Rosenthal, H. A., and Langen, P. (1988). Phosphorylation, anti-HIV activity and cytotoxicity of 3'-fluorothymidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 825-831.

Matthes, E., Reimer, K., von Janta-Lipinski, M., Meisel, H., and Lehmann, C. (1991). Comparative inhibition of hepatitis B virus DNA polymerase and cellular DNA polymerases by triphosphates of sugar-modified 5-methyldeoxycytidines and of other nucleoside analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1254-1257.

Mayer, A., Gelderblom, H., Kümel, G., and Jungwirth, C. (1992). Interferon- γ -induced assembly block in the replication cycle of adenovirus 2: Augmentation by tumour necrosis factor- α . *Virology* **187**, 372-376.

Meisel, H., Reimer, K., von Janta-Lipinski, M., Bärwolff, D., and Matthes, E. (1990). Inhibition of hepatitis B virus DNA polymerase by 3'-fluorothymidine triphosphate and other modified nucleoside triphosphate analogs. *J. Med. Virol.* **30**, 137-141.

Mentel, R. and Döhner, L. (1996). Humane Adenoviren. in: Virusdiagnostik, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin-Wien. 103-114.

Mentel, R., Matthes, E., von Janta-Lipinski, M., and Wegner, U. (1996). Fluorescent focus reduction assay for the screening of antiadenoviral agents. *J. Virol. Methods* **59**, 99-104.

Mentel, R., Matthes, E., Kinder, M., von Janta-Lipinski, M., and Wegner, U. (1997). Inhibitory activity of modified nucleoside analogues against adenoviruses. *Antiviral Res.* **34**, 113-119.

Mentel, R., and Wegner, U. (2000). Evaluation of the efficacy of 2',3'-dideoxycytidine against adenovirus infection in a mouse pneumonia model. *Antiviral Res.* **47**, 79-87.

Mentel, R., Kurek, S., Wegner, U., von Janta-Lipinski, M., Gürtler, L., and Matthes, E. (2000). Inhibition of adenovirus DNA polymerase by modified nucleoside triphosphate analogs correlate with their antiviral effects on cellular level. *Med. Microbiol. Immunol.* **189**, 91-95.

Mitsuya, H., and Broder, S. (1987). Strategies for antiviral therapy in AIDS. *Nature* **325**, 773-778.

Montone, K. T., Furth, E. E., Pietra, G. G., and Gupta, P. K. (1995). Neonatal adenovirus infections: A case report with in situ hybridisation conformation of ascending intrauterine infection. *Diagn. Cytopathol.* **12**, 341-344.

Mul, Y. M. and Van der Vliet, P. C. (1992). Nuclear factor I enhances adenovirus DNA replication by increasing the stability of a preinitiation complex. *EMBO J.* **11**, 751-760.

Mul, Y. M., van Miltenburg, R. T., De Clercq, E., and Van der Vliet, P. C. (1989). Mechanism of inhibition of adenovirus DNA replication by the acyclic nucleoside triphosphate analogue (S)-HPMPApp: Influence of the adenovirus DNA binding protein. *Nucleic Acids Res.* **17**, 8917-8929.

Nara, P. L., Hwang, K. M., Rausch, D. M., Lifson, J. D., and Eiden, L. E. (1989). CD4 antigen-based antireceptor peptides inhibit infectivity of human immunodeficiency virus in vitro at multiple stages of the viral life cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **86**, 7139-7143.

Nemerow, G. R., and Stewart, P. L. (1999). Role of $\alpha(v)$ integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 725-734.

Rekosh, D. M. K., Russell, W. C., Bellet, A. J. D., and Robinson, A. J. (1977). Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* **11**, 283-295.

Reusser, P. (1996). Herpesvirus resistance to antiviral drugs. a review of the mechanism, clinical importance and therapeutic options. *J. Hosp. Infections* **33**, 235-248.

Samuel, C. E. (1991). Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology* **183**, 1-11.

Shenk, T. (1996). Adenoviridae and their Replication. in *Fields Virology* Third edition, Raven Publishers, Philadelphia 1996

Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W. Y., Kojima, E., Alcaide, M. L., Chokekijchai, S., Roy, B. M., Arnold, E., Yarchoan, R. and Mitsuya, H. (1995). Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1995**, 2398-2402.

Siegal, F. P., Dikman, S. H., Arayata, R. B., and Bottone, E. J. (1981). Fatal disseminated adenovirus 11 pneumonia in an agammaglobulinemic patient. *Am. J. Med.* **71**, 1062-1067.

Sommadossi, J. P. (1993). Nucleoside analogs: Similarities and differences. *Clin. Infect. Dis.* **16 Suppl 1**, 7-15.

Sommadossi, J. P. (1995). Comparison of metabolism and in vitro antiviral activity of stavudine versus other 2',3'-dideoxynucleoside analogues. *J. Infect. Dis.* **171 Suppl 2**, 88-92.

Tamanoi, F., and Stillman, B. W. (1982). Function of adenovirus terminal protein in the initiation of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **79**, 2221-2225.

Temperley, S. M., and Hay, R. T. (1992). Recognition of the adenovirus type 2 origin of DNA replication by the virally encoded DNA polymerase and preterminal proteins. *EMBO J.* **11**, 761-768.

Tisdale, M. (2000). Monitoring of viral susceptibility, new challenges with the development of influenza NA inhibitors. *Review in Med. Virology.* **10**, 45-55.

Tollefson, A. E., Scaria, A., Hermiston, T. W., Ryerse, J. S., Wold, L. J., and Wold, W. S. M. (1996). The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J. Virol.* **70**, 2296-2306.

Tollefson, A. E., Stewart, A. R., Yei, S., Saha, S. K., and Wold, W. S. M. (1991). The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus form a complex and function together to down-regulate the epidermal growth factor receptor. *J. Virol.* **65**, 3095-3105.

Törnevik, Y., and Eriksson, S. (1990). 2',3'-Dideoxycytidine toxicity in cultured human CEM T lymphoblasts: Effects of combination with 3'-azido-3'-deoxythymidine and thymidine. *Mol. Pharmacol.* **38**, 237-243.

Vazquez-Padua, M. A., Starnes, M. C., and Cheng, Y. C. (1990). Incorporation of 3'-azido-3'-deoxythymidine into cellular DNA and its removal in a human leukemic cell line. *Cancer Commun.* **2**, 55-62.

Viswalingam, N. D. (1993). Adenovirus keratoconjunctivitis: An enigma. *Eye* **7**, 5-7.

Watson, C. J., and Hay, R. T. (1990). Expression of adenovirus type 2 DNA polymerase in insect cells infected with a recombinant baculovirus. *Nucleic. Acids. Res.* **18**, 1167-1173.

Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., and Nemerow, G. R. (1993). Integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**, 309-319.

Wold, W. S. M., and Gooding, L. R. (1991). Region E3 of adenovirus: A cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* **184**, 1-8.

Zahradnik, J. M., Spencer, M. J., and Porter, D. D. (1980). Adenovirus infection in the immunocompromised patient. *Am. J. Med.* **68**, 725-732.

Zarraga, A. L., Kerns, F. T., and Kitchen, L. W. (1992). Adenovirus pneumonia with severe sequelae in an immunocompetent adult. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 712-713.

9. Zusammenfassung

Zielstellung der Arbeit war es den Einfluss und Wirkmechanismus strukturmodifizierter Nucleosidanaloga auf die Replikation von Adenoviren zu untersuchen.

Es wurden 20 strukturmodifizierte Nucleosidanaloga mittels Fluoreszenzfokusreduktionsassay auf ihre inhibitorische Wirkung bei der Replikation von Adenovirus Typ 7 und Adenovirus Typ 9 in FL-Zellen evaluiert.

Gegenüber ADV 7 hatten 6 Substanzen inhibitorische Wirkung. Effektivste Substanzen waren ddA, ddC, N₃AdR sowie FTdR mit kalkulierten IC₅₀-Werten im Bereich von 2,8 µM bis 6,1 µM.

Gegenüber ADV 19 erwiesen sich 7 Substanzen als inhibitorisch wirksam. Hierbei waren FGdR, FTdR, ddC und FCdR die wirksamsten Substanzen. Die kalkulierten IC₅₀-Hemmwerte lagen im Bereich von 1 µM bis 53 µM.

In weiterführenden Untersuchungen wurde der Effekt von ddC auf die virale DNA-Synthese mit der PCR untersucht. Bei 10 µM und 1 µM wurde eine komplette Hemmung beobachtet.

Zur Evaluierung des Wirkmechanismus der Nucleosidanaloga wurde ein Adenovirus DNA-Polymeraseassay etabliert. Zunächst erfolgte die Synthese der ADV-Polymerase unter Nutzung eines rekombinanten Ad pol Baculovirus Systems. Die Proteinexpression erfolgte nach Infektion in Spodoptera frugiperda-Zellen. Die Analyse von Kernextrakten in der Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ließ ein Protein mit dem Molekulargewicht von 140 kD, der Größe der ADV-Polymerase erkennen.

Für den Polymeraseassay wurden die optimalen Parameter evaluiert. Es wurden 1,25 µg Proteinkonzentration und eine Inkubationszeit von 60 min. definiert.

Mit diesem *in-vitro*-Assay wurden die Triphosphate der Substanzen FTdR, FGdR, FUdR, ddC, ddT und ddG hinsichtlich einer inhibitorischen Wirkung auf die ADV-Polymerase untersucht. Für alle evaluierten Nukleosidtriphosphat-Analoga, die Aktivität auf zellulärem Level gezeigt hatten, konnte eine dosisabhängige Hemmung der ADV-Polymerase nachgewiesen werden. Die kalkulierten IC₅₀-Konzentrationen lagen im Bereich von 0,63 µM bis 2,96 µM. Wirksamste Substanzen waren FTdR, FGdR und ddC.

10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad pol	Adenoviruspolymerase
AcNPV	Autographa californica nuclear polyhedrosis virus
ADV	Adenovirus
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	3'-Azido-3'-desoxythymidin
bp	base pairs
CAR	Coxsackie Adenovirus Receptor
CC ₅₀	Cytotoxic Concentration 50% (Zytotoxische Hemmkonzentration 50%)
CD	Cluster of differentiation (Differenzierungsgruppen)
CMV	Zytomegalie-Virus
D4C	2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxycytidin
D4T	2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxythymidin
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddA	2',3'-Didesoxyadenosin
ddC	2',3'-Didesoxycytidin

ddeA	2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxyadenosin
ddeC	2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxycytidin
ddeT	2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxythymidin
ddI	2',3'-Didesoxyinosin
ddG	2',3'-Didesoxyguanosin
ddT	2',3'-Didesoxythymidin
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelstrang DNA
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
EBV	Ebbstein-Barr-Virus
EGF	epidermal groth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
FAdR	3'-Fluor-2'-desoxyadenosin
FCdR	3'-Fluor-2'-desoxycytidin
FBrUdR	3'-Fluor-5-brom-2'-desoxyuridin
FCICdR	3'-Fluor-5-chlor-2'-desoxycytidin
FCIUdR	3'-Fluor-5-chlor-2'-desoxyuridin
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FDAPdR	2,6-Diaminopurin-2',3'-didesoxy-3'- fluorodesoxyribosid

FFU	focus forming unit (Plaques-bildende Einheit)
FGdR	3'-Fluor-2'-desoxyguanosin
FL-Zellen	Fough and Lund-Zellen
FMetCdR	3'-Fluor-5-methyl-2'-desoxycytidin
FTdR	3'-Fluor-2'-desoxythymidin
FUdR	3'-Fluor-2'-desoxyuridin
Gly	Glycin
HIV	human immunodeficiency virus (Humanes Immunschwäche Virus)
HSV	Herpes-simplex-Virus
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50% (inhibitorische Hemmkonzentration 50%)
IL	Interleukin
IRP	Interferon-regulierte Proteine
MEM	minimal essential medium
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mRNA	messenger RNA
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
N ₃ AdR	3'-Azido-2'-desoxyadenosin
N ₃ GdR	3'-Azido-2'-desoxyguanosin

N ₃ TdR	3'-Azido-2'-desoxythymidin
NF	nuclear factor
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
RT	reverse transcriptase
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Sf9	Spodoptera frugiperda-Zellen
Tab.	Tabelle
TC 100 Medium	Insektenzellenmedium
TN	Tumornekrosefaktor
VZV	Varicella-Zoster-Virus

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Danksagung

Mein Dank gilt allen die mich beim Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Frau Prof. Dr. med. R. Mentel und Frau Dr. rer. nat. U. Wegner vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Greifswald für die freundliche Überlassung des Themas, sowie für die stets konstruktiven Anregungen und kritischen Diskussionen während der gesamten Arbeit.

Ich danke auch den Mitarbeitern der Abteilung für Virologie des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, insbesondere Frau Franke, für die technische Unterstützung während der Arbeiten.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. L. Gürtler, Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Universität Greifswald für die freundlichen Hinweise beim Durchsehen der Arbeit.