

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der  
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der  
Viruskrankheiten

Sektion für Molekulare Virologie

**Defensine als innovative antivirale Therapiemöglichkeit der  
Infektion mit humanen Zytomegalieviren**

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

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

**vorgelegt von**

**Böffert, Rebecca**

**2021**

Dekan:

Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Schindler

2. Berichterstatter:

Professor Dr. O. Kagan

3. Berichterstatter:

Professor Dr. C. Sinzger

Tag der Disputation:

25.02.2021

# Inhaltsverzeichnis

---

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Das humane Zytomegalievirus.....	7
1.1.1 Aufbau .....	7
1.1.2 Zelltropismus .....	9
1.1.3 Viraler Replikationszyklus.....	10
1.1.4 Übertragung.....	12
1.1.5 Pathologie.....	13
1.1.6 Diagnostik.....	13
1.1.7 Therapie .....	14
1.2 Defensine .....	15
1.2.1 Aufbau und Klassifikation .....	15
1.2.2 Vorkommen von $\alpha$ -Defensinen .....	15
1.2.3 Wirkung von $\alpha$ -Defensinen .....	17
1.2.3.1 Direkte antivirale Aktivität.....	17
1.2.3.2 Indirekte antivirale Aktivität.....	19
1.2.4 Proteolytische Spaltung von $\alpha$ -Defensinen.....	19
1.3 Fragestellung .....	20
2 Material und Methoden .....	22
2.1 Material .....	22
2.1.1 Zellen.....	22
2.1.2 Viren .....	23
2.1.3 Peptide .....	24
2.1.4 Nährmedien .....	26
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	27
2.1.6 Reagenzien .....	28
2.1.7 Antikörper .....	30

---

# Inhaltsverzeichnis

---

2.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.9	Geräte.....	32
2.1.10	Software .....	33
2.2	Methoden .....	34
2.2.1	Zellkultur .....	34
2.2.1.1	HFF und ARPE-19 .....	34
2.2.1.2	THP-1.....	35
2.2.1.3	Makrophagen .....	35
2.2.2	Herstellung und Titration der <i>Virus-stocks</i> .....	36
2.2.3	Infektions-Assays.....	37
2.2.3.1	Screening des Peptidsets auf antivirale Aktivität.....	39
2.2.3.2	Bestimmung der IC50 für ausgewählte Peptide .....	39
2.2.3.3	Infektions-Assays mit klinischen Isolaten .....	40
2.2.3.4	Infektions-Assays mit Derivaten der Peptidfragmente.....	41
2.2.3.5	Präinkubations-Assays.....	41
2.2.3.6	<i>Time of Addition-Assays</i> .....	42
2.2.3.7	Infektions-Assays mit dem dual fluoreszierenden Virus .....	42
2.2.4	Screening des Peptidsets auf Zytotoxizität: MTT-Test.....	43
2.2.5	Bestimmung der CC50 für ausgewählte Peptide: Impedanzmessung 45	
2.2.6	Experimente mit Zebrafischen .....	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Screening eines Sets von Defensin-abgeleiteten Peptiden auf antivirale Aktivität und Toxizität .....	49
3.2	Bestimmung der IC50 und CC50 für ausgewählte Peptide .....	51
3.3	Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) gegen die Infektion mit klinischen HCMV- Isolaten .....	60
3.4	Antivirale Aktivität von Derivaten der Peptidfragmente.....	61
3.5	Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) nach Präinkubation mit HCMV.....	63

---

# Inhaltsverzeichnis

---

3.6	Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) im <i>Time of Addition-Assay</i> .....	64
3.7	Analyse des Wirkmechanismus von HD5 (1-9) mit einem dual fluoreszierenden Virus .....	65
3.8	Analyse der Toxizität von HD5 (1-9) in Zebrafischen .....	69
4	Diskussion .....	71
4.1	Antivirale Aktivität und Toxizität der Peptide .....	71
4.1.1	HD5 (1-9) ist antiviral aktiv und zeigt keine Toxizität in der Zellkultur	71
4.1.2	Antivirale Aktivität und Toxizität der Peptidbruchstücke.....	71
4.1.3	Antivirale Aktivität und Toxizität der Vollängenpeptide.....	73
4.1.4	Modifikation der Peptidbruchstücke kann zu einer erhöhten Toxizität führen	74
4.2	HD5 (1-9) zeigt antivirale Aktivität auch gegen klinische HCMV-Isolate..	75
4.3	Arginin und Cystein sind ausschlaggebend für den antiviralen Effekt von HD5 (1-9) .....	75
4.4	HD5 (1-9) interagiert direkt mit der Zelle und inhibiert die Adsorption der viralen Partikel .....	78
4.5	HD5 (1-9) hat bis zu einer Konzentration von 75 µM keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung von Zebrafischen.....	80
4.6	Ausblick.....	80
4.7	Schlussfolgerung.....	81
5	Zusammenfassung .....	82
6	Literaturverzeichnis.....	83
7	Erklärung zum Eigenanteil .....	96
8	Veröffentlichung.....	97
	Danksagung .....	98

---

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzung

---

AG	Arbeitsgruppe
ARPE-19	engl. <i>arterial retinal pigmented epithelium cells</i> , arterielle retinale pigmentierte Epithelzellen
CC50	engl. <i>half maximal cytotoxic concentration</i> , mittlere zytotoxische Konzentration
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	engl. <i>delayed-early</i> , verzögert früh
DMEM	engl. <i>Dulbecco's MEM</i>
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i> , verstärktes grün fluoreszierendes Protein
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm oder Vielfaches der Erdbeschleunigung (Zentrifuge)

**Abkürzung**

---

GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HCMV	engl. <i>human cytomegalovirus</i> , humanes Zytomegalievirus
HD	humanes Defensin
HFF	engl. <i>human foreskin fibroblasts</i> , menschliche Vorhaut-Fibroblasten
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HNP	humanes neutrophiles Peptid
HSV	Herpes-simplex-Virus
IC <sub>50</sub>	engl. <i>half maximal inhibitory concentration</i> , mittlere inhibitorische Konzentration
IE	engl. <i>immediate-early</i> , unmittelbar früh
Ig	Immunglobulin
IRL	engl. <i>internal repeat long</i> , lange interne Wiederholung
IRS	engl. <i>internal repeat short</i> , kurze interne Wiederholung
IU	engl. <i>infectious unit</i> , infektiöse Einheit
KCl	Kaliumchlorid

**Abkürzung**

---

kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
L	engl. <i>late</i> , spät
M	Molar
MEM	engl. <i>minimum essential medium</i> , etwa: minimal essentielles Medium
min	Minuten
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOI	engl. <i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NET	engl. <i>neutrophil extracellular trap</i> , neutrophile extrazelluläre Fallen
ng	Nanogramm



**Abkürzung**

---

NIEP	engl. <i>noninfectious enveloped particles</i> , nichtinfektiöse umhüllte Partikel
nm	Nanometer
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBMC	engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PDGFR $\alpha$	engl. <i>platelet-derived growth factor receptor <math>\alpha</math></i> , von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor-Rezeptor $\alpha$
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TLR	engl. <i>toll-like receptor</i> , Toll-like-Rezeptor
TRL	engl. <i>terminal repeat long</i> , lange terminale Wiederholung
TRS	engl. <i>terminal repeat short</i> , kurze terminale Wiederholung
UL	engl. <i>unique long</i> , unikal lang
UpM	Umdrehungen pro Minute
US	engl. <i>unique short</i> , unikal kurz
$\mu$ g	Mikrogramm

**Abkürzung**

---

$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Aufbau eines HCMV-Partikels ..... 7

Abbildung 2: Genom des HCMV ..... 9

Abbildung 3: Viraler Replikationszyklus..... 10

Abbildung 4: Impedanzmessung via xCELLigence ..... 45

Abbildung 5: Antivirale Aktivität von Defensinfragmenten ..... 50

Abbildung 6: Toxizität von Defensinfragmenten im MTT-Assay ..... 51

Abbildung 7: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HNP4..... 53

Abbildung 8: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HNP4 (1-11) ..... 54

Abbildung 9: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HNP4 (1-11mod) . 55

Abbildung 10: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HD5 ..... 56

Abbildung 11: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HD5 (1-9)..... 57

Abbildung 12: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HD5 (1-9mod).... 58

Abbildung 13: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HD5 (7-32)..... 59

Abbildung 14: Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) gegen die Infektion mit klinischen HCMV-Isolaten ..... 60

Abbildung 15: Antivirale Aktivität von Derivaten der Peptidfragmente..... 62

Abbildung 16: Antivirale Aktivität von Cy5-HD5 (1-9) ..... 62

Abbildung 17: Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) nach Präinkubation mit HCMV ..... 64

Abbildung 18: Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) im *Time of Addition*-Assay .... 65

Abbildung 19: Analyse des Wirkmechanismus von HD5 (1-9) mit einem dual fluoreszierenden Virus..... 66

Abbildung 20: Wiederholungsexperiment zur Analyse des Wirkmechanismus von HD5 (1-9) mit dem dual fluoreszierenden Virus..... 68

Abbildung 21: Toxizitätstestung von HD5 (1-9) in Zebrafischen..... 70

Abbildung 22: Überblick HD5 mit jeweiligen Bruchstücken ..... 76

Abbildung 23: Loop HD5 (1-13)..... 77

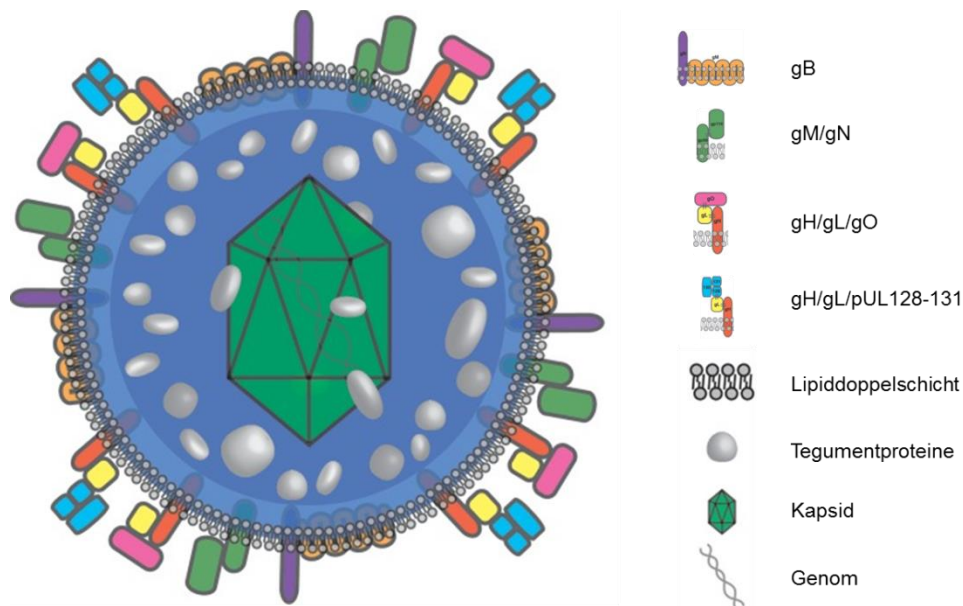
## 1 Einleitung

### 1.1 Das humane Zytomegalievirus

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört zu den  $\beta$ -Herpesviridae und ist auch bekannt als Humanes Herpesvirus 5. Es ist ubiquitär verbreitet und streng wirtsspezifisch. Der Name bezieht sich auf den zytopathischen Effekt des Virus, der früher zur Diagnostik herangezogen wurde: eine Volumenzunahme des Zytoplasmas und die Bildung von Einschlusskörperchen im Zytoplasma und im Zellkern führen zur Entstehung charakteristischer Riesenzellen.

#### 1.1.1 Aufbau

Wie in Abbildung 1 dargestellt, ist HCMV ein behülltes Virus mit einem linearen doppelsträngigen DNA-Genom, welches von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben ist. Ein Viruspartikel besitzt einen Durchmesser von ca. 200 nm.



**Abbildung 1: Aufbau eines HCMV-Partikels**

HCMV ist ein behülltes Virus mit einem linearen doppelsträngigen DNA-Genom in einem ikosaedrischen Kapsid, das von einer Tegumentschicht umgeben ist. In die Virushülle sind verschiedene Glykoproteine und Glykoproteinkomplexe eingelagert. Abbildung modifiziert nach (Gardner and Tortorella, 2016), Nutzung mit freundlicher Genehmigung der American Society for Microbiology.

Die Virushülle ist eine von der zellulären Membran abgeleitete Lipiddoppelschicht, in die virale Glykoproteine eingelagert sind. Verschiedene Glykoproteinkomplexe ermöglichen den Eintritt des Virus in die Zelle. Der Komplex gM/gN (g steht für Glykoprotein) bindet an Heparansulfat (Compton et al., 1993), während gB fusogene Aktivität besitzt, die von dem Trimerkomplex gH/gL/gO und in Epithel- und Endothelzellen auch von dem Pentamerkomplex gH/gL/pUL128-131A reguliert werden kann (Wille et al., 2013; Li and Kamil, 2015).

Zwischen dem Kapsid und der Hülle befindet sich das Tegument, eine Proteinmatrix, die die Hälfte der viralen Proteine beinhaltet (Varnum et al., 2004). Insgesamt wurden etwa 20 bis 25 HCMV-assoziierte Tegumentproteine identifiziert. Nach ihrer Funktion werden sie eingeteilt in Proteine, welche eine Rolle bei der Bildung neuer Viruspartikel spielen, und Proteine, welche die Wirtszellantwort auf die Infektion modulieren können (Kalejta, 2008; Crough and Khanna, 2009). Das am häufigsten vorkommende Protein ist hierbei pp65, das von der Genregion *UL83* codiert wird (Varnum et al., 2004). Dieses Protein spielt sowohl bei der Diagnostik im Rahmen des pp65-Antigen-Tests als auch für die Immunevasion eine große Rolle, z.B. indem es die Interferonantwort infizierter Zellen moduliert (Abate et al., 2004). Ein weiteres wichtiges Tegumentprotein ist das nukleokapsidassoziierte Protein pp150, das von der Genregion *UL32* codiert wird. Dieses trägt zur Zusammensetzung und zum Ausschleusen der neuen Viruspartikel bei und spielt außerdem eine Rolle bei der Nutzung des dual fluoreszierenden Virus TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP-UL100mCherry für mechanistische Untersuchungen (Sampaio et al., 2013).

Das ikosaedrische Kapsid wird aus 162 Kapsomeren gebildet und hat einen Durchmesser von ca. 125 nm. Die Kapside bestehen aus vier Proteinen, den Genprodukten aus *UL86* (engl. *major capsid protein*), *UL85* (engl. *minor capsid protein*), *UL46* (engl. *minor capsid-binding protein*) und *UL48/49* (engl. *smallest capsid protein*) (Crump, 2018; Nishimura and Mori, 2018).



## Abbildung 2: Genom des HCMV

Die Regionen UL und US sind von sich wiederholenden Sequenzen TRL, TRS, IRL und IRS flankiert. UL: *unique long*, US: *unique short*, TRL: *terminal repeat long*, TRS: *terminal repeat short*, IRL: *internal repeat long*, IRS: *internal repeat short*. Abbildung modifiziert nach (Crough and Khanna, 2009), Nutzung mit freundlicher Genehmigung der American Society for Microbiology.

Innerhalb des Kapsids befindet sich das virale Genom, eine lineare doppelsträngige DNA, die aus etwa 235 000 Basenpaaren besteht und für über 200 offene Leserahmen codiert (Davison et al., 2003; Varnum et al., 2004; Dolan et al., 2004). Das Genom besitzt wie in Abbildung 2 dargestellt die Regionen UL (engl. *unique long*) und US (engl. *unique short*), die von sich wiederholenden Sequenzen flankiert sind. An den terminalen Enden befinden sich TRL (engl. *terminal repeat long*) und TRS (engl. *terminal repeat short*), zwischen UL und US befinden sich IRL (engl. *internal repeat long*) und IRS (engl. *internal repeat short*) (Crough and Khanna, 2009).

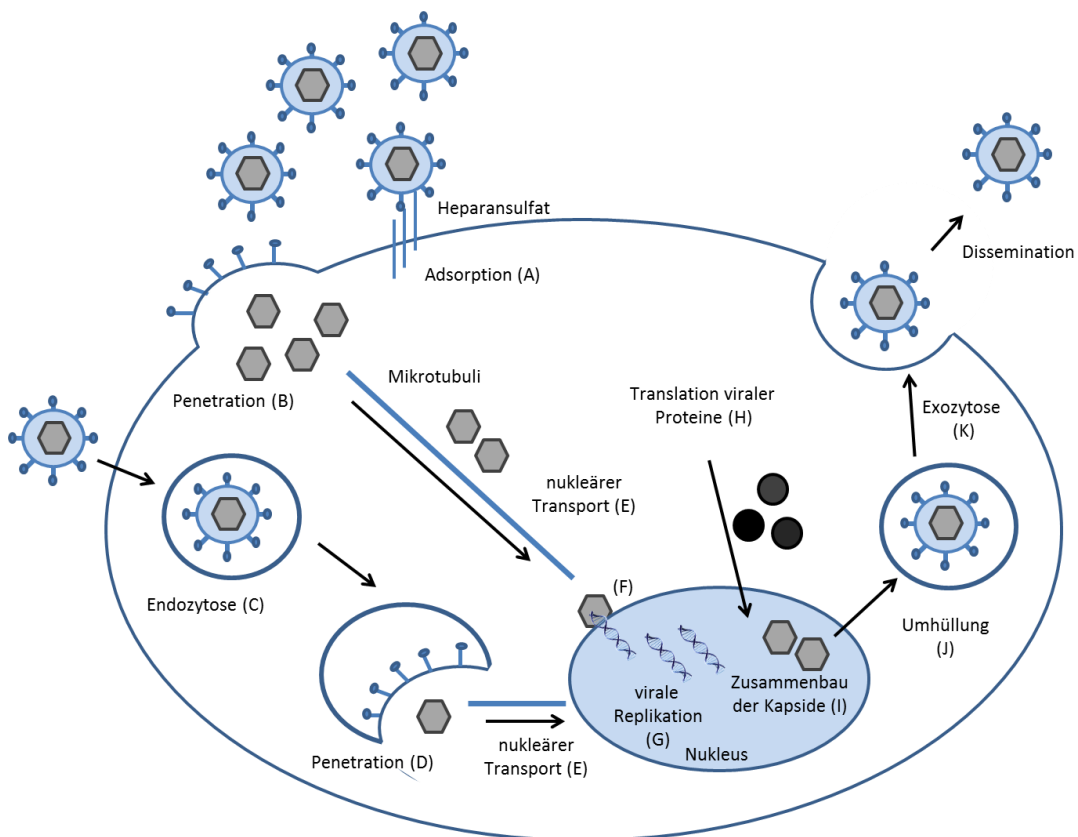
### 1.1.2 Zelltropismus

HCMV ist mitunter durch einen sehr breiten Zelltropismus charakterisiert. Zu den hauptsächlichen Zielzellen gehören Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen (Sinzger et al., 1995). Während die Infektion von Epithelzellen bei der Übertragung der Infektion zwischen zwei Individuen eine Rolle spielt, trägt die Infektion von Endothelzellen zu einer systemischen Verbreitung des Virus bei. Die Infektion von Bindegewebs- und Muskelzellen ermöglicht eine effiziente Vermehrung des Virus innerhalb des Körpers (Sinzger et al., 2008). Monozyten können zwar infiziert werden, aktive Replikation findet jedoch erst in ausdifferenzierten Makrophagen statt. Durch den Transport des Virus auf dem Blutweg kann es somit zur Infektion sämtlicher Organe kommen (Ibanez et al., 1991). *In vivo* kommt es vorwiegend zu einer zellassozierten Übertragung von Virus, durch die der Kontakt mit neutralisierenden Antikörpern umgangen werden kann (Digel et al., 2006; Stegmann et al., 2017). Laboradaptierte Virusstämme setzen *in vitro* jedoch auch

infektiöse Partikel in den Überstand infizierter Zellkulturen frei (Yamane et al., 1983; Sinzger et al., 1999).

### 1.1.3 Viraler Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von HCMV (Abbildung 3) dauert in der Regel 48 h bis 72 h.



**Abbildung 3: Viraler Replikationszyklus**

Die Viruspartikel binden an Heparansulfat und schleusen ihr Kapsid je nach Zelltyp durch Fusion oder Endozytose in die Zelle. Die Kapside werden über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert, wo das Genom in den Zellkern gelangt und die Replikation beginnt. Virale Proteine werden im Zytoplasma translatiert und zurück in den Zellkern geschleust. Im Zellkern neu zusammengebaute Kapside werden am Endoplasmatischen-Retikulum-Golgi-Interkompartiment von einer Hüllmembran umschlossen und über Exozytose freigesetzt. Abbildung modifiziert nach (Miller and Hertel, 2009; Businger, 2018), Nutzung mit freundlicher Genehmigung der American Society for Microbiology und R. Businger.

Zunächst bindet der virale Glykoproteinkomplex gM/gN an Heparansulfat (A) und sorgt damit für eine initiale Bindung zwischen Virus und Zelle (Compton et al., 1993). Durch das Zusammenspiel von gB mit dem Trimerkomplex bzw. in Epithel- und Endothelzellen auch mit dem Pentamerkomplex und die Interaktion dieser Hüllproteine mit zellulären Rezeptoren wird über noch nicht endgültig geklärte Mechanismen diese Bindung verstärkt und es kommt zur Aufnahme der viralen Partikel in die Zielzelle (Li and Kamil, 2015; Wille et al., 2013). HCMV kann über verschiedene zelluläre Rezeptoren in die Zielzellen gelangen, bisher diskutiert werden EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) (Wang et al., 2003), PDGFR $\alpha$  (engl. *platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$* ) (Kabanova et al., 2016), Integrine (Feire et al., 2004) und TLR (engl. *toll-like receptor*) (Nikitina et al., 2018). HCMV wird über unterschiedliche Mechanismen in die Zielzelle aufgenommen. In Fibroblasten kommt es zu einer Fusion der Virushülle und der Zellmembran (B) (Compton et al., 1992), in Epithelzellen und Endothelzellen (Ryckman et al., 2006; Sinzger, 2008; Bodaghi et al., 1999) sowie in Makrophagen (Nikitina et al., 2018) werden die viralen Partikel über Endozytose (C) und einer darauffolgenden Fusion der Virushülle mit der Membran des Endosoms (D) aufgenommen. Nach Eintritt der Kapside in die Zielzelle werden diese über das zelluläre Zytoskelett zum Zellkern transportiert (E) (Ogawa-Goto et al., 2003; Dohner and Sodeik, 2005). Die virale DNA gelangt durch Kernporen in den Zellkern (F). Daraufhin beginnt die Proteinsynthese in drei aufeinanderfolgenden, sich jedoch überlappenden Phasen. Bis zu zwei Stunden nach Infektion werden IE (engl. *immediate-early*) Proteine, bis zu 24 h nach Infektion DE (engl. *delayed-early*) Proteine und ab 24 h nach Infektion L (engl. *late*) Proteine synthetisiert (Honest and Roizman, 1974; Crough and Khanna, 2009). Während die früh produzierten Peptide für die Replikation der viralen DNA (G) notwendig sind, handelt es sich bei den später produzierten um strukturelle Peptide, die für den Aufbau und das Ausschleusen neuer Viruspartikel benötigt werden (Stinski, 1978; Kalejta, 2008; Jean Beltran and Cristea, 2014). Die viralen Proteine werden im Zytoplasma translatiert (H) und zurück in den Zellkern geschleust. Dort werden neue Kapside mit viraler DNA zusammgebaut (I) und wiederum ins Zytoplasma ausgeschleust (Radsak et al., 1991). Die Virushülle mit



ihren Glykoproteinen leitet sich aus dem endoplasmatischen Retikulum ab. Die Glykoproteine werden am Golgi-Apparat glykosyliert und die Hülle wird in Vesikeln zum Endoplasmatischen-Retikulum-Golgi-Interkompartiment transportiert. Dort werden die Kapside von der Hüllmembran umschlossen (J) und die Viruspartikel werden über Exozytose (K) aus der Zelle freigesetzt (Crough and Khanna, 2009; Schauflinger et al., 2013; Jean Beltran and Cristea, 2014). Neben den reifen Viruspartikeln werden auch NIEPs (engl. *noninfectious enveloped particles*) und sogenannte *dense bodies* freigesetzt. NIEPs besitzen im Gegensatz zu infektiösen Partikeln keine virale DNA, während *dense bodies* umhüllte Partikel sind, die vorwiegend aus dem Tegumentprotein pp65 bestehen und weder Kapsid noch DNA besitzen (Varnum et al., 2004).

Wie alle Herpesviren geht HCMV unabhängig vom klinischen Verlauf in einen Zustand der Latenz über, der lebenslang erhalten bleibt. Das virale Genom liegt dabei als stark chromatinisiertes zirkuläres Episom vor. Die Genexpression ist stark eingeschränkt, kann aber bei fehlender Immunkompetenz jederzeit reaktivieren (Goodrum et al., 2012). Das wahrscheinlichste Reservoir für die virale Latenz sind CD33- und CD34-positive hämatopoetische Vorläuferzellen (Mendelson et al., 1996; Zhuravskaya et al., 1997; Hahn et al., 1998; Sinclair, 2010). Andere Zellen aus der myeloischen Zellreihe wie neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen werden als Orte der Latenz diskutiert (Shane Smith et al., 2013).

### 1.1.4 Übertragung

HCMV gelangt entweder parenteral oder über Schleimhautkontakte in den Organismus. Das Virus kann über Speichel oder sexuell über Zervikalsekret und Samenflüssigkeit übertragen werden. Bei Schwangerschaft und Geburt kann es zu kongenitalen Infektionen durch transplazentare oder intrauterine Übertragung kommen oder zu peri- und postnatalen Infektionen durch den Kontakt mit zervikalen und vaginalen Sekreten sowie mit Muttermilch. Im Rahmen von Transplantationen ist eine Übertragung sowohl über zellhaltige Blutprodukte als auch über solide Organe oder andere Gewebe möglich (Boppana and Fowler, 2007; Schottstedt et al., 2017). Die Seroprävalenz von HCMV liegt zwischen 45

und 100 %, abhängig von Region und sozioökonomischem Status (Cannon et al., 2010). Die Inkubationszeit bei einer HCMV-Infektion beträgt vier bis sechs Wochen, die Ansteckung durch einen seropositiven Träger ist durch die Latenz des Virus lebenslang intermittierend möglich (Boppana and Fowler, 2007; Schottstedt et al., 2017).

### **1.1.5 Pathologie**

Bei immunkompetenten Erwachsenen und Kindern verläuft die Infektion meist asymptomatisch oder geht mit unspezifischen grippalen Symptomen einher. Für ungeborene Kinder, transplantierte und anderweitig immunsupprimierte Menschen stellt das Virus jedoch nach wie vor eine große Bedrohung dar (Griffiths et al., 2015). Kongenitale HCMV-Infektionen kommen bei ca. 6 von 1000 Geburten vor, womit HCMV weltweit die häufigste Ursache für kongenitale Infektionen ist. Die Infektion ist der häufigste nicht-genetische Grund für kindlichen Hörverlust und kann darüber hinaus zu schwerwiegenden neurologischen Entwicklungsstörungen führen (Manicklal et al., 2013; Fowler and Boppana, 2018). Entgegen der Annahme, dass die maternalen Antikörper kongenital infizierte Kinder von seropositiven Müttern vor einer symptomatischen Infektion schützen, gehen neuere Untersuchungen davon aus, dass es für die Rate an symptomatisch infizierten Kindern bei Geburt keine Rolle spielt, ob es sich um eine Primärinfektion oder um eine Reaktivierung der Infektion handelt (Ross et al., 2006; Fowler and Boppana, 2018). Eine HCMV-Infektion kann bei einem symptomatischen Verlauf beinahe alle Organsysteme betreffen. Typische Manifestationen bei Immunsupprimierten sind atypische interstitielle Pneumonien, Ösophagitiden, Colitiden und Retinitiden (Griffiths et al., 2015; Britt, 2007).

### **1.1.6 Diagnostik**

Zur Diagnostik einer HCMV-Infektion stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Entweder werden dabei das Virus bzw. die Virusbestandteile direkt nachgewiesen oder es werden spezifische HCMV-Antikörper detektiert. Durch

die Polymerase-Kettenreaktion kann direkt virale Nukleinsäure nachgewiesen werden, ein Antigentest detektiert dagegen das virale Protein pp65. Das Virus kann weiterhin über zytopathische Effekte in der Zellkultur identifiziert werden. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten imponieren die sogenannten Eulenaugenzellen, großkernige Riesenzellen mit intranukleären Einschlusskörperchen. Zum Nachweis der Serokonversion können ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*), Immunblots und Immunfluoreszenztests durchgeführt werden. IgM-Antikörper gegen HCMV gelten als Hinweis auf eine Primärinfektion, während IgG-Antikörper bei fehlenden IgM-Antikörpern auf eine bereits durchgemachte Infektion hinweisen. Weiterhin wegweisend für die Unterscheidung zwischen Primär- und Sekundärinfektion ist die Bestimmung der Avidität der IgG-Antikörper, wobei eine niedrige Avidität auf eine Primärinfektion hindeutet. IgG-Antikörper bei Geburt geben Hinweis auf mütterliche Leihimmunität (Schottstedt et al., 2017; Mertens et al., 2004). Auch der Nachweis von spezifischen T-Zell-Antworten gegen HCMV ist möglich (Ritter et al., 2013; Schottstedt et al., 2017). Das fehlende Ansprechen auf antivirale Medikamente kann eine genotypische Resistenzbestimmung mittels Sequenzierung erforderlich machen (Fischer et al., 2016).

### 1.1.7 Therapie

Bei immunkompetenten Personen mit einer asymptomatischen Infektion ist keine Therapie erforderlich. Die Behandlung erfolgt wenn nötig primär mit Ganciclovir, einem Nukleosidanalogen, das nach Phosphorylierung durch virale Kinasen als DNA-Polymeraseinhibitor wirkt. Der L-Valinylester Valganciclovir kann im Gegensatz zu Ganciclovir auch oral verabreicht werden (Mertens et al., 2004). Virale Mutationen, z.B. im *UL97*-Gen, das für eine Proteinkinase codiert, oder im *UL54*-Gen, das für eine DNA-Polymerase codiert, können zu einer Resistenz gegenüber Ganciclovir führen (Fischer et al., 2016; Göhring et al., 2013). Als Alternativen stehen das Pyrophosphatanalogen Foscarnet und das Nukleotidanalogen Cidofovir zur Verfügung, die ebenso als DNA-Polymerasehemmer die Virusreplikation verhindern. All diese Medikamente gehen jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen wie Myelo- und Nephrotoxizität

einher (Mertens et al., 2004). Für seropositive Empfänger einer Stammzelltransplantation besteht in den USA die Möglichkeit der prophylaktischen Behandlung mit dem Terminase-Komplex-Inhibitor Letemovir (Marty et al., 2017). Für HCMV-infizierte Schwangere gibt es derzeit keine evidenzbasierte Therapiemöglichkeit (Khalil et al., 2018; Bonalumi et al., 2011; Milde-Busch, 2014). Die Gabe von Hyperimmunglobulinen zur Verhinderung der Transmission bei infizierten Schwangeren wird derzeit in Studien geprüft (Hamprecht and Jahn, 2007; Kagan et al., 2019).

### **1.2 Defensine**

Defensine sind antimikrobielle Peptide, die von allen eukaryotischen Lebewesen produziert werden. Ihre Wirksamkeit umfasst alle Arten von Mikroorganismen, wobei die antibakterielle Wirkung bisher am besten erforscht ist (White et al., 1995; Shafee et al., 2017).

#### **1.2.1 Aufbau und Klassifikation**

Defensine bestehen aus 16-50 Aminosäuren und sind damit weniger als 10 kDa groß. Sie sind amphipatisch und reich an Arginin, wodurch ihre Gesamtladung positiv ist. In der Sekundärstruktur liegen Defensine zu großen Teilen als  $\beta$ -Faltblatt vor. Diese wird stabilisiert durch mehrere Cysteine, die innerhalb des Peptids drei Disulfidbrücken ausbilden (Jarczak et al., 2013; Shafee et al., 2017; Park et al., 2018). Je nach Peptidlänge, Anordnung der Disulfidbrücken, Vorläuferpeptid und Vorkommen werden Defensine in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\theta$ -Defensine unterteilt (White et al., 1995; Jarczak et al., 2013). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass es zwei Gruppen von Defensinen unterschiedlichen evolutionären Ursprungs gibt. In Anlehnung an die Ausrichtung der Disulfidbrücken wurden hierfür die Begriffe cis- und trans-Defensine vorgeschlagen (Shafee et al., 2016).

#### **1.2.2 Vorkommen von $\alpha$ -Defensinen**

$\alpha$ -Defensine werden unterteilt in myeloide und enterische  $\alpha$ -Defensine. Zu den myeloiden  $\alpha$ -Defensinen gehören die humanen neutrophilen Peptide (HNP) 1-4.

Neben ihrem Vorkommen in neutrophilen Granulozyten wurden diese auch in B-Zellen, T-Zellen, natürlichen Killerzellen sowie in Monozyten und Makrophagen nachgewiesen, jedoch ist nicht ausgeschlossen, dass es sich dabei um die Aufnahme von Defensinen aus anderen Zellen handelt (Tan et al., 2006; Lehrer and Lu, 2012; Holly et al., 2017). Humane neutrophile Peptide sind als inaktive Präpropeptide Bestandteil der primären Granula. Durch proteolytische Abspaltung des Signalpeptids und der schrittweisen Entfernung weiterer Aminosäuren werden sie noch in den Granula zu fertigen Peptiden prozessiert (Liu and Ganz, 1995). Die Fusion der primären Granula mit Phagosomen ermöglicht den direkten Kontakt der Defensine mit den phagozytierten Mikroben. Zu einem kleinen Teil können diese Defensine nach Degranulation der neutrophilen Granulozyten auch extrazellulär nachgewiesen werden (Ganz, 1987). Myeloide  $\alpha$ -Defensine können auch Teil sogenannter NET (engl. *neutrophil extracellular trap*) sein, dabei handelt es sich um netzartige Strukturen aus DNA und Proteinen, die der Abwehr von Mikroorganismen dienen (Brinkmann et al., 2004; Brinkmann and Zychlinsky, 2007; Papayannopoulos, 2018). Zu den enterischen  $\alpha$ -Defensinen gehören das humane Defensin (HD) 5 und 6. Diese befinden sich vor allem in Paneth-Zellen, merokrinen Drüsenzellen am Grund der Lieberkühn-Krypten des Dünndarms. HD5 konnte auch in vaginalen Epithelzellen nachgewiesen werden (Quayle et al., 1998; Klotman and Chang, 2006). Vergleichbar zu den myeloiden  $\alpha$ -Defensinen werden sie als inaktive Präpropeptide produziert, enterische  $\alpha$ -Defensine werden jedoch erst extrazellulär prozessiert. Nach der Entfernung des Signalpeptids werden sie gemeinsam mit einer inaktiven Vorstufe von Trypsin in den apikalen Granula der Paneth-Zellen gespeichert. Bei Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen werden die Granula in das Dünndarmlumen freigesetzt. Für HD5 konnte gezeigt werden, dass die Sekretion der Granula zu einer Aktivierung von Trypsin führt, das wiederum die Propeptide durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form überführen kann (Ghosh et al., 2002; Holly et al., 2017). Für HD6 konnte gezeigt werden, dass es durch die Bildung von Nanonetzen zu einer Inaktivierung von Mikroben beitragen kann (Chu et al., 2012).  $\alpha$ -Defensine werden in der Regel kontinuierlich synthetisiert und die Regulation erfolgt auf der Ebene der

Freisetzung. Die Bildung kann jedoch auch induziert werden, z.B. durch die Interaktion mit Mikroben bei Infektionen oder die Freisetzung von Zytokinen (Quayle et al., 1998; Ganz, 2003; Klotman and Chang, 2006; Holly et al., 2017).

### **1.2.3 Wirkung von $\alpha$ -Defensinen**

Wichtige Korrelate der antimikrobiellen Aktivität von Defensinen scheinen die Amphipathie, die positive Ladung und die Disulfidbrücken zu sein. Unterschiedliche Defensine haben dabei jedoch differenzielle Aktivität gegenüber verschiedenen Zielstrukturen (Ganz, 2003; Park et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass Defensine durch ihren amphipathischen Aufbau Membranen penetrieren und durch die Bildung von Poren zur Lyse der Zelle führen können. Weiterhin kommt es durch die positive Ladung der Defensine zu einer Interaktion mit der DNA oder RNA der Zielzellen (Wimley et al., 1994; Brogden, 2005; Yang et al., 2002; Wilson et al., 2013). Für HNP1-3 und HD5 ist bekannt, dass sie als Lektine wirken und somit glykosilierte Proteine binden können (Lehrer et al., 2009; Wilson et al., 2013). Diese recht unspezifischen Reaktionen führen zu einem breiten antimikrobiellen Wirkspektrum. Insgesamt lag der Forschungsschwerpunkt bisher auf der antibakteriellen Wirkung von Defensinen, jedoch gab es in den letzten Jahren vermehrt Forschung zu deren antiviraler Aktivität (Gwyer Findlay et al., 2013; Park et al., 2018). Diese kann sowohl direkt als auch indirekt über eine Regulation der Immunantwort sein.

#### **1.2.3.1 Direkte antivirale Aktivität**

Die direkte antivirale Aktivität wurde von Wilson et al. zusammengefasst und unterteilt in die Interaktion der Defensine mit dem Virus und die Interaktion der Defensine mit der Zielzelle. Erstere umfasst die Bindung von Defensin und Virus (Lehrer et al., 2009), eine Schädigung der Virushülle (Fujii et al., 1993), das Bewirken extrazellulärer Aggregation (Dugan et al., 2008), das Blockieren von Rezeptorbindungsstellen und die Hemmung viraler Partikel nach Eintritt in die Zielzelle z.B. durch die Bindung an virale DNA (Hazrati et al., 2006). Die Interaktion von Defensinen mit den Zielzellen beinhaltet die Verhinderung der Fusion durch eine Vernetzung von zellulären Oberflächenmolekülen

(Demirkhanyan et al., 2012), die Modulation von Oberflächenrezeptoren (Seidel et al., 2010) und eine Veränderung intrazellulärer Signalwege (Charp et al., 1988; Wilson et al., 2013). Alle genannten Mechanismen konnten bereits für  $\alpha$ -Defensine nachgewiesen werden. Die spezifische antivirale Aktivität von  $\alpha$ -Defensinen wurde von Gwyer Findlay et al. zusammengefasst (Gwyer Findlay et al., 2013). Für das Herpes-simplex-Virus (HSV) 2 konnte gezeigt werden, dass alle  $\alpha$ -Defensine entweder an das virale Hüllprotein Glykoprotein B oder an Heparansulfat binden können, und somit der Eintritt des Virus in die Zelle verhindert wird (Daher et al., 1986; Hazrati et al., 2006; Lehrer et al., 2009). Bei einer Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) kann HNP1 den Oberflächenrezeptor CD4 und das Env Glykoprotein binden. Die Rezeptoren CD4 und CXCR4 werden somit herunterreguliert und die Interaktion von Env mit den Co-Rezeptoren wird unterbunden. HNP1-3 binden ebenso an CD4 und an das Glykoprotein gp120. Außerdem hemmen sie die virale Replikation durch eine Inhibition der Proteinkinase C (Nakashima et al., 1993; Furci et al., 2007; Demirkhanyan et al., 2012). Das Influenza A-Virus kann ebenso durch myeloide  $\alpha$ -Defensine gehemmt werden. Während HNP1 die Proteinkinase C und damit den endosomalen Transport inhibiert, können HNP1 und HNP2 die Aggregation viraler Partikel sowie die verstärkte Aufnahme des Virus durch neutrophile Granulozyten induzieren (Daher et al., 1986; Tecle et al., 2007; Salvatore et al., 2007; Doss et al., 2009). Auch das humane Polyomavirus 1 kann inhibiert werden, indem HD5 zu einer Aggregation der Viruspartikel führt (Dugan et al., 2008). Für das humane Papillomavirus konnte gezeigt werden, dass HNP1-3 und HD5 den Austritt des Virus aus den endozytotischen Vesikeln und damit die Penetration der Kapside verhindern können (Buck et al., 2006). HNP1 und HD5 können an das Kapsid des Adenovirus binden und durch die Stabilisierung des Kapsids verhindern, dass die virale DNA in die Zielzelle gelangt (Smith and Nemerow, 2008; Bastian and Schafer, 2001; Gounder et al., 2012; Nguyen et al., 2010). Diese Zusammenfassung zeigt, dass  $\alpha$ -Defensine sowohl gegen behüllte als auch gegen unbehüllte Viren direkt antiviral aktiv sind (Gwyer Findlay et al., 2013).

### **1.2.3.2 Indirekte antivirale Aktivität**

Die indirekte antivirale Aktivität beruht auf einer Modulation der Immunantwort, die von Holly et al. zusammengefasst wurde (Holly et al., 2017). Verschiedene Defensine zeigen dabei zum Teil unterschiedliche Aktivität. Infektionen können direkt oder indirekt zu einer verstärkten Defensinproduktion führen (Proud et al., 2004; Chong et al., 2008). Diese Defensine wirken zum einen direkt antiviral und rekrutieren zum anderen neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen (Soruri et al., 2007; Rohrl et al., 2010). Die Phagozyten können Viruspartikel aufnehmen, die von Defensinen opsoniert wurden (Yang et al., 2002), die phagozytierten Partikel unter anderem durch intrazelluläre Defensine inaktivieren und weitere Defensine freisetzen. Außerdem können Defensine zur Degranulation von Mastzellen beitragen (Befus et al., 1999). Auch die adaptive Immunantwort kann reguliert werden, indem T-Zellen und dendritische Zellen rekrutiert werden (Chertov et al., 1996; Grigat et al., 2007) und antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden (Funderburg et al., 2007). Des Weiteren können Defensine über noch unbekannte Mechanismen die Bildung neutralisierender Antikörper verstärken und deren Wirkstärke erhöhen (Gounder et al., 2016).

### **1.2.4 Proteolytische Spaltung von $\alpha$ -Defensinen**

Unter der Annahme, dass enterische  $\alpha$ -Defensine im Dünndarmlumen reduziert vorliegen und im Kontakt mit Duodenalsekret weiter aufgespalten werden, wurden im Rahmen der Dissertationsarbeit von Dirk Ehmman der AG Mukosale Verteidigung die Wirkung von Proteasen auf HD5 und HD6 untersucht. Die Defensine wurden durch Tris(2-carboxyethyl)phosphin in ihren reduzierten Zustand versetzt und mit Duodenalsekret inkubiert. Die resultierenden Fragmente wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert und neu synthetisiert. Während für HD5 Fragmente ermittelt werden konnten, die das gesamte Defensin abdecken, lies sich für HD6 kein proteolytischer Abbau beobachten. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Ausbildung von Nanonetzen HD6 vor Proteolyse schützt (Ehmman et al., 2019). Zur Bestätigung dieses Prinzips wurde ebenso mit HNP4 verfahren, für das sich wie für HD5



verschiedene Fragmente identifizieren ließen. Da es sich bei der Aminosäure an Position 11 von HNP4 jedoch um Arginin handelt, und Arginin als positiv geladene Aminosäure zu einem verstärkten antimikrobiellen Effekt beitragen könnte, wurde statt mit dem ermittelten Fragment HNP4 (1-10) mit HNP4 (1-11) weitergearbeitet. Von den myeloiden  $\alpha$ -Defensinen wurde HNP4 ausgewählt, da es über die stärkste antimikrobielle Aktivität und die meisten positiv geladenen Aminosäuren verfügt. Da in neutrophilen Granulozyten andere Proteasen vorhanden sind und die fertig prozessierten Peptide in den Granula mit diesen gespeichert werden, geht man jedoch nicht von einer Existenz der ermittelten HNP4-Fragmente *in vivo* aus. Um die Wirksamkeit der Fragmente zu steigern und sie vor weiterer Proteolyse zu schützen, wurden HNP4 (1-11) und HD5 (1-9) weiter modifiziert. Zunächst wurden die L-Aminosäuren durch D-Aminosäuren ersetzt, um den Abbau durch körpereigene Enzyme weniger wahrscheinlich zu machen. Zur weiteren Stabilisierung wurde an das N-terminale Ende eine Acetatgruppe und an das C-terminale Ende eine Amidgruppe angebracht. Dirk Ehmann konnte in seiner Dissertationsarbeit zeigen, dass einige Defensinfragmente immer noch hohe antibakterielle Aktivität besitzen, die durch entsprechende Modifikation noch gesteigert werden kann (Ehmann, 2018).

### 1.3 Fragestellung

In Zusammenarbeit mit der AG Molekulare Virologie wurden unterschiedliche Defensine gegen das Hepatitis C Virus, gegen HIV-1 und gegen HCMV getestet. Die Peptide zeigten dabei differentielle antivirale Aktivität. Aufgrund der klinischen Relevanz von HCMV und der Verfügbarkeit von antiviralen Therapien gegen HCV und HIV-1 wurde sich im Folgenden auf HCMV konzentriert. Bisher wurde eine antivirale Aktivität gegen HCMV lediglich für HNP1 ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  nachgewiesen (Daher et al., 1986). In einer Vorarbeit von Ramona Businger konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit HCMV auf Fibroblasten bei einer Konzentration von 75  $\mu\text{M}$  von manchen Peptiden vollständig inhibiert werden kann. Die Fragmente zeigten dabei zum Teil stärkere antivirale Aktivität als die korrespondierenden Vollängenpeptide.

Ziel des Projektes war es, Defensinfragmente als Leitstrukturen für eine neuartige antivirale Therapie gegen HCMV zu etablieren. Zunächst sollten Peptide mit antiviraler Aktivität gegen HCMV und einer geringen Toxizität identifiziert werden. Dafür sollte ein Set von Defensinen auf verschiedenen Zellarten auf seine antivirale Aktivität und über verschiedene Ansätze auf Toxizität getestet werden. Die vielversprechendsten Kandidaten sollten weitergehend auf ihre antivirale Aktivität gegen klinische HCMV-Isolate getestet werden. In mechanistischen Untersuchungen sollten zudem Informationen zum Wirkmechanismus der Peptide erhoben werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen

Name	Eigenschaften	Hersteller
HFF	engl. <i>human foreskin fibroblasts</i> , primäre humane Vorhautfibroblasten von einem männlichen Neugeborenen, adhärenente Zelllinie	ATCC (#SCRC-1041)
ARPE-19	engl. <i>arterial retinal pigmented epithelium cells</i> , arterielle retinale pigmentierte Epithelzellen von einem 19-jährigen Mann, adhärenente Zelllinie	ATCC (#CRL2302)
THP-1	monozytische Zelllinie von einem einjährigen Jungen mit akuter monozytischer Leukämie, Suspensionszellen, die mit PMA zur adhärenenten Modellzelle für humane Makrophagen differenziert werden können	NIH AIDS reagent program (#9942)
Makrophagen	primäre humane Makrophagen, werden durch die Isolierung humaner Blutzellen aus leukozytenangereicherten Forschungsblutproben gewonnen und ausdifferenziert, adhärenente Zellen	Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin (Tübingen)

### 2.1.2 Viren

Name	Eigenschaften	Hersteller / Referenz
TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP	endotheliotroper HCMV-Stamm, der anstelle von UL16 EGFP exprimiert, Expression unterliegt dem UL16-Promotor	(Digel et al., 2006) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Sinzger, Ulm
TB40-BAC <sub>KL7</sub> -UL32EGFP-UL100mCherry	endotheliotroper HCMV-Stamm, pUL32 (pp150) exprimiert einen EGFP-Tag, pUL100 (gM) exprimiert einen mCherry-Tag	(Sampaio et al., 2013) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Sinzger, Ulm
H2497	klinisches HCMV-Isolat aus Fibroblasten, gewonnen aus Fruchtwasser	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Schampera und K. Hamprecht, Tübingen
H1241	klinisches HCMV-Isolat aus Molke, gewonnen aus Muttermilch	(Preisetanz, 2012; Schampera et al., 2017) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Schampera und K. Hamprecht, Tübingen
H815	klinisches HCMV-Isolat aus Leukozyten, resistent gegenüber Ganciclovir und Foscarnet	(Göhring et al., 2013) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Schampera und K. Hamprecht, Tübingen

### 2.1.3 Peptide

Name	Aminosäuresequenz	Hersteller
HNP4	VCSCRLVFCRRETLRVGNCLI GGVSFTYCCTRV	PeptaNova GmbH
HNP4 (1-11)	VCSCRLVFCRR	EMC microcollections
HNP4 (1-11mod)	Ac-vcscrlvfcrr-NH <sub>2</sub>	EMC microcollections
HD5	ATCYCRTGRCATRESLSGVCE ISGRLYRLCCR	PeptaNova GmbH
HD5 (1-9)	ATCYCRTGR	EMC microcollections
HD5 (1-9mod)	Ac-atcycrtGr-NH <sub>2</sub>	EMC microcollections
HD5 (1-13)	ATCYCRTGRCATR	EMC microcollections
HD5 (1-28)	ATCYCRTGRCATRESLSGVCE ISGRLYR	EMC microcollections
HD5 (7-32)	TGRCATRESLSGVCEISGRLY RLCCR	EMC microcollections
HD5 (10-27)	CATRESLSGVCEISGRLY	EMC microcollections
HD5 (10-32)	CATRESLSGVCEISGRLYRLC CR	EMC microcollections
HD5 (26-32)	LYRLCCR	EMC microcollections
HD5 (1-9) [R6A, R9A]	ATCYCATGA	JPT Peptide Technologies GmbH
HD5 (1-9) [C3S, C5S]	ATSYSRTGR	JPT Peptide Technologies GmbH

<b>Name</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>	<b>Hersteller</b>
HD5 (1-9) [C3S, C5R]	ATSYRRTGR	JPT Peptide Technologies GmbH
HD5 (1-13) [C10S]	ATCYCRTGRSATR	JPT Peptide Technologies GmbH
Cy5-HD5 (1-9)	Cy5-ATCYCRTGR	EMC microcollections

Alle Peptide wurden in 0,01 % Essigsäure (HAc) in Wasser (H<sub>2</sub>O) gelöst und wurden bei -20 °C gelagert. Für die Experimente mit Zebrafischen wurde HD5 (1-9) in PBS gelöst. Das Peptid Cy5-HD5 (1-9) wurde bei -80 °C gelagert.

#### 2.1.4 Nährmedien

<b>Zellen</b>	<b>Medium</b>
HFF und ARPE-19	DMEM + 5 % FKS + 2 mM L-Glutamin + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
Makrophagen	RPMI + 4 % humanes AB-Serum + 2 mM L-Glutamin + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin + 1 mM Natriumpyruvat + 1x nichtessenzielle Aminosäuren + 0,4x MEM Vitamine
THP-1	RPMI + 10 % FKS + 2 mM L-Glutamin + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Aceton in Wasser (80 %)	16 ml H <sub>2</sub> O + 4 ml Aceton
DAPI- <i>stock</i> -Lösung	2 mg DAPI + 1 ml PBS
Essigsäure in Wasser (0,01 %)	10 ml H <sub>2</sub> O + 1 µl HAc
Methanol in Wasser (90 %)	36 ml H <sub>2</sub> O + 4 ml Methanol
MTT- <i>stock</i> -Lösung 5 mg/ml in DMEM phenolrotfrei	5 mg MTT + 1 ml phenolrotfreies DMEM
PBS (10x)	2 g KCl (26,8 mM) 80 g NaCl (1,37 M) 29 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (81 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O) 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (14,7 mM) mit 5 M NaOH auf pH 7,4 bringen, dann mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
PFA (4 %)	100 ml PBS + 4 g PFA bei 55 °C über 4 h im Wasserbad auflösen und bei -20 °C lagern
Salzsäure in 2-Propanol (0,04 M)	249 ml Isopropanol + 1 ml 10 M HCl (37 %)



### 2.1.6 Reagenzien

Name	Hersteller
2-Propanol	Honeywell (#33539)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (#D9542)
Accutase	Sigma-Aldrich (#A6964)
Aceton	Applichem (#A1582)
Biocoll	Biochrom (#L6115)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Applichem (#A3906)
DMEM phenolrotfrei	Millipore (#F0475)
<i>Dulbecco's MEM</i> (DMEM)	Biochrom (#F0435)
Essigsäure (HAc)	Roth, Merck (#100063)
Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies (#10500)
Hoechst 33342	Thermo Fisher (#62249)
Humanes AB-Serum	Sigma-Aldrich (#H4522)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich (#P8041)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
L-Glutamin	Biochrom (#K0283)
MEM Vitamine	Biochrom (#K0373)
Methanol	Honeywell (#32213)
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem (#A2942)

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (#106498)
Natriumpyruvat	Life Technologies (#11360039)
Nichtessenzielle Aminosäuren	Life Technologies (#11140035)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth (#0335.2)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom (#A2213)
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (#P1585)
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Biochrom (#L1825)
RPMI	Biochrom (#F1215)
RPMI phenolrotfrei	Biochrom (#F1275)
Salzsäure (HCl)	Merck (#100314)
Triton	Sigma-Aldrich (#T8787)
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Biochrom (#L2153)

### 2.1.7 Antikörper

<b>Name</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti HCMV IE E13	-	Maus	1:1000	Argene (#11-003)
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 514	Alexa Fluor 514	Ziege	1:2000	Life Technologies (#A31555)
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 594	Alexa Fluor 594	Ziege	1:2000	Thermo Fisher (#A11032)

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
<i>μ-Slide 8 well</i>	ibidi (#80826)
96- <i>well</i> -Platte schwarz	Corning, über VWR (#734-1609)
96- <i>well</i> -Platte u- <i>well</i>	Greiner Bio-One (#3003037)
Cellstar <i>Tubes</i> 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One
Cellstar Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> und 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One
Combitips verschiedene Volumina	Eppendorf
Cryo-Röhrchen	Greiner Bio-One (#3002998)
Petrischalen	Greiner (#3000119)
Pipetten Corning verschiedene Volumina	Corning
Pipettenspitzen verschiedene Volumina	Sarstedt
Reagenzreservoirs	VWR (#613-1181)
<i>Safe-Lock Tubes</i> 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Zellschaber Corning	Corning (#3011)

### 2.1.9 Geräte

Name	Hersteller
12-Kanal Pipetten (2-20 µl und 20-200 µl)	Gilson
CO <sub>2</sub> -Inkubator C200	Labotect
Cytation <sup>3</sup>	Biotek
DeltaVision OMX SR	GE Healthcare
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss
Mikroskop Axiovert 200	Zeiss
Mikrowelle Micromat	AEG
Milli-Q	Millipore
Multipipette plus	Eppendorf
pH-Meter inoLab	WTW
Pipetten (verschiedene Volumina)	Gilson
Pipettierhelfer pipetus junior	Hirschmann
Plattformschüttler Titramax 101	Heidolph
Schüttelwasserbad Thermolab 1086	GFL
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus
Wasserbad	Memmert
xCELLigence	OLS
Zählkammer Neubauer - Improved	Neubauer

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf

#### **2.1.10 Software**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
AcquireSR	GE Healthcare
CorelDraw X7	Corel
Endnote X8	Clarivate Analytics
Gen5 2.08	Biotek
GraphPad Prism 6	GraphPad Software
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health
Imaris 9.2	Bitplane
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation
RTCA	ACEA Biosciences
softWoRx	GE Healthcare

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 HFF und ARPE-19

Für die Experimente wurden unter anderem die adhärenenten Zelllinien HFF (humane Vorhautfibroblasten) und ARPE-19 (retinale Pigmentepithelzellen) verwendet. HFF und ARPE-19 wurden in 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator in entsprechendem Nährmedium kultiviert. HFF wurden zwei Mal die Woche mit Trypsin abgelöst und im Verhältnis 2:3 gesplittet. ARPE-19 wurden ebenso zwei Mal die Woche mit Trypsin abgelöst und im Verhältnis 1:3 gesplittet. Beide Zellarten wurden zum Aussäen mit PBS (engl. *phosphate buffered saline*) gewaschen und 4 min im Inkubator mit Trypsin abgelöst. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 µl der bei Bedarf verdünnten Zellsuspension unter ein Deckglas gegeben, das einer Zählkammer aufliegt. Die Zählkammer besitzt vier definierte Quadrate, in denen jeweils die Anzahl der Zellen mikroskopisch bestimmt wird. Die Quadrate haben eine Seitenlänge von jeweils 1 mm und einer Kammertiefe von 0,1 mm. Durch das aufgelegte Deckglas entsteht ein Raum mit einem Volumen von 0,1 µl. Wird die Zellzahl pro Quadrat also mit dem Multiplikationsfaktor 10<sup>4</sup> multipliziert, ergibt sich daraus die Zellzahl pro ml. Die Anzahl der Zellen in der vorliegenden Zellsuspension wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$N_V = N_K \times MF \times VF \times V$$

$N_V$  = Anzahl der Zellen in gegebenem Volumen

$N_K$  = durchschnittliche Zellzahl in einem Quadrat

$MF$  = Multiplikationsfaktor 10<sup>4</sup>

$VF$  = Verdünnungsfaktor

$V$  = Volumen der Zellsuspension in ml

Die Zellen wurden entsprechend der gewünschten Dichte mit Medium verdünnt und ausgesät.

### **2.2.1.2 THP-1**

THP-1 ist eine monozytische Zelllinie aus einem Patienten mit akuter monozytischer Leukämie und dient als Modellzelle für humane Monozyten. Die nicht adhärenen Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator in entsprechendem Nährmedium kultiviert. Sie wurden zwei Mal die Woche im Verhältnis 1:4 gesplittet. Beim Aussäen wurde nach der Bestimmung der Zellzahl und der Herstellung der gewünschten Verdünnung 30 ng/ml PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) in die Zellsuspension zugegeben, um die Zellen zu Makrophagen-artigen Zellen auszdifferenzieren.

### **2.2.1.3 Makrophagen**

Makrophagen wurden aus leukozytenangereicherten Forschungsblutproben („Buffy Coat“) präpariert. Diese wurden in anonymer Form von Spender\*innen erhalten, die ihr Einverständnis für die Nutzung der Blutprodukte für Forschungszwecke gegeben hatten. Es wurden keine Daten zu Alter, Geschlecht oder ethnischer Zugehörigkeit erhoben und alle ethischen Richtlinien wurden eingehalten (IRB-Bestätigungsnummer 507/2017BO1). Zur Gewinnung der Makrophagen wurde das Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS gemischt, über Ficoll geschichtet und 35 min bei 805 x g zentrifugiert. Die die PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) beinhaltende Schicht wurde abgenommen und mit PBS erneut 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Schritt wurde nach Abnahme des Überstandes wiederholt und das Pellet wurde zur Zellzahlbestimmung in 10 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Diese wurde mit einer Zählkammer durchgeführt. Anschließend wurden 15 Mio. PBMC in 10 ml Medium pro Petrischale ausgesät und vier Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Danach wurden die Suspensionszellen durch einmaliges Waschen mit PBS abgenommen und neues Medium wurde zugegeben. Die adhärenen Zellen wurden weitere drei Tage im Inkubator zu Makrophagen ausdifferenziert. Bei den ausdifferenzierten Zellen wurde zwei Mal pro Woche ein Mediumwechsel durchgeführt. Zum Aussäen wurden sie mit PBS gewaschen, eine Stunde im Inkubator mit 3 ml Accutase pro Schale inkubiert und anschließend mit einem



Zellschaber abgelöst. Der weitere Vorgang entsprach dem Aussäen von HFF und ARPE-19.

### **2.2.2 Herstellung und Titration der Virus-stocks**

Zur Herstellung neuer Virus-stocks wurde jeweils eine 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit HFF mit einem frisch aufgetauten Virus-stock (1 ml Virus-stock + 2 ml Medium) infiziert, nach 2 h Inkubationszeit wurde das Volumen mit Medium auf 12 ml bzw. 20 ml aufgefüllt. Am Tag vor der Ernte des neuen stocks wurde optional ein Mediumwechsel durchgeführt, um Zelltrümmer und nicht infektiöse fluoreszierende Partikel zu entfernen. Je nach benötigtem Titer wurde die Ernte an Tag 5, 6 und 7 nach Infektion durchgeführt. Dazu wurde der Überstand abgezogen und in einem Röhrchen 10 min bei 3200 x g zellfrei zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1 ml Aliquots bei -80 °C eingefroren.

Der Titer gibt die Anzahl infektiöser Viruspartikel in einem ml Volumen in IU/ml an. Zur Bestimmung des Titers wurden je 15 000 HFF in 200 µl Medium pro well auf einer 96-well-Platte ausgesät und im Inkubator gelagert. Einen Tag später wurden die Zellen in einer Verdünnungsreihe mit dem entsprechenden stock und einem Volumen von 150 µl infiziert, 2 h darauf wurde ein Wechsel zu 200 µl Medium durchgeführt. Die Zellen inkubierten über Nacht und wurden am darauffolgenden Tag 5 min mit je 200 µl 80 % Aceton in H<sub>2</sub>O fixiert. Darauf folgte eine Antikörperfärbung auf IE-positive Zellen mit Anti HCMV IE E13 als Erstantikörper, von dem pro well 100 µl einer 1:1000 Verdünnung in PBS für 90 min bei 37 °C mit den Zellen inkubiert wurden. Als Zweitantikörper wurde Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 514 verwendet, von dem pro well 100 µl einer 1:2000 Verdünnung in PBS für 60 min bei 37 °C mit den Zellen inkubiert wurden. Abschließend wurde eine Zellkernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) durchgeführt, indem pro well 100 µl einer 1:20 000 Verdünnung der DAPI-stock-Lösung in PBS für 8 min bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen wurde. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellen jeweils drei Mal mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wurde das PBS auf den Zellen belassen und die Platte wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Im Cytation wurden Bilder in den Kanälen „DAPI“ und „GFP“ aufgenommen. Zur Berechnung der Infektionsrate

wurden die grün fluoreszierenden Signale der infizierten Zellen auf die blau fluoreszierenden Zellkerne aller Zellen bezogen. Zur Bestimmung des Titers wurde zunächst die MOI (engl. *multiplicity of infection*) berechnet. Die MOI beschreibt im jeweiligen Versuch die durchschnittliche Menge an infektiösen Viruspartikeln pro Zelle. Die Berechnung der MOI erfolgte nach folgender Formel:

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

Die Berechnung des Titers erfolgte nach folgender Formel:

$$T = \frac{MOI \times N_z}{V} \times 1000 \times VF$$

T = Titer in IU/ml

$N_z$  = Anzahl der Zellen in einem *well*

V = Volumen in einem *well* in  $\mu\text{l}$

VF = Verdünnungsfaktor

Zur Berechnung des Titers wurde mit technischen Triplikaten gearbeitet.

### 2.2.3 Infektions-Assays

Für die Infektions-Assays wurden die Zellen in 96-*well*-Platten ausgesät. HFF und ARPE-19 wurden mit 10 000 Zellen in 200  $\mu\text{l}$  Medium pro *well*, Makrophagen mit 20 000 Zellen in 200  $\mu\text{l}$  Medium pro *well* und THP-1 mit 50 000 Zellen in 200  $\mu\text{l}$  Medium pro *well* ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und am darauffolgenden Tag behandelt. Es wurde ein Mediumwechsel zu Medium ohne P/S (Penicillin/Streptomycin) durchgeführt, da bei den initialen Versuchen von Dirk Ehmman mit Bakterien ebenso P/S-freies Medium verwendet wurde, um eine Beeinträchtigung der verwendeten Mikroorganismen zu verhindern. Danach wurden zuerst die entsprechenden Peptide in verschiedenen Konzentrationen und direkt danach das Virus zugegeben, das Endvolumen betrug jeweils 100  $\mu\text{l}$  pro *well*. Verwendet wurde Virus des Stammes TB40/E-

$\Delta$ UL16-EGFP. Je nach Experiment wurde mit unterschiedlichen MOI gearbeitet, die zum Teil im Vorfeld austitriert wurden. Für HFF und ARPE-19 wurde eine absolute Infektionsrate von 80 % angestrebt. Für myeloide Zellen konnte eine derart hohe Infektionsrate in dem auf 100  $\mu$ l begrenzten Volumen nicht erreicht werden, daher wurde eine absolute Infektionsrate von 40 % angestrebt. Die Berechnung des benötigten Volumens des Virus-stocks erfolgte dabei nach folgender Formel:

$$V = \left(\frac{1}{T}\right) \times N_z \times MOI$$

V = Volumen in ml

T = Titer in IU/ml

$N_z$  = Anzahl der Zellen in einem *well*

Nach weiteren 40 h Inkubationszeit wurden die Zellen mit 150  $\mu$ l 2 % PFA (Paraformaldehyd) in PBS pro *well* fixiert (10 min bei 37 °C, 20 min bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank) und mit 200  $\mu$ l -20 °C kaltem 90 % Methanol in H<sub>2</sub>O 20 min im Kühlschrank permeabilisiert. Dann wurde eine Antikörperfärbung auf IE-positive Zellen durchgeführt, da diese eine sehr genaue Quantifizierung der Infektionsrate ermöglicht. Dazu wurde analog zur Titration der Virus-stocks Anti HCMV IE E13 als Erstantikörper verwendet. Als Zweitantikörper wurde bei diesem Assay Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 594 verwendet. Danach wurde eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. Zur Auswertung wurden Bilder im Cytation in den Kanälen „Hellfeld“, „DAPI“, „GFP“ und „Texas red“ aufgenommen. Die Infektionsrate wurde berechnet, indem die Anzahl der IE-positiven Signale im „Texas red“ Kanal auf die Anzahl der DAPI-positiven Zellkerne bezogen wurde. Zur Bestimmung der relativen Infektionsrate wurde die entsprechende Infektionsrate auf den Mittelwert der Infektionsraten der unbehandelten HCMV-infizierten Zellen bezogen. In den Experimenten wurde mit technischen Duplikaten oder Triplikaten gearbeitet. Sofern nicht anders angegeben, wurden sie je drei Mal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Alle Infektions-Assays wurden größtenteils analog zu diesem Aufbau durchgeführt, Abweichungen davon sind in den folgenden Unterpunkten beschrieben.

### **2.2.3.1 Screening des Peptidsets auf antivirale Aktivität**

Für das anfängliche Screening der Peptide wurden das Volllängenpeptid HNP4 und dessen Derivate HNP4 (1-11) und HNP4 (1-11mod) sowie das Volllängenpeptid HD5 und dessen Derivate HD5 (1-9), HD5 (1-9mod), HD5 (1-13), HD5 (1-28), HD5 (7-32), HD5 (10-27), HD5 (10-32) und HD5 (26-32) auf ihre antivirale Aktivität gegen HCMV auf HFF in den Konzentrationen 7,5  $\mu\text{M}$  und 75  $\mu\text{M}$  getestet. Es wurde mit einer MOI von 0,5 gearbeitet. Für die Auswertung der Screeningexperimente wurde keine Antikörperfärbung auf IE-positive Zellen durchgeführt. Die Bilder im Cytation wurden in den Kanälen „Hellfeld“, „DAPI“ und „GFP“ aufgenommen. Die Infektionsrate wurde berechnet, indem die Anzahl der GFP-positiven Signale der infizierten Zellen auf die Anzahl der DAPI-positiven Zellkerne bezogen wurde. Zur statistischen Analyse wurde mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism ein *one-way-ANOVA* mit vielfachen Vergleichen und Dunnett-Korrektur durchgeführt.

### **2.2.3.2 Bestimmung der IC<sub>50</sub> für ausgewählte Peptide**

Die genauere Untersuchung der antiviralen Aktivität mit der Bestimmung der Peptidkonzentration, bei der 50 % der Infektion gehemmt werden kann (IC<sub>50</sub>), erfolgte für die Peptide HNP4, HNP4 (1-11), HNP4 (1-11mod), HD5, HD5 (1-9), HD5 (1-9mod) und HD5 (7-32). Die getesteten Peptidkonzentrationen entsprachen einer 1:2 Verdünnungsreihe von 100  $\mu\text{M}$  bis 1,56  $\mu\text{M}$ . Es wurde auf HFF und ARPE-19 mit einer MOI von 0,5 gearbeitet, auf Makrophagen mit einer MOI von 70 und auf THP-1 mit einer MOI von 10. Die Experimente wurden in technischen Duplikaten auf HFF, ARPE-19 und myeloiden Zellen je drei Mal durchgeführt. In einigen Fällen ließ sich trotz mehrfacher Titration keine Infektionsrate der Makrophagen erzielen, mit der der Versuch sinnvoll hätte durchgeführt werden können. Deshalb wurde das Experiment stattdessen mit

THP-1 durchgeführt. Dadurch liegen die Ergebnisse für die myeloiden Zellen zum Teil nur einmal vor.

Die Berechnung der IC50 wurde in GraphPad Prism vorgenommen. Hierfür wurde mit den Werten der relativen Infektionsrate eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Die relative Infektionsrate von unbehandelten infizierten Zellen stellte den Ausgangspunkt der Kurve dar. Da die Werte für die Peptidkonzentrationen in GraphPad Prism logarithmisch angegeben werden müssen und der Wert „0“ nicht logarithmisch dargestellt werden kann, wird ersatzweise der Wert „10<sup>-10</sup>“ als Ausgangswert angegeben. Die IC50 wird berechnet als der Wert der Peptidkonzentration, der in der Dosis-Wirkungs-Kurve genau zwischen dem oberen Plateau und dem unteren Plateau liegt. Das obere Plateau repräsentiert dabei die relativen Infektionsraten der infizierten unbehandelten bzw. mit Peptid in geringen Konzentrationen behandelten Zellen, das untere Plateau stellt die relativen Infektionsraten der infizierten und mit Peptid in hohen Konzentrationen behandelten Zellen dar. Wenn diese Plateaus nicht vorhanden sind, wird die Dosis-Wirkungs-Kurve als unvollständig bezeichnet und die Berechnung einer IC50 ist nicht möglich.

### **2.2.3.3 Infektions-Assays mit klinischen Isolaten**

In diesem Experiment wurde die antivirale Aktivität von HD5 (1-9) in Konzentrationen von 1,56 µM bis 100 µM gegen die Infektion mit verschiedenen klinischen HCMV-Isolaten auf HFF untersucht. Neben dem laboradaptierten Stamm TB40/E-ΔUL16-EGFP, der hier als Referenzstamm genutzt wurde, wurde ein Stamm aus Muttermilch (H1241), ein Stamm aus Fruchtwasser-Fibroblasten (H2497) und ein multiresistentes Isolat aus Leukozyten (H815) verwendet. H1241 wurde 10 Wochen nach Geburt aus der Molke der nicht antiviral vorbehandelten Mutter eines Frühgeborenen gewonnen. H2497 wurde im Rahmen eines Schwangerschaftsabbruchs bei einem schweren fetalen Gehirnschaden aus Fruchtwasser gewonnen (Schampera et al., 2017; Preisetanz, 2012). H815 wurde aus den Leukozyten des Empfängers einer Stammzelltransplantation nach der dritten Transplantation gewonnen. Der Virusstamm zeigt Mutationen im *UL97*-Gen und im *UL54*-Gen, wodurch eine

Resistenz gegenüber Ganciclovir und Cidofovir verursacht wird (Göhring et al., 2013). Alle Stämme wurden auf HFF adaptiert. Das Experiment wurde je einmal mit drei verschiedenen MOI durchgeführt, bei denen jeweils technische Duplikate eingesetzt wurden. Bei dem ersten Experiment mit einer MOI von 0,5 war die absolute Infektionsrate zu hoch und die Infektion mit dem Referenzstamm konnte von HD5 (1-9) nicht gehemmt werden, daher wurde die MOI in den folgenden zwei Experimenten auf 0,2 und 0,1 gesenkt.

#### **2.2.3.4 Infektions-Assays mit Derivaten der Peptidfragmente**

Um die wirksamen Domänen der Peptidfragmente zu bestimmen, wurden Derivate mit veränderten Aminosäuren in Auftrag gegeben. Getestet wurde die antivirale Aktivität von HD5 (1-9), HD5 (1-9) [R6A, R9A], HD5 (1-9) [C3S, C5S], HD5 (1-9) [C3S, C5R] und HD5 (1-13) [C10S] in Konzentrationen von 1,56  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  auf HFF. Zur genaueren Vergleichbarkeit der Ergebnisse folgte ein Infektions-Assay von HD5 (1-13) und HD5 (1-13) [C10S] in den Konzentrationen von 75  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  auf HFF. Um genauere Informationen zur Interaktion des Peptids mit der Zelle bzw. den Viruspartikeln zu erhalten, wurde ein Peptid in Auftrag gegeben, das einen *Tag* bestehend aus einem Fluoreszenzfarbstoff enthielt. Das Peptidbruchstück HD5 (1-9) wurde am N-terminalen Ende an den Farbstoff Cyanin-5 gekoppelt. Getestet wurde zunächst analog zu den anderen Derivaten der Peptidfragmente die antivirale Aktivität von Cy5-HD5 (1-9) in Konzentrationen von 1,56  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  auf HFF. Da sich das Peptid als zelltoxisch erwies, wurden keine weiteren Versuche damit unternommen. Alle Experimente wurden jeweils drei Mal mit einer MOI von 0,2 unter der Verwendung technischer Duplikate durchgeführt.

#### **2.2.3.5 Präinkubations-Assays**

In diesem Assay wurde untersucht, inwiefern durch Präinkubation von HD5 (1-9) mit dem Virus die antivirale Aktivität verbessert wird. Dazu wurde das Peptid in Konzentrationen von 1,56  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  für eine Stunde bei 37 °C im Inkubator in einer *u-well*-Platte mit dem Virus vorinkubiert und dann auf HFF gegeben. Als Referenz wurde ein Infektions-Assay mit den gleichen Konzentrationen ohne

Vorinkubation durchgeführt. In einer Kondition wurden Peptid und Virus bei einer Peptidkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  vorinkubiert und auf den Zellen auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{l}$  Volumen verdünnt. Das Experiment wurde drei Mal mit einer MOI von 0,2 durchgeführt, dabei wurden technische Duplikate verwendet.

### **2.2.3.6 Time of Addition-Assays**

In diesem Assay wurde untersucht, inwiefern durch die Variation des Zugabezeitpunktes von HD5 (1-9) auf HFF die antivirale Aktivität des Peptids verändert wird. Dazu wurde das Peptid vor Zugabe des Virus für 3 h bei 37 °C in 60  $\mu\text{l}$  Volumen mit den Zellen im Brutschrank vorinkubiert. Das Peptid wurde so konzentriert, dass nach Zugabe des Virus in einem Volumen von 40  $\mu\text{l}$  Endkonzentrationen von 1,56  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  entstanden. In den weiteren Konditionen wurden Peptid und Virus gleichzeitig auf HFF gegeben oder das Peptid wurde 3 h nach dem Virus auf die Zellen gegeben. Dieses Experiment wurde drei Mal mit einer MOI von 0,2 unter Verwendung technischer Duplikate durchgeführt. Zur statistischen Analyse wurde mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism ein *one-way-ANOVA* mit vielfachen Vergleichen und Dunnett-Korrektur durchgeführt.

### **2.2.3.7 Infektions-Assays mit dem dual fluoreszierenden Virus**

Um den Wirkmechanismus von HD5 (1-9) genauer zu untersuchen, wurde ein Infektions-Assay mit dem dual fluoreszierenden Virus TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP-UL100mCherry auf HFF durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen endotheliotropen HCMV-Stamm, bei dem pp150 (codiert von *UL32*) mit einen EGFP-Tag und gM (codiert von *UL100*) mit einen mCherry-Tag versehen ist (Abbildung 19). Dies erlaubt die Unterscheidung zwischen umhüllten Viruspartikeln, die beide Tags besitzen und dadurch gelb erscheinen, und unbehüllten Kapsiden, die nur noch EGFP exprimieren und dadurch grün erscheinen (Sampaio et al., 2013). In mehreren Vorversuchen wurden die Platten, die technischen Einstellungen, das Volumen und andere Parameter festgelegt. Im letztendlichen Versuch wurde in Unikaten mit *8-well-chamber-*

*slides*, 20 000 HFF und einem Volumen von 200  $\mu$ l phenolrotfreiem Medium pro *well* gearbeitet. Die Zellen wurden eine Stunde mit HD5 (1-9) und HD5 (1-9) [R6A, R9A] in Konzentrationen von 100  $\mu$ M und 10  $\mu$ M und einem Volumen von 100  $\mu$ l bei 37 °C vorinkubiert. Dann wurde das Virus mit einer MOI von 0,5 zugegeben und das Peptidvolumen wurde entsprechend der gewünschten Endkonzentration von 100  $\mu$ M und 10  $\mu$ M in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l angepasst. Im OMX wurden pro *well* drei Punkte festgelegt, die alle 20 min in den Kanälen „Hellfeld“, „GFP“ und „Alexa594“ dokumentiert wurden. Da die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Bildern zu groß waren und sich die Zellen zudem aus dem eingestellten Bildausschnitt bewegten, konnte die Kinetik der Partikel nicht verfolgt werden. Nach 6 h wurden die Zellen fixiert und mit 1  $\mu$ g/ml Hoechst33342 in PBS für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach der Fixierung und der Färbung wurden die Zellen je drei Mal mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Dann wurden erneut Bilder im hoch auflösenden Mikroskop aufgenommen, dieses Mal in den Kanälen „DAPI“, „GFP“ und „Alexa594“. Die Bilder wurden mit der Imaris Software bearbeitet, um die Kontraststärken der jeweiligen Kanäle zu vereinheitlichen. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde dieses Experiment erneut von Ramona Businger durchgeführt. Um die Dichte der Partikel zu erhöhen wurde hierbei mit einer MOI von 2 gearbeitet. In einer Kondition wurden Virus und Peptid gleichzeitig zugegeben und in einer Kondition wurde das Peptid 3 h nach Infektion auf die Zellen gegeben. In jeder Kondition wurde die Gesamtzahl der Partikel sowie die Anzahl der penetrierten Partikel für 15 Zellen bestimmt. Zur statistischen Analyse wurde mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism ein *one-way-ANOVA* mit vielfachen Vergleichen und Dunnett-Korrektur durchgeführt. Der restliche Aufbau des Wiederholungsexperimentes entspricht dem ersten Versuch.

### **2.2.4 Screening des Peptidsets auf Zytotoxizität: MTT-Test**

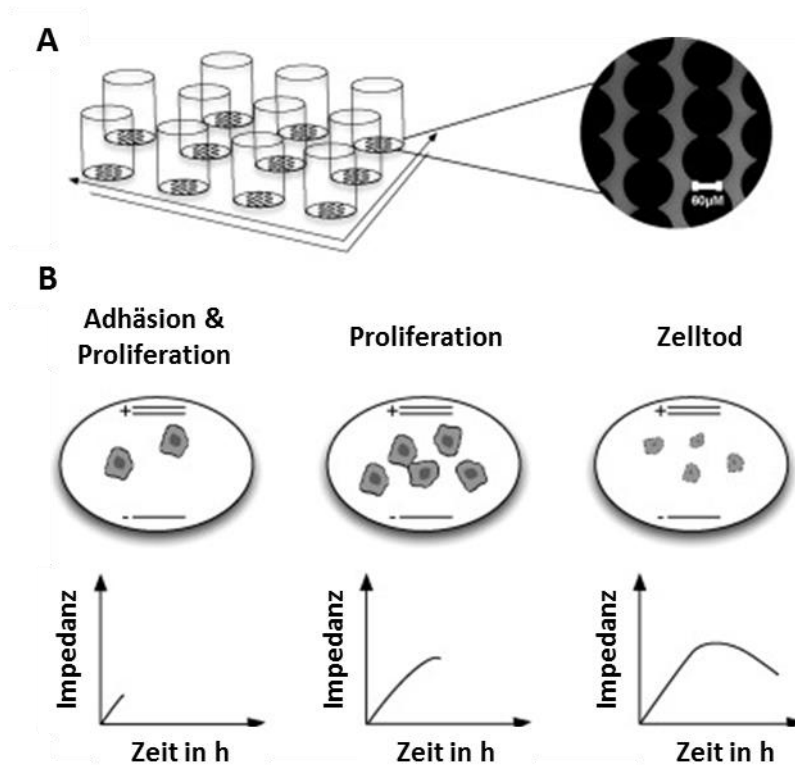
In diesem Test wurde die Zellviabilität von HFF nach Behandlung mit den Peptiden HNP4, HNP4 (1-11), HNP4 (1-11mod), HD5, HD5 (1-9), HD5 (1-9mod), HD5 (1-13), HD5 (1-28), HD5 (7-32), HD5 (10-27), HD5 (10-32) und HD5 (26-32) in verschiedenen Konzentrationen getestet. Der Assay beruht auf der Reduktion



des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) in blau-violettes, wasserunlösliches 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid unter Mitwirkung der pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH (reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) und NADPH (reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) (Berridge and Tan, 1993). Für die Screeningtests wurden je 10 000 HFF in 200 µl Medium pro *well* in 96-*well*-Platten ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und am darauffolgenden Tag behandelt. Es wurde ein Mediumwechsel zu P/S-freiem Medium durchgeführt, um einen vergleichbaren Aufbau der Experimente zu gewährleisten. Danach wurden die Peptide so zugegeben, dass analog zu den Screeningtests auf antivirale Aktivität Peptidkonzentrationen von 7,5 µM und 75 µM entstanden. Das Endvolumen betrug 100 µl pro *well*. Die Platte wurde 40 h inkubiert, danach wurde ein Mediumwechsel zu 90 µl P/S- und phenolrotfreiem Medium durchgeführt. Dann wurden pro *well* 10 µl der MTT *stock*-Lösung zugegeben und vorsichtig resuspendiert. Nach weiteren 3 h Inkubationszeit bei 37 °C wurde das Medium abgezogen und die Kristalle wurden in je 100 µl 0,04 M Salzsäure in Isopropanol pro *well* 10 min auf dem Plattformschüttler aufgelöst. Danach wurde im Cytation die Absorption bei 570 und 650 nm gemessen. Zur Auswertung wurde zunächst der Mittelwert der Absorption, der in leeren *wells* gemessen wurde, von allen gemessenen Absorptionswerten abgezogen. Zur Bestimmung der absoluten Absorption wurden die Absorptionswerte der Referenzwellenlänge 650 nm von den Werten bei 570 nm abgezogen. Die relative Absorption wurde bestimmt, indem der entsprechende Wert auf den Mittelwert der Absorption der mit 0,01 % HAc in H<sub>2</sub>O behandelten HFF bezogen wurde. Das Experiment wurde drei Mal durchgeführt und es wurde mit technischen Triplikaten gearbeitet. Zur statistischen Analyse wurde mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism ein *one-way-ANOVA* mit vielfachen Vergleichen und Dunnett-Korrektur durchgeführt.

### 2.2.5 Bestimmung der CC50 für ausgewählte Peptide: Impedanzmessung

Analog zur Bestimmung der IC50 erfolgte für die Peptide HNP4, HNP4 (1-11), HNP4 (1-11mod), HD5, HD5 (1-9), HD5 (1-9mod) und HD5 (7-32) eine genauere Untersuchung der Toxizität mit der Bestimmung der Peptidkonzentration, bei der 50 % der Zellen einen zytotoxischen Effekt zeigen (CC50). Dafür wurde das xCELLigence genutzt. Das Prinzip basiert wie in Abbildung 4 dargestellt auf einer Messung des elektrischen Widerstands, den adhäsive Zellen auf dem Boden einer mit Mikroelektroden versehenen 96-*well*-Platte verursachen.



**Abbildung 4: Impedanzmessung via xCELLigence**

**A** zeigt den schematischen Aufbau einer 96-*well*-Platte mit einem Mikroelektrodennetzwerk am Boden. **B** zeigt die Veränderung der Impedanz abhängig von den Zellen. Während der Adhäsion und Proliferation verursachen die Zellen durch eine Isolierung der Mikroelektroden einen steigenden Widerstand. Zellschrumpfung im Rahmen von Zelltod führt zu einer verminderten Impedanz. Abbildung modifiziert nach (Diemert et al., 2012), Nutzung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Eine Proliferation der Zellen verursacht durch die partielle Isolierung der Elektroden einen Anstieg des Widerstandes, während Ereignisse, die zu einer veränderten Zellmorphologie oder einer Ablösung der Zellen führen, zu einem verminderten Widerstand führen (Diemert et al., 2012; Ke et al., 2011). Die Experimente wurden mit HFF, ARPE-19 und Makrophagen durchgeführt, die geeigneten Zellzahlen wurden in einem Vorversuch ohne die Behandlung mit Peptiden festgelegt. Am ersten Tag wurden die Zellen ausgesät. Dazu wurden zunächst 50 µl des entsprechenden Mediums in die *wells* der 96-*well*-Platte gegeben. Die Zwischenräume der *wells* wurden mit je 100 µl PBS befüllt, um Austrocknung zu vermeiden. Dann wurde ein Leerwert gemessen und die Zellen wurden in entsprechender Anzahl (10 000 HFF bzw. ARPE-19 oder 20 000 Makrophagen pro *well*) in je 150 µl Medium zugegeben, das Endvolumen betrug 200 µl pro *well*. Die Platte wurde in das xCELLigence eingelegt und es erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über 24 h alle 30 min eine Messung der Impedanz. Dann wurde die Platte herausgenommen und es wurden ein Mediumwechsel und die Behandlung mit den Peptiden durchgeführt. Die Peptidkonzentrationen entsprachen einer 1:2 Verdünnungsreihe von 150 µM bis 2,34 µM. Eine Positivkontrolle für Zelltod erfolgte mit 10 % Triton. Danach wurde unter den gleichen Konditionen wie zuvor über weitere 72 h alle 30 min der Widerstand am Boden der 96-*well*-Platte gemessen. Aus den gemessenen Impedanzwerten wurde von der RTCA-Software nach folgender Formel der sogenannte Zellindex berechnet:

$$ZI(t) = \frac{R(f_n, t) - R(f_n, t_0)}{Z_n}$$

ZI(t) = Zellindex zum Zeitpunkt t

R(f<sub>n</sub>,t) = gemessene Impedanz bei der Frequenz f<sub>n</sub> zum Zeitpunkt t

R(f<sub>n</sub>,t<sub>0</sub>) = gemessene Impedanz bei der Frequenz f<sub>n</sub> zum Zeitpunkt t<sub>0</sub>

(Hintergrundmessung mit Medium ohne Zellen)

Z<sub>n</sub> = korrespondierender Frequenzfaktor zur Frequenz f<sub>n</sub>

Zur Bestimmung des normalisierten Zellindex wurde der Zellindex zum Zeitpunkt  $t$  durch den Wert der Messung nach 24 h geteilt. Die Messung nach 24 h war jeweils die letzte vor der Behandlung mit den Peptiden, so wurde die Vergleichbarkeit der Werte unabhängig von der totalen Zellzahl gewährleistet. Bei den ersten Messungen wurde direkt im Anschluss an die Messung im xCELLigence ein MTT durchgeführt. Die Ergebnisse wiesen jedoch auf fehlerhafte Messungen hin und somit wurden diese Versuche wieder eingestellt. Bei späteren Versuchen wurden die 96-*well*-Platten wie in der Literatur beschrieben aufbereitet und bis zu zwei Mal wiederverwendet (Stefanowicz-Hajduk et al., 2016). Dazu wurde die Platte zunächst drei Mal mit je 200  $\mu$ l PBS pro *well* gewaschen, dann wurde die Platte mit 150  $\mu$ l Trypsin pro *well* 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Trypsin abgezogen und die *wells* wurden erneut drei Mal mit je 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Das letzte PBS wurde auf der Platte belassen und die Platte bis zur Wiederverwendung bei Raumtemperatur gelagert. Vor der nächsten Benutzung wurde der Widerstand am Plattenboden nur mit PBS gemessen. Wenn alle gemessenen Werte für den Zellindex zwischen 0,01 und -0,01 lagen und es keine Probleme mit der Ableitung gab, wurde die Platte wiederverwendet. Die Versuche zeigten, dass eine Wiederverwendung nicht möglich war, wenn sich in den *wells* zuvor Triton befand, wenn darin zuvor Makrophagen ausgesät wurden oder wenn mit der Platte bereits ein MTT durchgeführt wurde. Die Experimente wurden in technischen Duplikaten auf HFF, ARPE-19 und Makrophagen je drei Mal durchgeführt. Da es bei den Versuchen mit den Vollängenpeptiden auf Makrophagen zwei Mal zu einem starken Abfall der Impedanz bei den unbehandelten Kontrollen kam, liegt dieses Experiment nur einmal vor.

Die Berechnung der CC50 wurde analog zur Berechnung der IC50 in GraphPad Prism vorgenommen. Die Dosis-Wirkungs-Kurve wurde hierbei mit den Werten des normalisierten Zellindex erstellt. Den Ausgangspunkt der Kurve mit dem Wert „10<sup>-10</sup>“ bildete auch hierbei der Wert der unbehandelten Zellen. In dieser Berechnung repräsentiert das obere Plateau den normalisierten Zellindex der Zellen, die gar nicht bzw. mit Peptid in geringen Konzentrationen behandelt wurden, das untere Plateau stellt dagegen den normalisierten Zellindex der

Zellen dar, die mit Peptid in hohen Konzentrationen behandelt wurden. Auch hier kann die CC50 bei einer unvollständigen Dosis-Wirkungs-Kurve nicht berechnet werden.

### **2.2.6 Experimente mit Zebrafischen**

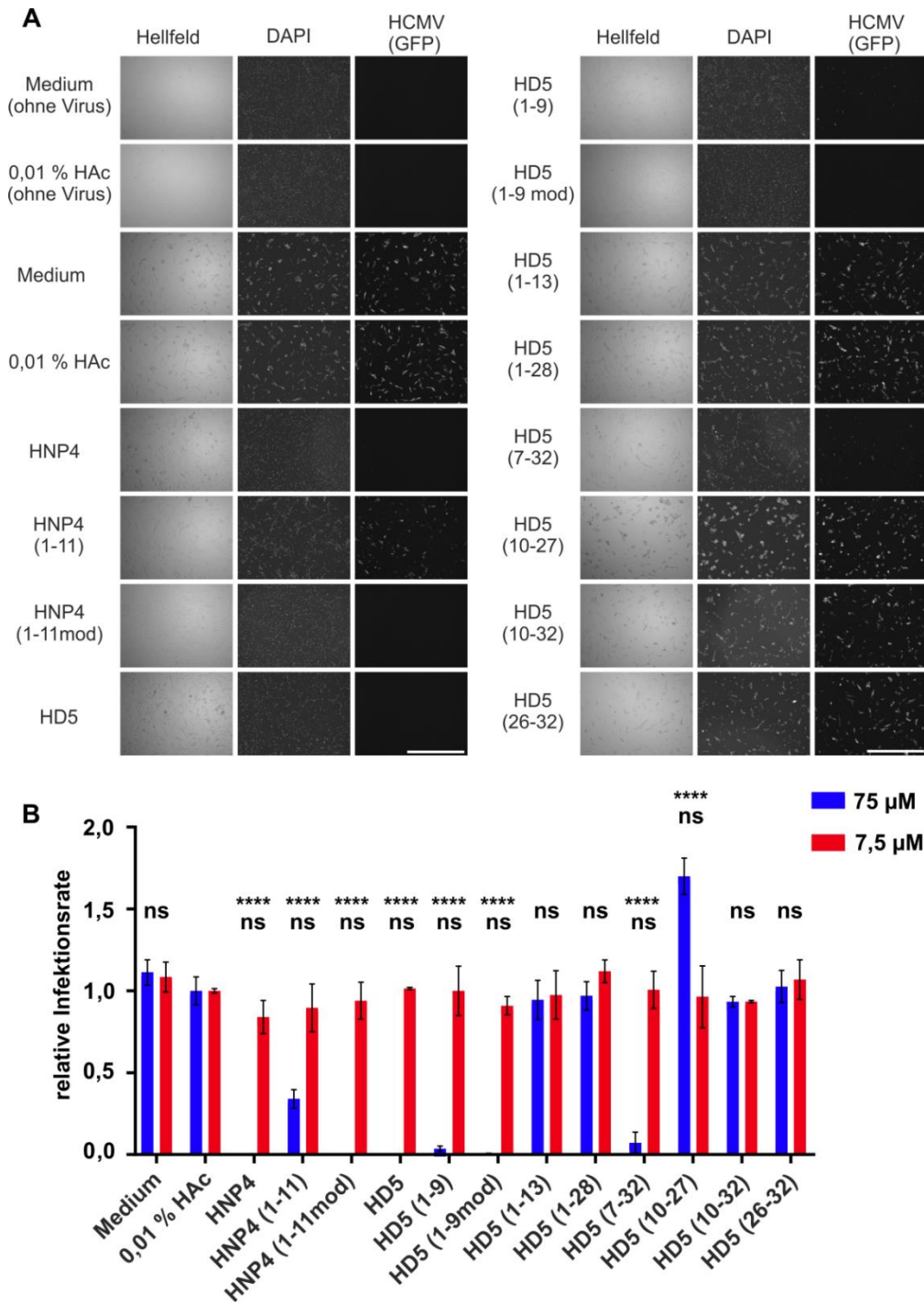
Die Experimente zur Testung des Peptidderivats HD5 (1-9) auf Toxizität bei Zebrafischen wurden von Hannes Preiss aus der AG Müller am Max-Planck-Institut Tübingen durchgeführt. Zebrafische eignen sich besonders gut für die Forschung, da sie eine hohe genetische Ähnlichkeit zu Säugetieren besitzen, sich sehr rasch entwickeln und aufgrund ihrer fast vollständigen Transparenz in den ersten sechs Wochen gut mikroskopisch untersucht werden können (Zhang et al., 2003; He et al., 2014). Zur Untersuchung der Toxizität wurden je fünf Embryos pro *well* in Triplikaten in 200 µl Medium in eine 96-*well*-Platte gegeben. 6-7 h nach der Fertilisation wurde das Peptid in den Konzentrationen 25 µM, 75 µM, 125 µM und 250 µM zugegeben. Als Positivkontrolle wurden Embryos mit 25 µg/ml Cycloheximid behandelt. Da sich in einem Vorversuch zeigte, dass das Lösungsmittel 0,01 % HAc in H<sub>2</sub>O toxische Auswirkungen auf die Embryonen hat, wurde das Peptid für diesen Versuch in PBS gelöst. Nach jeweils 13 h, 24 h und 48 h wurde eine mikroskopische Phänotypenanalyse durchgeführt. Für die Untersuchung nach 24 h und 48 h wurden die Fische mit Tricain-Methansulfonat betäubt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Screening eines Sets von Defensin-abgeleiteten Peptiden auf antivirale Aktivität und Toxizität

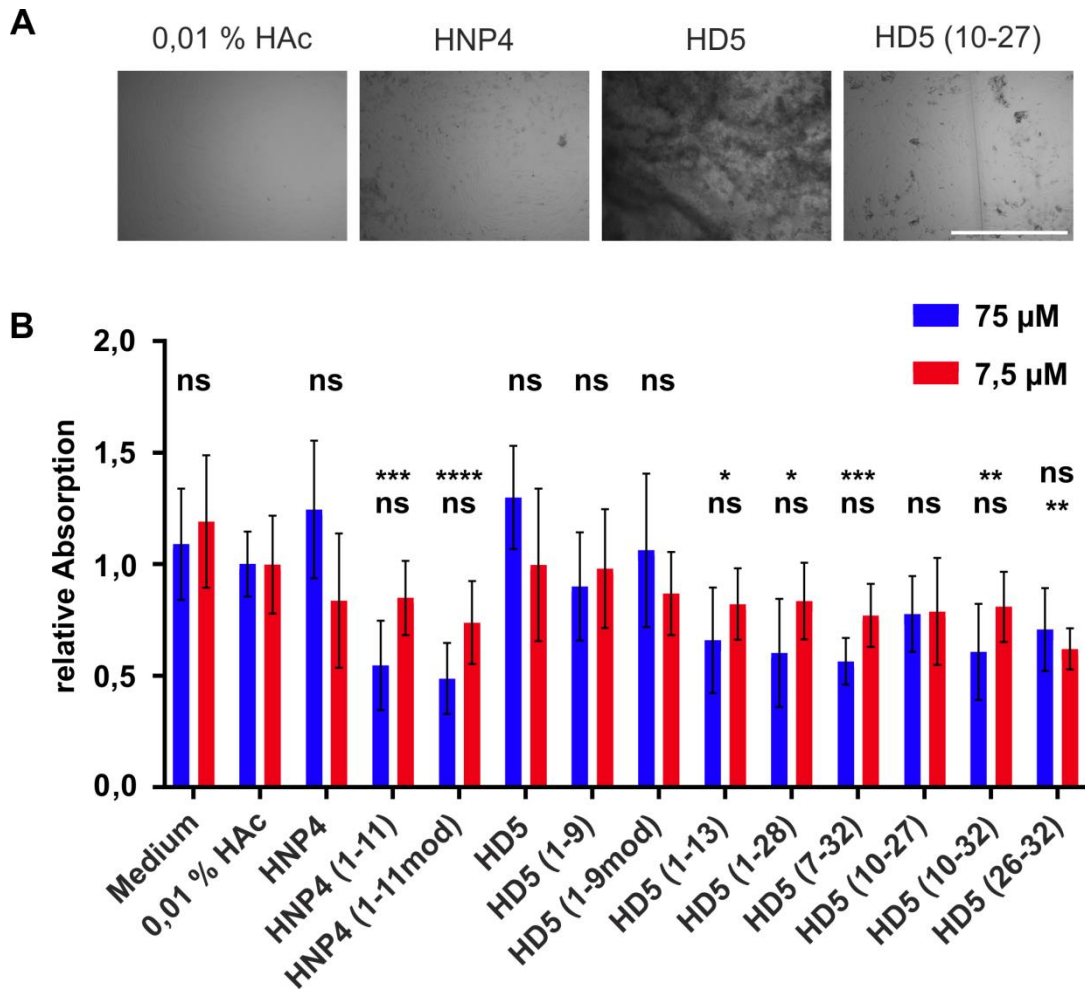
Zunächst sollte untersucht werden, welche Volllängenpeptide und davon abgeleiteten Fragmente in nicht toxischen Konzentrationen antivirale Aktivität gegen die Infektion mit HCMV haben. Miteinbezogen wurden das Volllängenpeptid HNP4 und dessen Derivate HNP4 (1-11) und HNP4 (1-11mod) sowie das Volllängenpeptid HD5 und dessen Derivate HD5 (1-9), HD5 (1-9mod), HD5 (1-13), HD5 (1-28), HD5 (7-32), HD5 (10-27), HD5 (10-32) und HD5 (26-32). Das Peptidset wurde in den Konzentrationen 7,5  $\mu\text{M}$  und 75  $\mu\text{M}$  auf seine antivirale Aktivität gegen HCMV-Infektionen auf HFF getestet. Es wurde hierbei mit einer MOI von 0,5 gearbeitet. Es zeigt sich, dass die Volllängenpeptide HNP4 und HD5 und deren Derivate HNP4 (1-11), HNP4 (1-11mod), HD5 (1-9), HD5 (1-9mod) und HD5 (7-32) in der Konzentration 75  $\mu\text{M}$  eine signifikante Reduktion der HCMV-Infektionsrate auf HFF bewirken (Abbildung 5). Da in einem Experiment die absolute Infektionsrate bei einer MOI von 1 zu hoch war, um einen antiviralen Effekt beurteilen zu können, und in einem Experiment die Menge an Peptiden nicht für die ursprünglich geplanten technischen Triplikate ausreichte, wurde dieses Experiment nur einmal durchgeführt.

Parallel dazu wurde das gleiche Peptidset in den Konzentrationen 7,5  $\mu\text{M}$  und 75  $\mu\text{M}$  über den MTT-Assay mit HFF auf potenzielle Toxizität getestet. Die Volllängenpeptide HNP4 und HD5 sowie die Derivate HD5 (1-9) und HD5 (1-9mod) zeigen bei 75  $\mu\text{M}$  keine signifikante Verminderung der zellulären Viabilität (Abbildung 6; Absorption im MTT-Assay). Die Peptide HNP4 (1-11), HNP4 (1-11mod) und HD5 (7-32) führen zwar zu einer leicht verminderten Viabilität, dennoch wurde auf Grund der vergleichsweise hohen antiviralen Aktivität beschlossen, diese Peptide weiter zu charakterisieren. Die Volllängenpeptide HNP4 und HD5 sowie das Peptidfragment HD5 (10-27) zeigen in den mikroskopischen Aufnahmen im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen Auffälligkeiten im Erscheinungsbild.



**Abbildung 5: Antivirale Aktivität von Defensinfragmenten**

HFF wurden mit TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP infiziert (MOI 0,5) und mit verschiedenen Peptiden in den Konzentrationen 7,5  $\mu$ M und 75  $\mu$ M behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **A** zeigt die mit 75  $\mu$ M Peptid behandelten Zellen im Mikroskop nach Fixierung und Färbung. Maßstabbalken entspricht 1 mm. **B** zeigt die berechneten Infektionsraten (GFP+/DAPI+, normiert auf 0,01 % HAC, n=1 in Triplikaten). ns: nicht signifikant, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , oberes Symbol: 75  $\mu$ M, unteres Symbol: 7,5  $\mu$ M. Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Statistischer Test: *one-way-ANOVA* mit vielfachen Vergleichen und Dunnett-Korrektur. Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).



**Abbildung 6: Toxizität von Defensinfragmenten im MTT-Assay**

HFF wurden mit Peptiden in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubationszeit wurde die MTT-stock-Lösung zugegeben und nach weiteren 3 h die Kristalle in Lösung gebracht. **A** zeigt beispielhaft die mit 75 µM Peptid behandelten Zellen im Mikroskop. Maßstabbalken entspricht 1 mm. **B** zeigt die relative Absorption (normiert auf 0,01 % HAC, n=3 in Triplikaten). ns: nicht signifikant, \*\*\*\* p < 0.0001, \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05, oberes Symbol: 75 µM, unteres Symbol: 7,5 µM. Abbildung zeigt Mittelwerte ± Standardabweichung. Statistischer Test: *one-way-ANOVA* mit vielfachen Vergleichen und Dunnett-Korrektur. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

### 3.2 Bestimmung der IC50 und CC50 für ausgewählte Peptide

Im nächsten Schritt wurden die Defensin-Peptidfragmente, die bei einer Konzentration von 75 µM die HCMV-Infektionsrate in HFF reduzieren, weiter charakterisiert. Miteinbezogen wurden die Volllängenpeptide HNP4 und HD5 und deren Derivate HNP4 (1-11), HNP4 (1-11mod), HD5 (1-9), HD5 (1-9mod) und HD5 (7-32). Im Infektions-Assay wurde die antivirale Aktivität der Peptide in

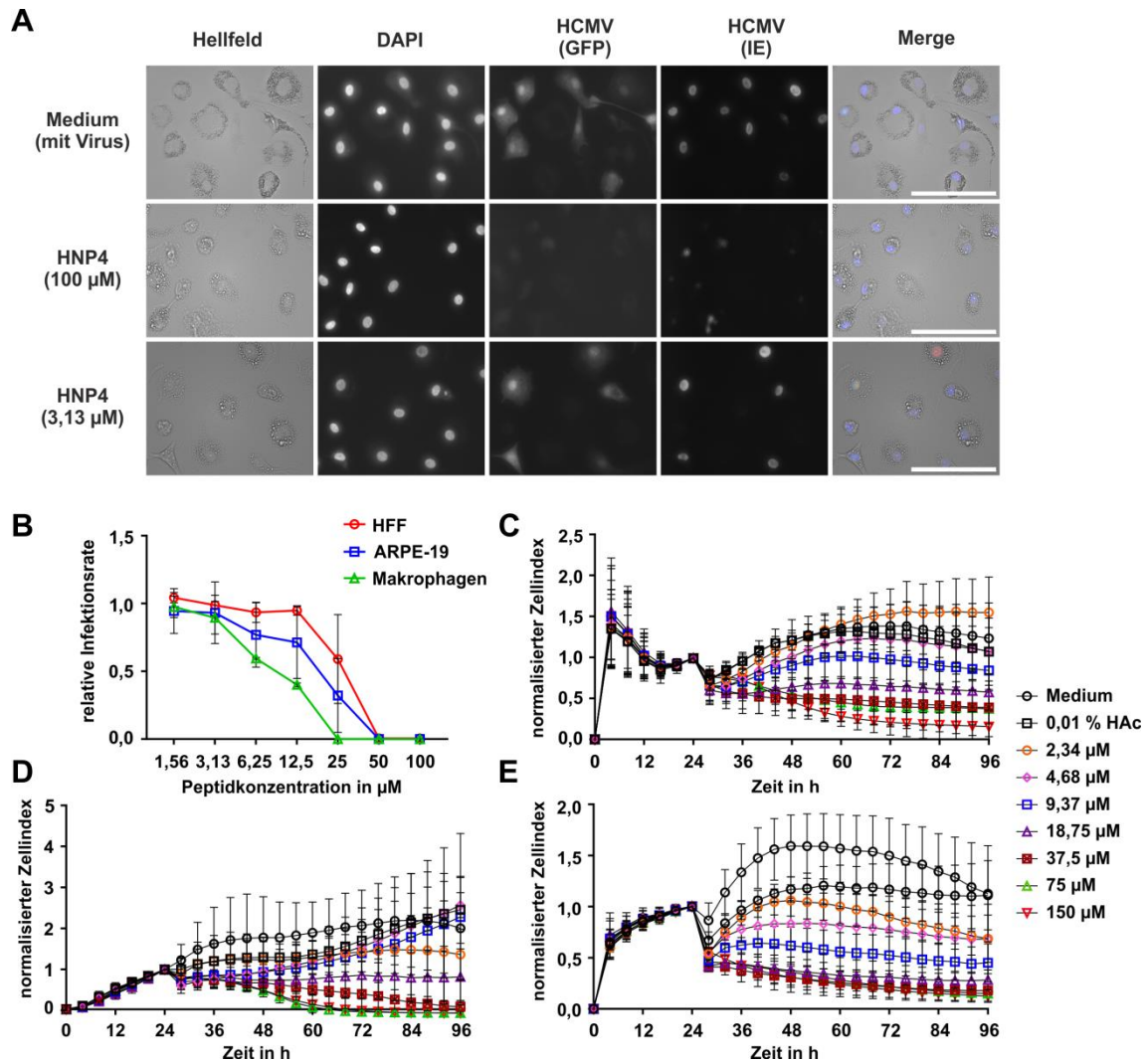


Konzentrationen von 1,56  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  auf HFF, ARPE-19 und Makrophagen bzw. THP-1 bestimmt. Da es trotz vorheriger Titration der verschiedenen Spender mit den entsprechenden Virus-*stocks* mehrfach nicht gelang, in einem begrenzten Volumen von 100  $\mu\text{l}$  eine ausreichende Infektionsrate auf Makrophagen zu erzielen, wurden die Volllängenpeptide auf Makrophagen nur einmal getestet. Bei den Experimenten mit den kleineren Defensin-Peptidfragmenten wurde im Folgenden THP-1 als Surrogat für humane Makrophagen verwendet. Bei allen Experimenten wurde mit einer MOI von 0,5 gearbeitet.

Analog zu den Infektions-Assays wurde in Konzentrationen von 2,34  $\mu\text{M}$  bis 150  $\mu\text{M}$  auf HFF, ARPE-19 und Makrophagen im xCELLigence erneut Toxizität getestet. Im Vergleich zum MTT-Assay ist ein Vorteil die Möglichkeit, kontinuierlich über einen langen Zeitraum den Einfluss der Defensine auf die Viabilität der Zellen zu messen. Das Ergebnis der Impedanzmessung der Makrophagen, die mit den Peptidfragmenten behandelt wurden, liegt nur mit  $n=1$  vor, da in zwei Experimenten die Impedanz in den Kontroll-*wells* stark vermindert war.

Aus den bestimmten Werten wurde in GraphPad Prism die IC50 und die CC50 bestimmt. Da teilweise erst bei sehr hohen Konzentrationen Effekte messbar waren, ist für die meisten Peptide keine Bestimmung der IC50 und CC50 mit entsprechender Konfidenz möglich.

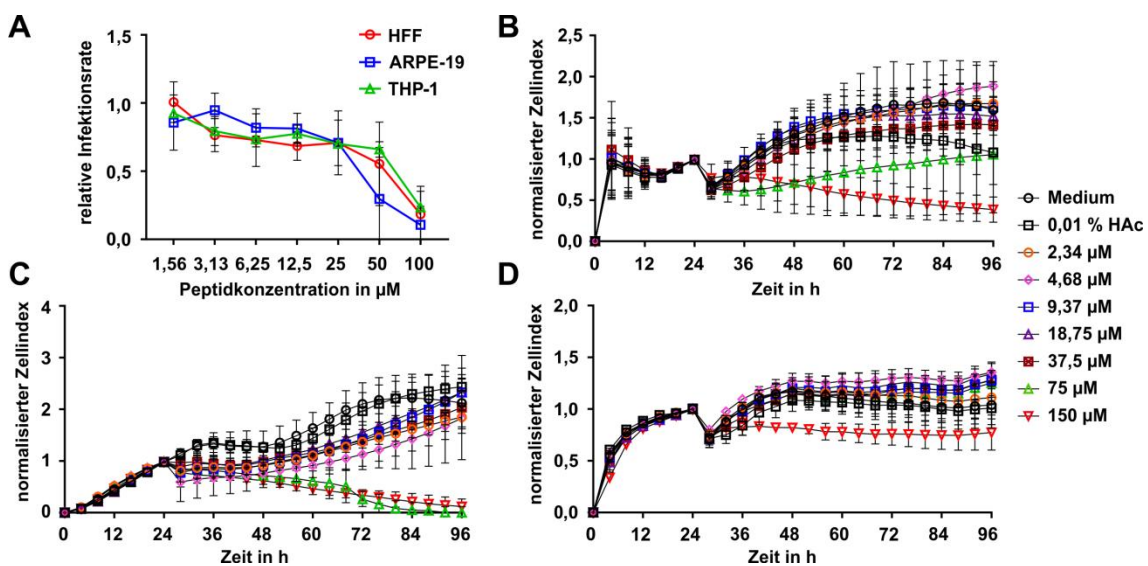
Das Volllängenpeptid HNP4 hemmt die Infektion im Infektions-Assay auf Makrophagen ab 12,5  $\mu\text{M}$  mit einer kompletten Infektionshemmung ab 25  $\mu\text{M}$  (Abbildung 7). Auf HFF und ARPE-19 kommt es ab einer Peptidkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  zu einer kompletten Hemmung der Infektion. HNP4 bewirkt auf allen Zellarten bei hohen (75  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$ ) und teilweise bei mittleren (37,5  $\mu\text{M}$ ) Konzentrationen eine Verringerung der elektrischen Impedanz. Auf Makrophagen ist bereits bei 18,75  $\mu\text{M}$  ein leichter Abfall der Impedanz erkennbar. Dies ist ein Hinweis auf deutliche Toxizität.



### Abbildung 7: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HNP4

Infektions-Assay: HFF, ARPE-19 und Makrophagen wurden mit TB40/E- $\Delta$ JUL16-EGFP infiziert (MOI 0,5) und mit HNP4 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. **A** zeigt die mit HNP4 behandelten Makrophagen im Mikroskop nach Fixierung und Färbung. Maßstabbalken entspricht 100 µm. **B** zeigt für alle drei Zellarten die berechnete Infektionsrate (IE+/DAPI+, normiert auf Medium, HFF und ARPE-19 n=3, Makrophagen n=1 in Duplikaten). Impedanzmessung: HFF (**C**), ARPE-19 (**D**) und Makrophagen (**E**) wurden nach 24 h mit HNP4 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Messung der elektrischen Impedanz alle 30 min über 72 h (normiert auf 24 h-Wert, n=3 in Duplikaten). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

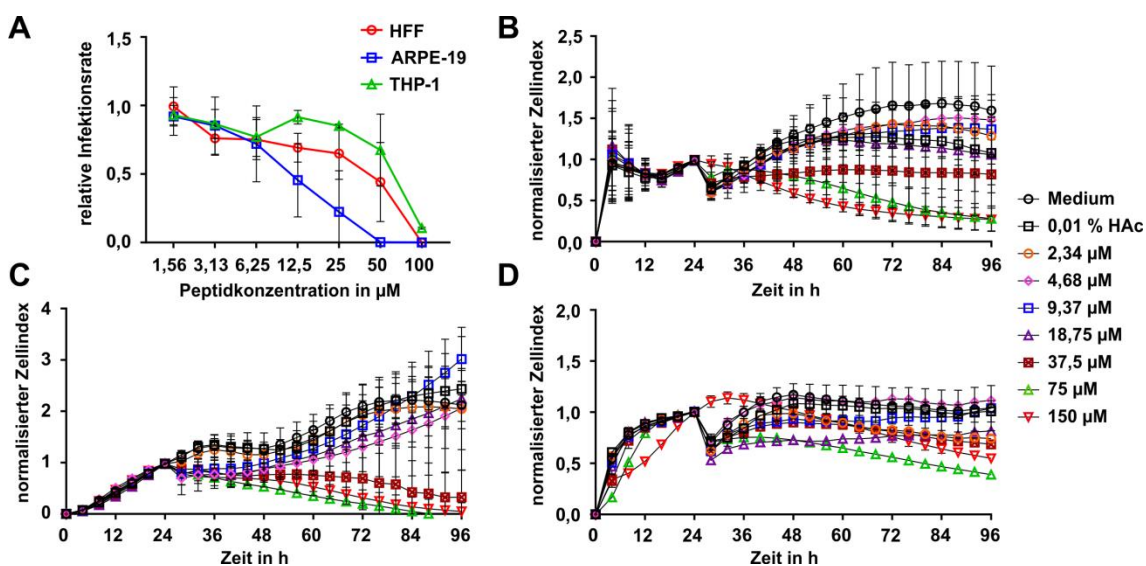
Das Peptidfragment HNP4 (1-11) zeigt im Infektions-Assay auf ARPE-19 bereits eine deutliche antivirale Aktivität ab 50  $\mu\text{M}$  und eine Infektionshemmung mit einer Residualinfektion von 10 % auf ARPE-19, 18 % auf HFF und 24 % auf THP-1 bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (Abbildung 8). HNP4 (1-11) führt auf HFF bei 150  $\mu\text{M}$  und auf ARPE-19 ab 75  $\mu\text{M}$  zu einer Verminderung der elektrischen Impedanz. Auf Makrophagen kommt es zu keinem Abfall der Impedanz, es zeigt sich lediglich eine unveränderte Impedanz bei 150  $\mu\text{M}$ .



### Abbildung 8: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HNP4 (1-11)

Infektions-Assay: HFF, ARPE-19 und THP-1 wurden mit TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP infiziert (MOI 0,5) und mit HNP4 (1-11) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. **A** zeigt für alle drei Zellarten die berechnete Infektionsrate (IE+/DAPI+, normiert auf Medium, HFF und ARPE-19 n=3, THP-1 n=1 in Duplikaten). Impedanzmessung: HFF (**B**), ARPE-19 (**C**) und Makrophagen (**D**) wurden nach 24 h mit HNP4 (1-11) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Messung der elektrischen Impedanz alle 30 min über 72 h (normiert auf 24 h-Wert, HFF und ARPE-19 n=3, Makrophagen n=1 in Duplikaten). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

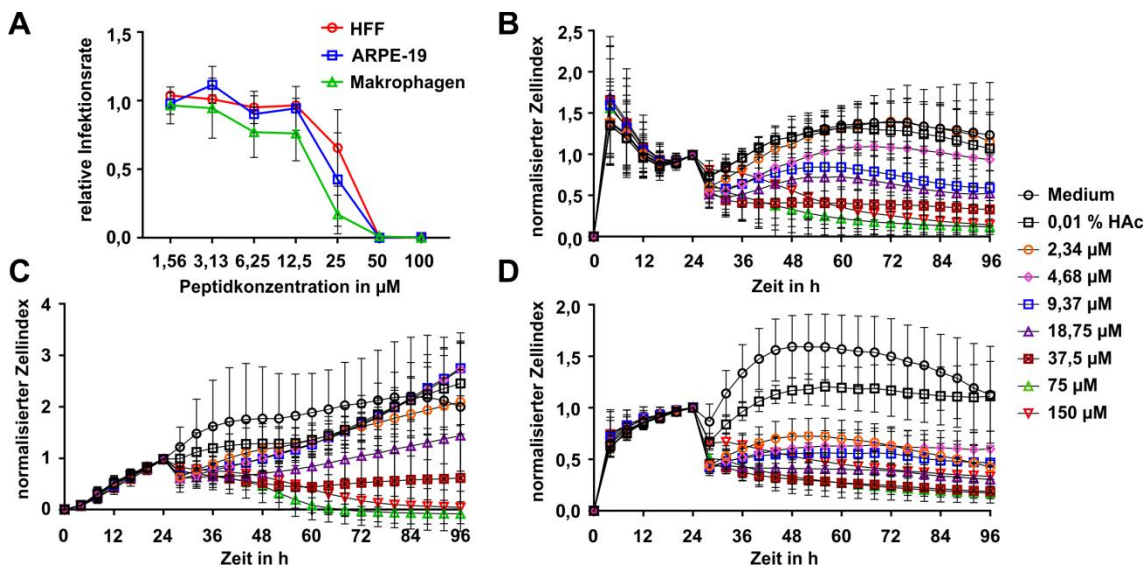
HNP4 (1-11mod) zeigt auf ARPE-19 bereits ab 12,5  $\mu\text{M}$  antivirale Aktivität (Abbildung 9). Eine komplette Hemmung der Infektion wird auf ARPE-19 ab 50  $\mu\text{M}$  und auf HFF bei 100  $\mu\text{M}$  erzielt. Auf THP-1 verbleibt auch bei 100  $\mu\text{M}$  eine Residualinfektion von 10 %. HNP4 (1-11mod) zeigt auf HFF ab 75  $\mu\text{M}$  und auf ARPE-19 ab 37,5  $\mu\text{M}$  eine Verminderung der elektrischen Impedanz. Auf Makrophagen zeigt sich lediglich bei 75  $\mu\text{M}$  eine Verminderung der Impedanz.



**Abbildung 9: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HNP4 (1-11mod)**

Infektions-Assay: HFF, ARPE-19 und THP-1 wurden mit TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP infiziert (MOI 0,5) und mit HNP4 (1-11mod) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. **A** zeigt für alle drei Zellarten die berechnete Infektionsrate (IE+/DAPI+, normiert auf Medium, HFF und ARPE-19 n=3, THP-1 n=1 in Duplikaten). Impedanzmessung: HFF (**B**), ARPE-19 (**C**) und Makrophagen (**D**) wurden nach 24 h mit HNP4 (1-11mod) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Messung der elektrischen Impedanz alle 30 min über 72 h (normiert auf 24 h-Wert, HFF und ARPE-19 n=3, Makrophagen n=1 in Duplikaten). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

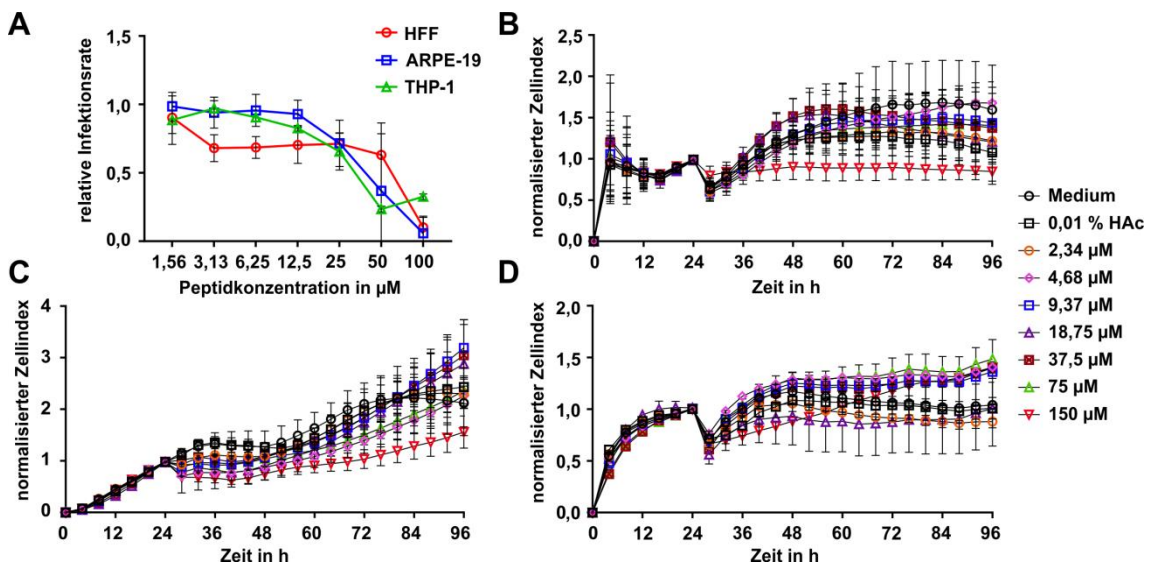
HD5 zeigt im Infektions-Assay auf allen drei Zellarten beginnende antivirale Aktivität ab 25  $\mu\text{M}$  mit einer kompletten Infektionshemmung ab 50  $\mu\text{M}$  (Abbildung 10). HD5 bewirkt auf allen Zellarten bei hohen Konzentrationen (75  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$ ) und auf Makrophagen bereits ab 18,75  $\mu\text{M}$  eine Verminderung der elektrischen Impedanz.



**Abbildung 10: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HD5**

Infektions-Assay: HFF, ARPE-19 und Makrophagen wurden mit TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP infiziert (MOI 0,5) und mit HD5 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. **A** zeigt für alle drei Zellarten die berechnete Infektionsrate (IE+/DAPI+, normiert auf Medium, HFF und ARPE-19 n=3, Makrophagen n=1 in Duplikaten). Impedanzmessung: HFF (**B**), ARPE-19 (**C**) und Makrophagen (**D**) wurden nach 24 h mit HD5 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Messung der elektrischen Impedanz alle 30 min über 72 h (normiert auf 24 h-Wert, n=3 in Duplikaten). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

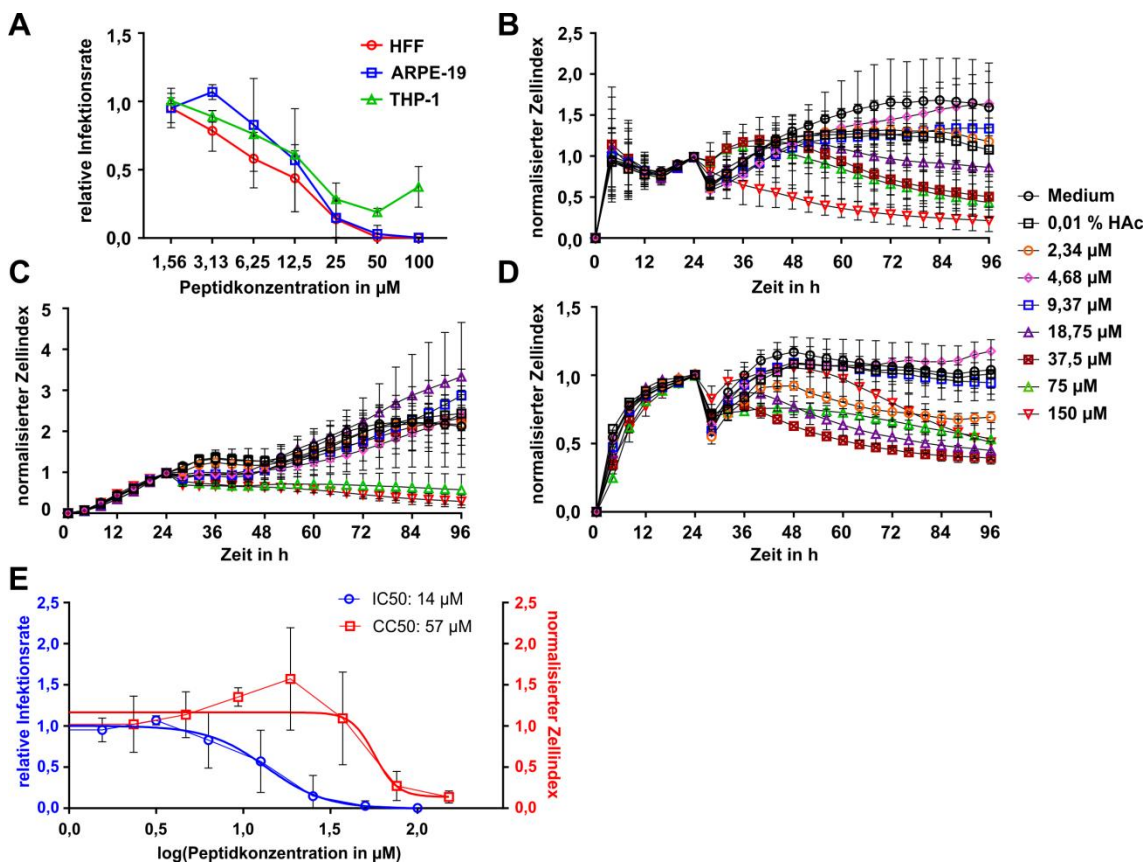
HD5 (1-9) hat ab 50  $\mu\text{M}$  antivirale Wirkung (Abbildung 11). Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verbleibt eine Residualinfektion von 6 % auf ARPE-19, 10 % auf HFF und 33 % auf THP-1. Auf allen drei Zellarten kommt es auch bei hohen Peptidkonzentrationen nicht zu einer Verringerung der elektrischen Impedanz. Lediglich auf HFF bleibt der normalisierte Zellindex, der Veränderungen in der Impedanz abbildet, nach Zugabe von Peptid in der Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  unverändert zwischen 0,8 und 0,9.



**Abbildung 11: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HD5 (1-9)**

Infektions-Assay: HFF, ARPE-19 und THP-1 wurden mit TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP infiziert (MOI 0,5) und mit HD5 (1-9) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. **A** zeigt für alle drei Zellarten die berechnete Infektionsrate (IE+/DAPI+, normiert auf Medium, HFF und ARPE-19 n=3, THP-1 n=1 in Duplikaten). Impedanzmessung: HFF (**B**), ARPE-19 (**C**) und Makrophagen (**D**) wurden nach 24 h mit HD5 (1-9) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Messung der elektrischen Impedanz alle 30 min über 72 h (normiert auf 24 h-Wert, HFF und ARPE-19 n=3, Makrophagen n=1 in Duplikaten). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

Das modifizierte Fragment HD5 (1-9mod) zeigt im Infektions-Assay ab 25  $\mu\text{M}$  antivirale Aktivität, eine komplette Infektionshemmung erfolgt auf HFF bei 50  $\mu\text{M}$  und auf ARPE-19 bei 100  $\mu\text{M}$  (Abbildung 12). Auf THP-1 verbleibt auch bei einer Peptidkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine Residualinfektion von 38 %. In der Impedanzmessung zeigt sich auf HFF ein Abfall der Impedanz ab 37,5  $\mu\text{M}$ , auf ARPE-19 ab 75  $\mu\text{M}$  und auf Makrophagen ab 18,75  $\mu\text{M}$ .

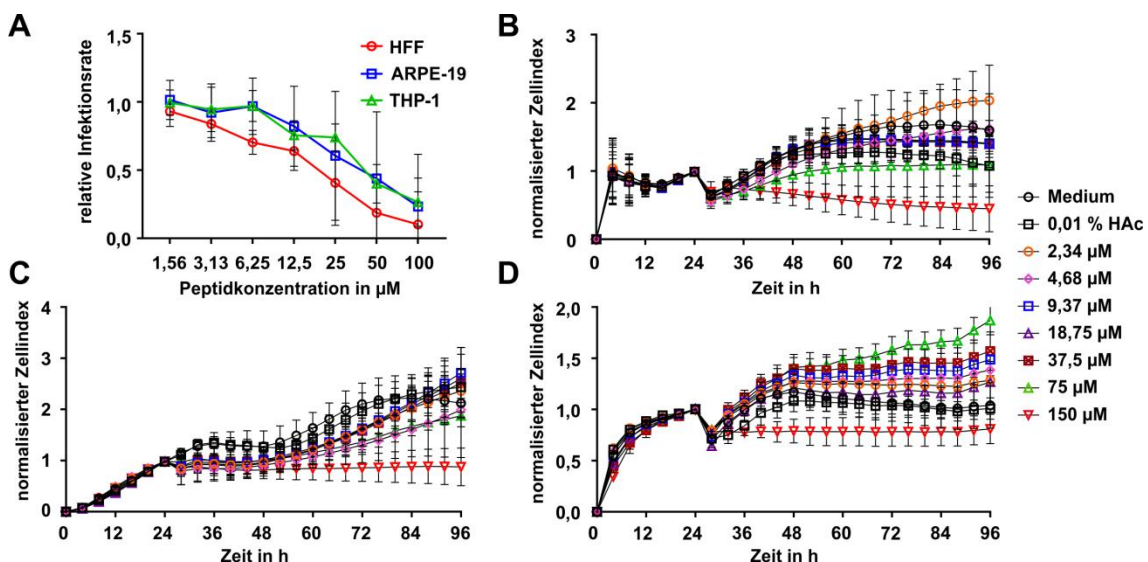


**Abbildung 12: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HD5 (1-9mod)**

Infektions-Assay: HFF, ARPE-19 und THP-1 wurden mit TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP infiziert (MOI 0,5) und mit HD5 (1-9mod) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. **A** zeigt für alle drei Zellarten die berechnete Infektionsrate (IE+/DAPI+, normiert auf Medium, HFF und ARPE-19 n=3, THP-1 n=1 in Duplikaten). Impedanzmessung: HFF (**B**), ARPE-19 (**C**) und Makrophagen (**D**) wurden nach 24 h mit HD5 (1-9mod) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Messung der elektrischen Impedanz alle 30 min über 72 h (normiert auf 24 h-Wert, HFF und ARPE-19 n=3, Makrophagen n=1 in Duplikaten). **E** zeigt exemplarisch die Bestimmung der IC<sub>50</sub> und der CC<sub>50</sub> von HD5 (1-9mod) auf ARPE-19. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

Zusätzlich wird hier exemplarisch die Berechnung von IC<sub>50</sub> (14 µM) und CC<sub>50</sub> (57 µM) auf ARPE-19 dargestellt (Abbildung 12). Die Berechnung der CC<sub>50</sub> mit 57 µM beruht auf der Annahme, dass das untere Plateau vollständig ausgebildet ist. Da diese Voraussetzung jedoch nicht ganz erfüllt ist, ist eine zuverlässige Berechnung nicht möglich.

Das Peptidbruchstück HD5 (7-32) ist ab 25 µM antiviral wirksam (Abbildung 13). Dennoch verbleibt auch bei einer Peptidkonzentration von 100 µM eine Residualinfektion von 10 % auf HFF, 23 % auf ARPE-19 und 27 % auf THP-1. Im xCELLigence zeigt sich für die Konzentration von 150 µM ein Abfall der Impedanz auf HFF und eine gleichbleibende Impedanz auf ARPE-19 und Makrophagen.



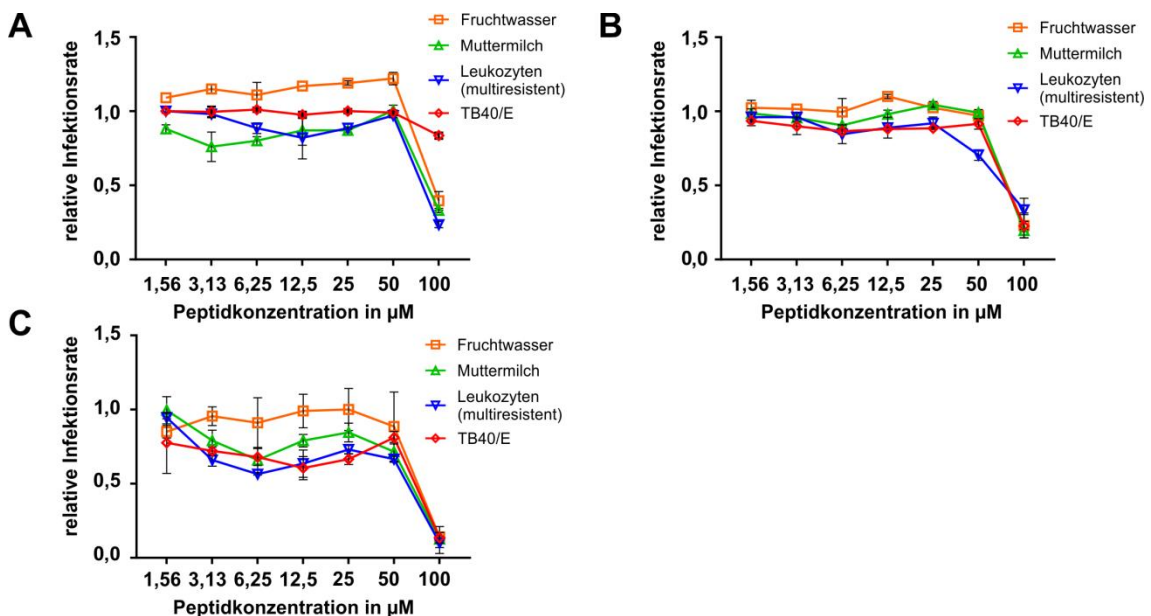
**Abbildung 13: Infektions-Assay und Impedanzmessung von HD5 (7-32)**

Infektions-Assay: HFF, ARPE-19 und THP-1 wurden mit TB40/E-ΔUL16-EGFP infiziert (MOI 0,5) und mit HD5 (7-32) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. **A** zeigt für alle drei Zellarten die berechnete Infektionsrate (IE+/DAPI+, normiert auf Medium, HFF und ARPE-19 n=3, THP-1 n=1 in Duplikaten). Impedanzmessung: HFF (**B**), ARPE-19 (**C**) und Makrophagen (**D**) wurden nach 24 h mit HD5 (7-32) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Messung der elektrischen Impedanz alle 30 min über 72 h (normiert auf 24 h-Wert, HFF und ARPE-19 n=3, Makrophagen n=1 in Duplikaten). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± Standardabweichung. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).



### 3.3 Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) gegen die Infektion mit klinischen HCMV-Isolaten

Um zu testen, ob HD5 (1-9) auch klinische HCMV-Isolate inhibiert, wurde die antivirale Aktivität von HD5 (1-9) in Konzentrationen von 1,56  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  gegen drei HCMV-Isolate auf HFF bestimmt. Miteinbezogen wurde ein Isolat aus Fruchtwasser-Fibroblasten, ein Isolat aus Molke, die aus Muttermilch gewonnen wurde und ein Isolat aus Leukozyten, das resistent gegenüber Ganciclovir und Foscarnet ist. Das Experiment wurde drei Mal mit unterschiedlichen MOI durchgeführt.



**Abbildung 14: Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) gegen die Infektion mit klinischen HCMV-Isolaten**

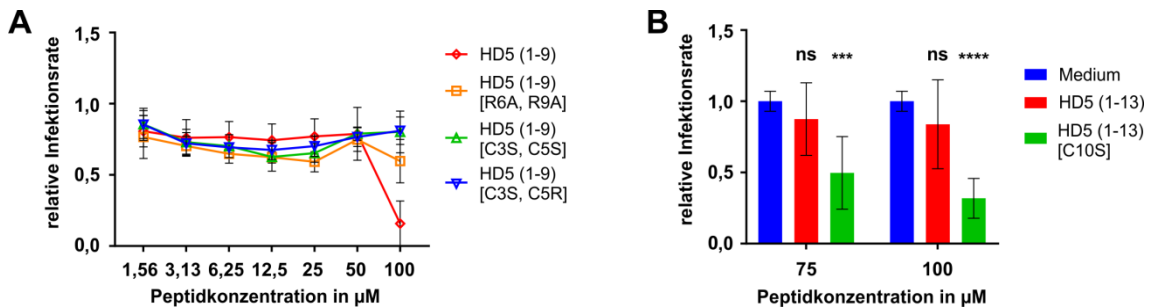
HFF wurden mit verschiedenen klinischen HCMV-Isolaten und TB40/E- $\Delta\text{UL16-EGFP}$  als Referenzstamm mit unterschiedlichen MOI infiziert (**A**: MOI 0,5; **B**: MOI 0,2; **C**: MOI 0,1) und mit HD5 (1-9) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. Gezeigt sind die berechneten Infektionsraten (IE+/DAPI+, normiert auf Medium,  $n=1$  in Duplikaten) als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

Die Infektion mit den klinischen Isolaten wird bei einer MOI von 0,5 deutlich stärker gehemmt, als die Infektion mit dem Referenzstamm TB40/E (Abbildung 14). Die Infektionsrate des Referenzstammes ist bei einer Peptidkonzentration von 100  $\mu$ M bei 84 %, während die durchschnittliche Residualinfektion bei den klinischen Isolaten bei 32 % liegt. Aufgrund der hohen absoluten Infektionsraten wurde in den darauffolgenden Experimenten die MOI gesenkt. Bei einer MOI von 0,2 zeigt sich für TB40/E bei einer Peptidkonzentration von 100  $\mu$ M eine Residualinfektion von 23 %, gegen eine durchschnittliche Residualinfektion bei den klinischen Isolaten von 25 %. Wird die MOI auf 0,1 gesenkt, verbleibt bei einer Konzentration von HD5 (1-9) von 100  $\mu$ M für den Referenzstamm eine Restinfektion von 14 %, während die durchschnittliche Restinfektion der klinischen Isolate 12 % beträgt. Die Infektion mit klinischen HCMV-Isolaten kann also von HD5 (1-9) mindestens genauso stark gehemmt werden, wie die Infektion mit dem Referenzstamm TB40/E.

### **3.4 Antivirale Aktivität von Derivaten der Peptidfragmente**

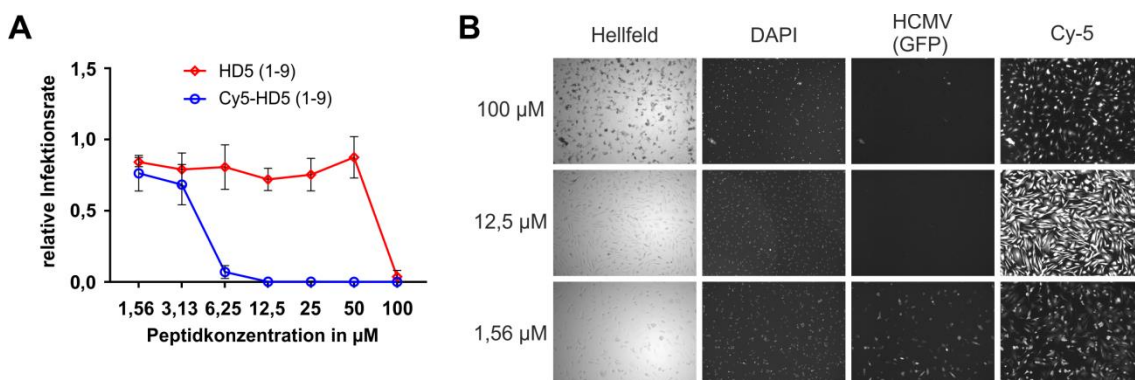
Im nächsten Schritt sollte durch den gezielten Austausch einzelner Aminosäuren des aktiven Peptids HD5 (1-9) und des inaktiven Peptids HD5 (1-13) die antivirale Aktivität verändert werden, um daraus Rückschlüsse auf die Aktivitätsvermittelnden Domänen der Peptidfragmente zu ziehen. Abgeleitet von HD5 (1-9) wurden die Derivate HD5 (1-9) [R6A, R9A], HD5 (1-9) [C3S, C5S] und HD5 (1-9) [C3S, C5R] miteinbezogen, abgeleitet von HD5 (1-13) das Derivat HD5 (1-13) [C10S]. Zusätzlich wurde das Peptidbruchstück HD5 (1-9) an den Fluoreszenz-Farbstoff Cyanin-5 gekoppelt (Cy5-HD5 (1-9)), um in späteren Experimenten Informationen zur Interaktion des Peptids mit der Zelle bzw. den Viruspartikeln zu erhalten. Alle Peptide wurden in Konzentrationen von 1,56  $\mu$ M bis 100  $\mu$ M auf ihre antivirale Aktivität gegen HCMV-Infektionen mit einer MOI von 0,2 auf HFF getestet. Die Derivate von HD5 (1-9) besitzen bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M keine antivirale Aktivität, während die Infektion bei einer Behandlung mit HD5 (1-9) bis auf eine Residualinfektion von 16 % gehemmt wird (Abbildung 15). Das Peptidfragment HD5 (1-13) hat keinen antiviralen Effekt, während das Derivat

HD5 (1-13) [C10S] bereits ab einer Konzentration von 75  $\mu\text{M}$  eine signifikante Senkung der Infektionsrate bewirkt.



### Abbildung 15: Antivirale Aktivität von Derivaten der Peptidfragmente

HFF wurden mit TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP infiziert (MOI 0,2) und mit Derivaten der Peptidfragmente HD5 (1-9) (A) und HD5 (1-13) (B) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. Gezeigt sind die berechneten Infektionsraten (IE+/DAPI+, normiert auf Medium, n=3 in Duplikaten) als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. ns: nicht signifikant, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Statistischer Test: *one-way-ANOVA* mit vielfachen Vergleichen und Dunnett-Korrektur. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).



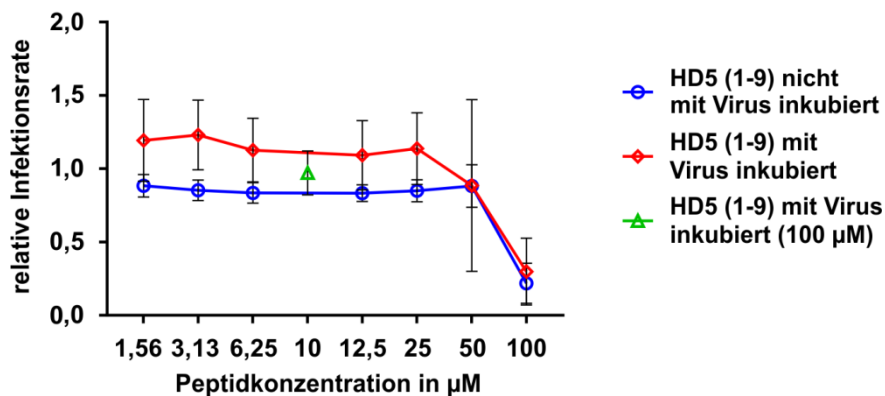
### Abbildung 16: Antivirale Aktivität von Cy5-HD5 (1-9)

HFF wurden mit TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP infiziert (MOI 0,2) und mit Cy5-HD5 (1-9) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. A zeigt die berechneten Infektionsraten (GFP+/DAPI+, normiert auf Medium, n=3 in Duplikaten). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. B zeigt die infizierten und mit Cy5-HD5 (1-9) behandelten Zellen im Mikroskop nach Fixierung und Färbung. Maßstabbalken entspricht 1 mm.

Die HCMV-Infektion bei der Behandlung mit Cy5-HD5 (1-9) wird bereits ab 12,5  $\mu\text{M}$  komplett gehemmt, während die Infektionshemmung bei der Behandlung mit HD5 (1-9) erst bei 100  $\mu\text{M}$  komplett ist (Abbildung 16). Die mikroskopischen Aufnahmen von HCMV-infizierten HFF, die mit Cy5-HD5 (1-9) behandelt wurden, zeigen für alle Peptidkonzentrationen Auffälligkeiten. Die mit Peptid in geringer Konzentration (1,56  $\mu\text{M}$ ) behandelten Zellen weisen Merkmale der HCMV-Infektion auf (Wroblewska et al., 1981). Die Zellen verlieren den Zellkontakt untereinander und ihre wellenlinienförmige Anordnung, sie verändern sich von spindelzelloförmig zu polygonal und bilden Synzytien. Die Zellkerne werden pyknotisch und nehmen die Form von Bohnen an. Auch die GFP-positiven Zellen sprechen dafür, dass es sich hierbei um HCMV-infizierte Zellen handelt. Mit steigender Peptidkonzentration werden stark abgerundete Zellen sichtbar, die sich im Apoptoseprozess befinden könnten. Auch die HFF, die mit Peptidkonzentration bis zu 100  $\mu\text{M}$  behandelt wurden, zeigen einen Verlust der wellenförmigen Anordnung und eine Kondensation und Verminderung der Zellkerne. Da jedoch keine GFP-positiven Zellen vorhanden sind, ist davon auszugehen, dass Cy5-HD5 für Zellen in hohem Maße zytotoxisch ist. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf keine Experimente mehr mit Cy5-HD5 (1-9) durchgeführt.

### **3.5 Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) nach Präinkubation mit HCMV**

In diesem Experiment wurde untersucht, ob durch Präinkubation von HD5 (1-9) mit TB40/E- $\Delta\text{UL16-EGFP}$  die antivirale Aktivität auf HFF verbessert wird. Hieraus kann abgeleitet werden, ob das Peptid einen direkten inaktivierenden Effekt auf Viruspartikel ausübt. HD5 (1-9) wurde in Konzentrationen von 1,56  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  für eine Stunde bei 37 °C mit dem Virus vorinkubiert und direkt auf die Zellen gegeben oder in 100  $\mu\text{M}$  vorinkubiert und auf den Zellen auf 10  $\mu\text{M}$  Endkonzentration verdünnt. Als Referenz wurde ein Infektions-Assay mit den gleichen Peptidkonzentrationen von 1,56  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  ohne Vorinkubation durchgeführt, gearbeitet wurde mit einer MOI von 0,2.



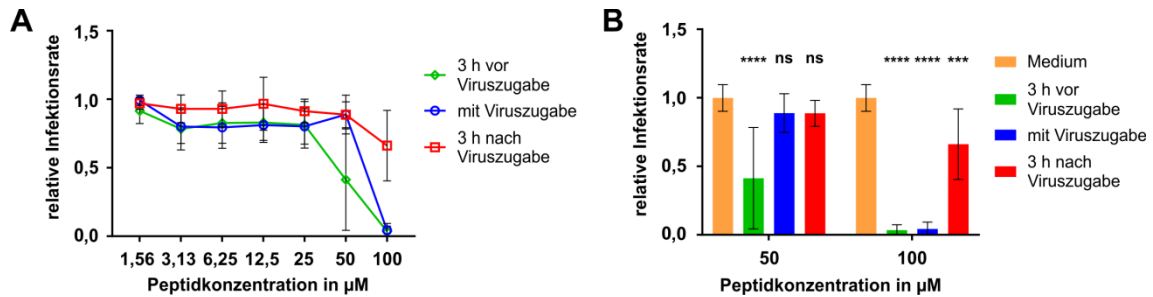
**Abbildung 17: Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) nach Präinkubation mit HCMV**

HD5 (1-9) wurde in einer Kondition in den entsprechenden Konzentrationen mit TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP 1 h bei 37 °C vorinkubiert, in einer Kondition in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  vorinkubiert und auf den Zellen auf 10  $\mu\text{M}$  verdünnt und in einer Kondition ohne Vorinkubation auf die infizierten Zellen gegeben (MOI 0,2). Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. Gezeigt sind die berechneten Infektionsraten (IE+/DAPI+, normiert auf Medium, n=3 in Duplikaten) als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

Die antivirale Aktivität von HD5 (1-9) ist nach Präinkubation mit dem Virus in keiner Konzentration höher, als ohne Präinkubation (Abbildung 17). Auch das in 100  $\mu\text{M}$  vorinkubierte Peptid, das erst auf den Zellen auf 10  $\mu\text{M}$  Endkonzentration verdünnt wurde, hatte keinerlei antiviralen Effekt. Daraus lässt sich ableiten, dass das Peptid seine antivirale Aktivität nicht durch einen direkten Effekt auf die Viruspartikel ausübt.

### 3.6 Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) im *Time of Addition-Assay*

Im nächsten Schritt sollte mit einem *Time of Addition-Assay* untersucht werden, ob durch die Variation des Zugabezeitpunktes von HD5 (1-9) auf HFF die antivirale Aktivität des Peptids verändert wird. Das Peptid wurde vor Infektion für 3 h bei 37 °C mit den Zellen vorinkubiert, gleichzeitig mit dem Virus auf die Zellen gegeben oder 3 h nach Infektion auf die Zellen gegeben. Nach Zugabe des Virus mit einer MOI von 0,2 lag das Peptid in Konzentrationen von 1,56  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  vor.



**Abbildung 18: Antivirale Aktivität von HD5 (1-9) im *Time of Addition*-Assay**

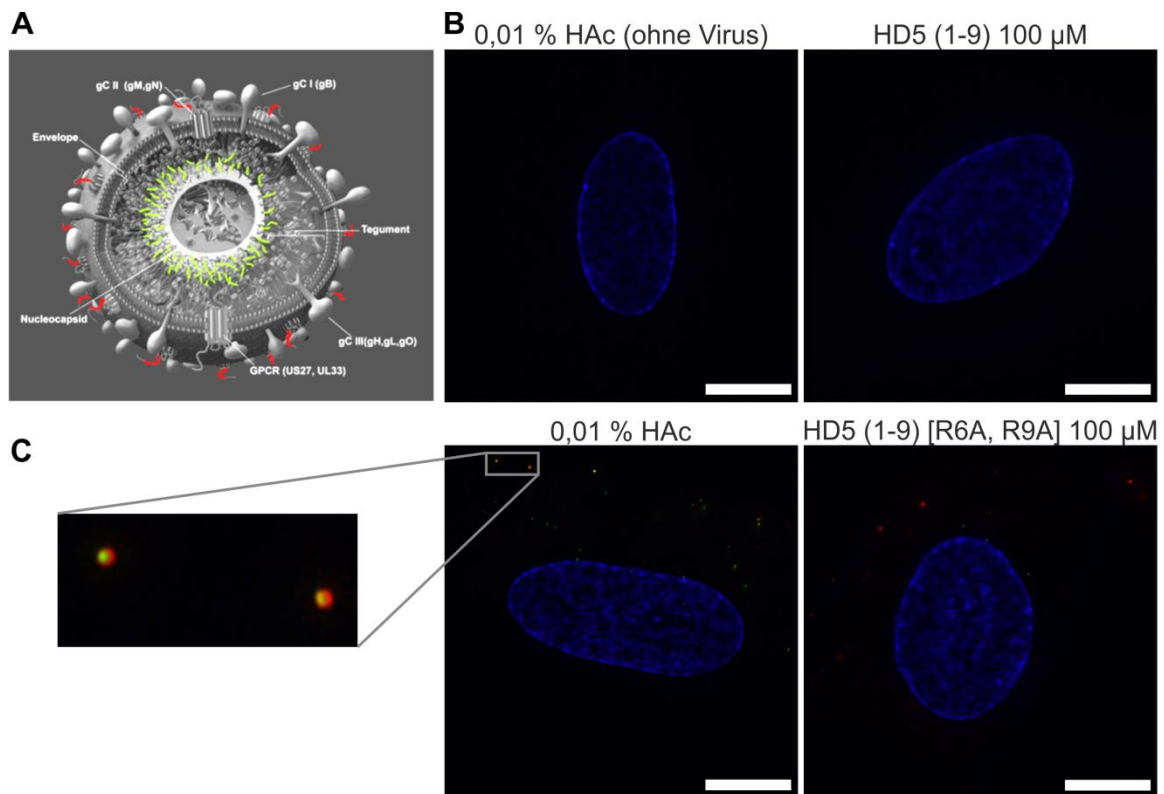
HD5 (1-9) wurde in einer Kondition 3 h vor Infektion bei 37 °C mit HFF vorinkubiert, in einer Kondition gleichzeitig mit TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP auf die Zellen gegeben und in einer Kondition 3 h nach Infektion auf die Zellen gegeben (MOI 0,2). Nach 40 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine IE-Antigenfärbung sowie eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. **A** zeigt die Infektionsraten für die Peptidkonzentrationen von 1,56  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$ , **B** zeigt die Infektionsraten für die Peptidkonzentrationen 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  im direkten Vergleich. Gezeigt sind die berechneten Infektionsraten (IE+/DAPI+, normiert auf Medium, n=3 in Duplikaten) als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. ns: nicht signifikant, \*\*\*\* p < 0.0001, \*\*\* p < 0.001. Statistischer Test: *one-way-ANOVA* mit vielfachen Vergleichen und Dunnett-Korrektur. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

Bei Vorinkubation von Peptid und Zellen kommt es bereits bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Senkung der Infektionsrate (Abbildung 18). Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  kommt es in allen Konditionen zu einer signifikanten Senkung der Infektionsrate. In Konditionen, in denen das Peptid vor und mit dem Virus zugegeben wurde, konnte die Infektion komplett blockiert werden, wohingegen es bei Zugabe des Peptids nach der Infektion zu einem starken Aktivitätsverlust kommt. Daraus lässt sich schließen, dass HD5 (1-9) einen Schritt im Infektionsprozess vor der Aufnahme der Viren in die Zielzelle hemmt.

### 3.7 Analyse des Wirkmechanismus von HD5 (1-9) mit einem dual fluoreszierenden Virus

Zur genaueren Untersuchung des Wirkmechanismus von HD5 (1-9), wurde ein Infektions-Assay mit dem dual fluoreszierenden Virus TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP-UL100mCherry (Abbildung 19A) auf HFF durchgeführt. Die Zellen wurden eine Stunde mit HD5 (1-9) und HD5 (1-9) [R6A, R9A] als Negativkontrolle in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  vorinkubiert, dann wurde das Virus zugegeben und 6 h mit Peptid und Zellen inkubiert. Die MOI wurde in diesem Experiment auf 0,5

erhöht, um in dem erforderlichen Volumen von 200 µl ausreichend Viruspartikel zu haben. Nach der Infektion wurden die Zellen fixiert, gefärbt und im hochauflösenden Mikroskop untersucht (Abbildung 19B und C). Behüllte Viruspartikel zeigen rote und grüne *Tags* und erscheinen i.d.R. gelb, penetrierte Partikel ohne Hülle erscheinen grün. Nach der Behandlung mit HD5 (1-9) sind keine Viruspartikel an oder in der Zelle zu sehen. Im Gegensatz dazu sieht man bei den Negativkontrollen, der Behandlung mit 0,01 % HAc in H<sub>2</sub>O und der Behandlung mit HD5 (1-9) [R6A, R9A] sowohl behüllte als auch penetrierte Viruspartikel.

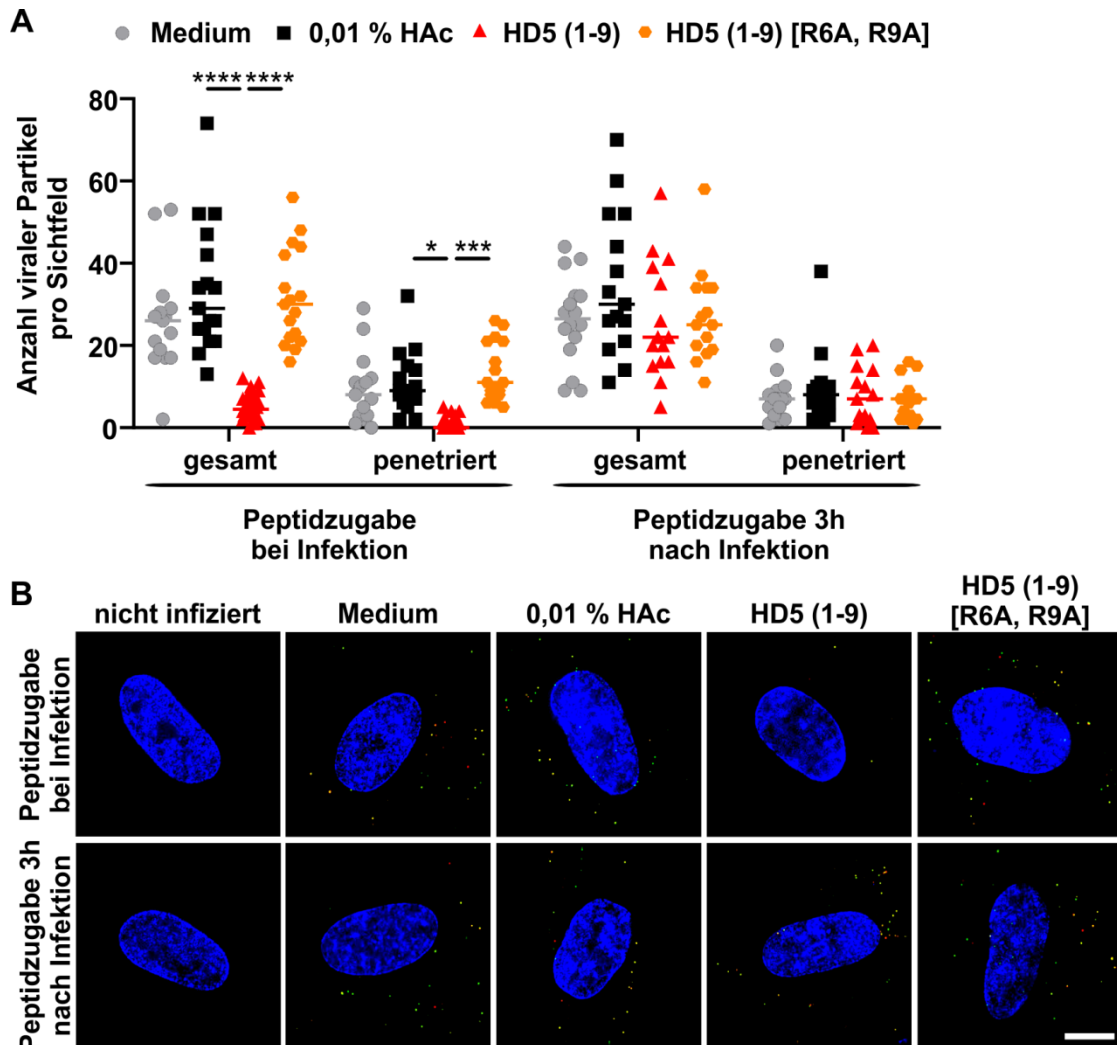


**Abbildung 19: Analyse des Wirkmechanismus von HD5 (1-9) mit einem dual fluoreszierenden Virus**

HFF wurden 1 h bei 37 °C mit HD5 (1-9) und HD5 (1-9) [R6A, R9A] vorinkubiert und mit TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP-UL100mCherry (MOI 0,5) infiziert. Nach 6 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt. **A** zeigt den schematischen Aufbau des dual fluoreszierenden Virus. Abbildung modifiziert von C. Sinzger nach (Strelow et al., 2006), Nutzung mit freundlicher Genehmigung von Caister Academic Press und C. Sinzger. **B** zeigt die Aufnahmen im OMX nach Fixierung und Färbung und **C** zeigt einen vergrößerten Bildausschnitt mit behüllten Viruspartikeln. Maßstabbalken entspricht 10 µm (n=1).

Aufgrund der dennoch geringen Partikeldichte wurde das Experiment von Ramona Businger mit einer MOI von 2 wiederholt. Abweichend vom ersten Versuch wurden in einer Kondition Virus und Peptid gleichzeitig zugegeben und in einer Kondition wurde das Peptid 3 h nach Infektion auf die Zellen gegeben. In jeder Kondition wurde die Gesamtzahl der Partikel sowie die Anzahl der penetrierten Partikel für 15 Zellen bestimmt. Auch hier zeigt sich bei gleichzeitiger Zugabe von Virus und HD5 (1-9) eine deutliche Reduktion sowohl der Gesamtzahl als auch der Anzahl der penetrierten Viruspartikel (Abbildung 20). Im Gegensatz dazu kommt es weder bei der Behandlung mit den Negativkontrollen Medium, 0,01 % HAc in H<sub>2</sub>O und HD5 (1-9) [R6A, R9A] noch bei der Zugabe von HD5 (1-9) 3 h nach Infektion zu einer Reduktion der Anzahl der Viruspartikel. Diese Daten deuten im Einklang mit den Resultaten der *Time-of-Addition* Experimente darauf hin, dass HD5 (1-9) die Adsorption des Virus an die Zielzelle und damit den viralen Eintritt hemmt.



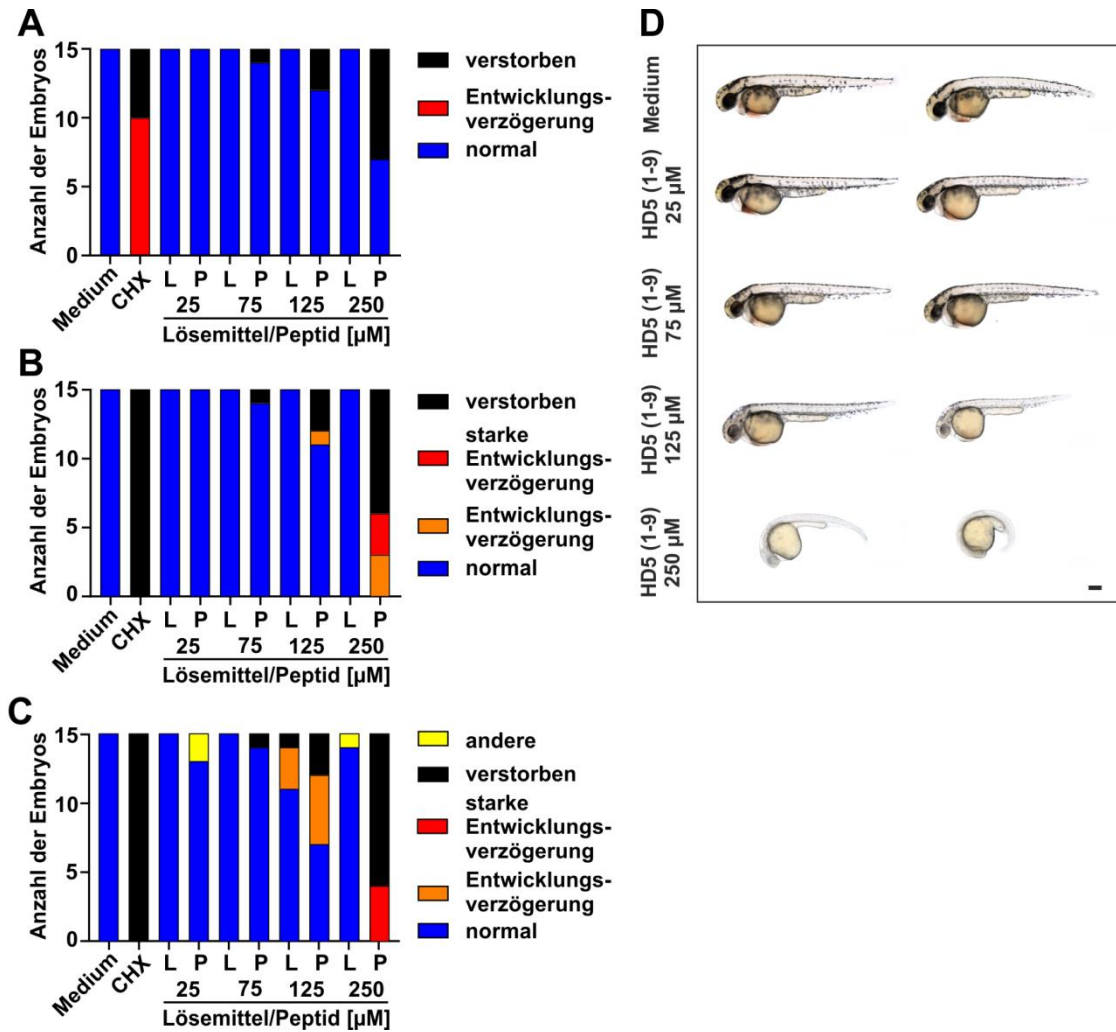


**Abbildung 20: Wiederholungsexperiment zur Analyse des Wirkmechanismus von HD5 (1-9) mit dem dual fluoreszierenden Virus**

HFF wurden mit TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP-UL100mCherry (MOI 2) infiziert, in einer Kondition wurden HD5 (1-9) und HD5 (1-9) [R6A, R9A] in einer Konzentration von 100  $\mu$ M zum Zeitpunkt der Infektion zugegeben, in einer Kondition wurden die Peptide 3 h nach Infektion zugegeben. Nach 6 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt. **A** zeigt für beide Konditionen die Gesamtzahl der viralen Partikel sowie die Anzahl der penetrierten Partikel pro Sichtfeld. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$ . Statistischer Test: *one-way-ANOVA* mit vielfachen Vergleichen und Dunnett-Korrektur. **B** zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen nach Fixierung und Färbung. Maßstab balken entspricht 10  $\mu$ m (n=1). Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

### 3.8 Analyse der Toxizität von HD5 (1-9) in Zebrafischen

Um HD5 (1-9) in einem *in vivo* Modell auf Toxizität zu untersuchen, wurden von Hannes Preiss aus der AG Müller am Max-Planck-Institut Tübingen Experimente mit Zebrafischen durchgeführt. Zur Untersuchung der Toxizität wurden je fünf Embryos pro *well* in Triplikaten 6-7 h nach der Fertilisation mit HD5 (1-9) in Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  behandelt. Als Positivkontrolle wurden Embryos mit 25  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid behandelt. Nach jeweils 13 h, 24 h und 48 h wurde eine mikroskopische Phänotypenanalyse durchgeführt (Abbildung 21). Die Behandlung mit Peptid in der Konzentration 250  $\mu\text{M}$  führte bereits nach 13 h zu Entwicklungsverzögerungen und im weiteren Verlauf zum Tod von 11 der 15 Embryonen. Die 48 h nach Fertilisation noch lebenden 4 Embryonen zeigten alle Entwicklungsverzögerungen. Die Behandlung mit 125  $\mu\text{M}$  Peptid führte zum Tod von 3 Embryonen 13 h nach Fertilisation. Bis 48 h nach Fertilisation zeigten 5 weitere Embryonen eine verzögerte Entwicklung. Die Hälfte der Embryonen entwickelte sich über den gesamten Zeitraum normal. Die Embryonen, die mit Peptid in den Konzentrationen 25  $\mu\text{M}$  und 75  $\mu\text{M}$  behandelt wurden, entwickelten sich mit der Ausnahme eines Embryos über den gesamten beobachteten Zeitraum normal. Bestätigt werden die Ergebnisse durch einen vorherigen Versuch, in dem das Peptid in 0,0004 % HAc gelöst wurde, 20-30 min nach der Fertilisation zugegeben wurde und in den Konzentrationen 25  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  getestet wurde. Auch hier zeigen sich für die geringe Peptidkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  keine Auffälligkeiten in der Entwicklung, für die hohen Konzentrationen von 125  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  ließen sich jedoch bereits ab 6-7 h nach Fertilisation Entwicklungsverzögerungen feststellen, die zum Teil im Verlauf zum Tod führten. Die Schädigungen scheinen durch die frühe Zugabe des Peptids insgesamt stärker ausgeprägt zu sein, die überlebenden Embryonen zeigen jedoch in allen Fällen keine phänotypischen Auffälligkeiten.



**Abbildung 21: Toxizitätstestung von HD5 (1-9) in Zebrafischen**

Fünf Embryos pro *well* wurden in Triplikaten in 200 µl Medium in eine 96-*well*-Platte gegeben, 6-7 h nach Fertilisation wurden Peptide in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Nach jeweils 13 h (A), 24 h (B) und 48 h (C) wurde eine mikroskopische Phänotypenanalyse durchgeführt (n=1). D zeigt repräsentative Bilder der Embryos 48 h nach Fertilisation. CHX= Cycloheximid. Maßstab balken entspricht 250 µm (n=1). Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Antivirale Aktivität und Toxizität der Peptide**

#### **4.1.1 HD5 (1-9) ist antiviral aktiv und zeigt keine Toxizität in der Zellkultur**

Die Ergebnisse zeigen, dass das Peptidbruchstück HD5 (1-9) ab 50  $\mu\text{M}$  antivirale Wirkung auf HFF, ARPE-19 und THP-1 hat (Abbildung 11). HD5 (1-9) zeigt weder im MTT-Assay auf HFF bis 75  $\mu\text{M}$  toxische Effekte (Abbildung 6) noch kommt es in der Impedanzmessung durch eine Peptidkonzentration bis zu 150  $\mu\text{M}$  auf HFF, ARPE-19 und Makrophagen zu einer Verringerung des elektrischen Widerstandes (Abbildung 11). Lediglich auf HFF bleibt der normalisierte Zellindex nach Zugabe des Peptids in einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  unverändert. Im Vergleich mit den Kontrollen könnte es sich dabei am ehesten um einen antiproliferativen Effekt handeln, wobei sich der Widerstand nach 96 h im gleichen Bereich bewegt, wie der Widerstand der mit Essigsäure behandelten Zellen. Da das Peptid die Infektion mit HCMV in einem Konzentrationsbereich hemmt, in dem es nicht toxisch wirkt, kann ausgeschlossen werden, dass das Peptid z.B. durch eine Hemmung des zellulären Replikationszykluses, der auch für die virale Replikation unerlässlich ist, antivirale Aktivität suggeriert. HD5 (1-9) ist das einzige Fragment, das in keinem Assay Toxizität in der Zellkultur zeigt. Das Peptid besitzt eine breite antimikrobielle Aktivität und könnte zusätzlich vor bakteriellen oder anderen viralen Erkrankungen schützen (Ehmann, 2018). Zudem ist es nach dem Fragment HD5 (26-32), welches jedoch keine antivirale Aktivität gegen HCMV zeigt (Abbildung 5), das kleinste der getesteten Peptide. Die geringe Größe von neun Aminosäuren und ca. 1 kDa macht das Peptid in Hinblick auf den Aufwand und die Kosten für die Produktion zu einer interessanten Ausgangsstruktur.

#### **4.1.2 Antivirale Aktivität und Toxizität der Peptidbruchstücke**

Um die antivirale Aktivität der verschiedenen Peptidbruchstücke gegen HCMV zu untersuchen, wurden zunächst Screeninguntersuchungen auf HFF bis zu einer Konzentration von 75  $\mu\text{M}$  und danach weitergehende Untersuchungen auf HFF, ARPE-19 und THP-1 bzw. Makrophagen bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$

durchgeführt. Diese Zelllinien wurden ausgewählt, da sie unterschiedliche Mechanismen repräsentieren, wie das Virus in die Zielzelle gelangt. Während HCMV durch Endozytose in Epithelzellen und Makrophagen aufgenommen wird, kommt es in HFF zu einer Fusion der Virushülle mit der Zellmembran (Compton et al., 1992; Ryckman et al., 2006; Nikitina et al., 2018). Bei den anfänglichen Screeningexperimenten wurde zur Auswertung die Anzahl der GFP-positiven Signale auf die Anzahl der DAPI-positiven Signale bezogen (Abbildung 5), bei allen späteren Experimenten wurde die Anzahl der IE-positiven Signale auf die Anzahl der DAPI-positiven Signale bezogen. IE Proteine werden bereits bis zu zwei Stunden nach Infektion synthetisiert (Honest and Roizman, 1974; Crough and Khanna, 2009). Die Auswertung der Infektionsrate über IE-positive Signale ist demnach zu einem früheren Zeitpunkt als über die Expression von GFP möglich, welches in dem Virusstamm TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP einer DE-Kinetik unterliegt und erst später detektiert werden kann (Kaye et al., 1992).

Eine verlässliche Bestimmung der IC50 und CC50 zur Berechnung eines therapeutischen Index war nicht für alle Peptide möglich. Für eine präzisere Bestimmung könnte die Peptidkonzentration in den Infektions-Assays sowie in der Impedanzmessung erhöht werden und die Abstände zwischen den Konzentrationen erniedrigt werden. Für viele Defensine ist bekannt, dass ihre antimikrobielle Aktivität durch eine Konformationsänderung beeinflusst wird (Campopiano et al., 2004). Eine solche Konformationsänderung, z.B. durch die reduzierenden Bedingungen im sauerstoffarmen Dünndarm oder durch natürlich vorkommendes Thioredoxin, kann einerseits zu einer erhöhten antimikrobiellen Aktivität führen (Schroeder et al., 2011; Lehrer, 2011), andererseits kann die antimikrobielle Wirkung dadurch auch abgeschwächt werden (Daher et al., 1986). In weiterführenden Experimenten könnte man im Vergleich alle Peptidbruchstücke im reduzierten Zustand testen, um zu untersuchen, ob die antivirale Aktivität gegen HCMV dadurch gesteigert werden kann. Eine Untersuchung mittels NMR-Massenspektrometrie, die von Vincent Truffault vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen und Natalia Ruetalo Buschinger vom Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten in Tübingen durchgeführt wurde, zeigt jedoch, dass das

Peptidfragment HD5 (1-9) linear vorliegt. Daher sollte eine Reduktion in diesem Fall keinen Unterschied machen.

#### **4.1.3 Antivirale Aktivität und Toxizität der Vollängenpeptide**

Eine Auffälligkeit in den Hellfeld-Aufnahmen von HFF, die mit HNP4 und HD5 in der Konzentration 75  $\mu$ M behandelt wurden, ist die Bildung von Fibrillen-artigen Strukturen (Abbildung 6). Dies könnte ein Hinweis auf die Bildung von Dimeren oder Oligomeren sein. Für HD5 (Wommack et al., 2012) sowie für andere  $\alpha$ -Defensine (Pazgier et al., 2012; Hill et al., 1991) ist die Bildung von Dimeren mehrfach beschrieben. Auch Dirk Ehmman erklärt das Phänomen, dass HD5 (1-9) antagonistische Effekte in Kombination mit anderen Peptidbruchstücken zeigt, mit möglicher Dimerbildung (Ehmman, 2018). Das Phänomen der Fibrillenbildung ließ sich auch für das Peptidfragment HD5 (10-27) beobachten, war jedoch bei der Behandlung mit HD5 am stärksten ausgeprägt.

Interessanterweise zeigen die Vollängenpeptide HNP4 und HD5 sowie das modifizierte Peptid HD5 (1-9mod) im MTT-Assay keine Toxizität bei einer Konzentration von 75  $\mu$ M (Abbildung 6), in der Impedanzmessung kommt es jedoch zu einem starken Abfall der gemessenen Impedanz (Abbildung 7, Abbildung 10, Abbildung 12). Hier muss verdeutlicht werden, was die jeweiligen Tests untersuchen: während der MTT-Assay Aufschluss über die metabolische Aktivität von Zellen gibt (Berridge and Tan, 1993), reagiert die Impedanzmessung auf Änderungen in der Morphologie und die Ablösung der Zellen vom Plattenboden (Diemert et al., 2012; Ke et al., 2011). Denkbar ist also, dass diese Peptide zwar keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität haben, jedoch die Morphologie der Zellen verändern und damit zu einer verminderten Isolierung der Elektroden am Boden der 96-*well*-Platte führen. Diese Ergebnisse verdeutlichen den Stellenwert verschiedener Toxizitäts-Assays mit unterschiedlichen Ansätzen sowie die Wichtigkeit der kontinuierlichen Langzeitmessung der Impedanz über 72 h als Ergänzung zum MTT-Assay, der eine Endpunktmessung nach 40 h darstellt. Eine Behandlung der Zellen mit Peptiden über mehrere Tage unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle könnte weiteren Aufschluss über die

Zytotoxizität der Peptide geben. Auf den ersten Blick irritierend ist das Ergebnis, dass ein Absinken der Impedanz von Makrophagen, die mit HNP4 und HD5 behandelt wurden, bereits in Konzentrationen zu beobachten ist, in denen die Peptide noch gar keine infektionshemmende Wirkung haben (Abbildung 7, Abbildung 10). Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Verminderung des elektrischen Widerstandes auch durch eine Änderung in der Zellmorphologie zustande kommen kann und nicht zwangsläufig mit Toxizität einhergeht. In der Literatur finden sich viele Hinweise auf Faktoren, die die Wirkung von Volllängenpeptiden beeinflussen, wie der pH-Wert (Abou Alaiwa et al., 2014), die Salzkonzentration (Goldman et al., 1997) und der Kontakt mit Serum (Daher et al., 1986). Es wäre interessant, in weitergehenden Experimenten zu untersuchen, inwiefern auch die Aktivität der Fragmente dadurch beeinflusst werden kann. An dieser Stelle ist jedoch zu betonen, dass das Medium in den Zellkulturen je nach Zelllinie 4-10 % FKS oder humanes Serum enthielt und für einige Peptide dennoch antivirale Aktivität zu verzeichnen war. In der Literatur ist ein hemmender Effekt von Serum bereits ab 2 % beschrieben (Daher et al., 1986).

#### **4.1.4 Modifikation der Peptidbruchstücke kann zu einer erhöhten Toxizität führen**

Im Vorfeld dieses Projektes konnte gezeigt werden, dass die Modifikation der Peptidbruchstücke zu einer stark erhöhten antimikrobiellen Aktivität führt. Für HNP4 (1-11mod) konnte zudem eine konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität festgestellt werden (Ehmann, 2018). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass es durch die Modifikation zu einer deutlich erhöhten Toxizität kommt. Auf HFF, ARPE-19 und auf Makrophagen führen die modifizierten Bruchstücke bereits in geringeren Konzentrationen als die korrespondierenden nicht modifizierten Bruchstücke zu einer Verminderung der Impedanz (Abbildung 9, Abbildung 12). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Stabilisierung der Peptide zu einer unspezifischen Membraninteraktion führt, die toxisch auf die Zellen wirkt.

#### **4.2 HD5 (1-9) zeigt antivirale Aktivität auch gegen klinische HCMV-Isolate**

Die Testung des Peptidfragments HD5 (1-9) gegen die Infektion mit klinischen HCMV-Isolaten zeigt, dass die Infektion mit klinischen Isolaten mindestens so stark gehemmt werden kann, wie die Infektion mit dem laboradaptierten Referenzstamm TB40/E- $\Delta$ UL16-EGFP (Abbildung 14). Dies sicherzustellen war von großer Relevanz, da bekannt ist, dass laboradaptierte Virusstämme durch die Anzucht in der Zellkultur Mutationen bekommen können, die ihre Eigenschaften verändern (Sinzger et al., 1999). In Hinblick darauf war es wichtig, darauf zu achten, dass die klinischen Isolate möglichst wenig an die Zellkultur adaptiert waren. Die Herkunft der Isolate aus Muttermilch und Fruchtwasser wurde in Hinblick auf die mögliche Therapie-Zielgruppe „Schwangere“ ausgewählt. Die infizierten Frauen wurden nicht antiviral vorbehandelt. Zudem wurde ein multiresistenter Stamm ausgewählt, da eine durch Mutationen verursachte Multiresistenz schwerwiegende Folgen für den Krankheitsverlauf haben kann (Fischer et al., 2016; Göhring et al., 2013) und alternative Ansätze dringend benötigt werden. Interessant wäre an dieser Stelle ein Modell, welches den natürlichen Infektionsweg bei kongenitalen Infektionen besser repräsentiert. Erst kürzlich wurde ein neues Zellmodell etabliert, das sich aus den Plazentazellen des Meerschweinchens ableitet und der Erforschung kongenitaler HCMV-Infektionen dienen soll (Yamada et al., 2016). Ein solches Modell könnte in weitergehenden Untersuchungen wichtige Hinweise darauf liefern, ob HD5 (1-9) eine kongenitale HCMV-Transmission blockieren kann.

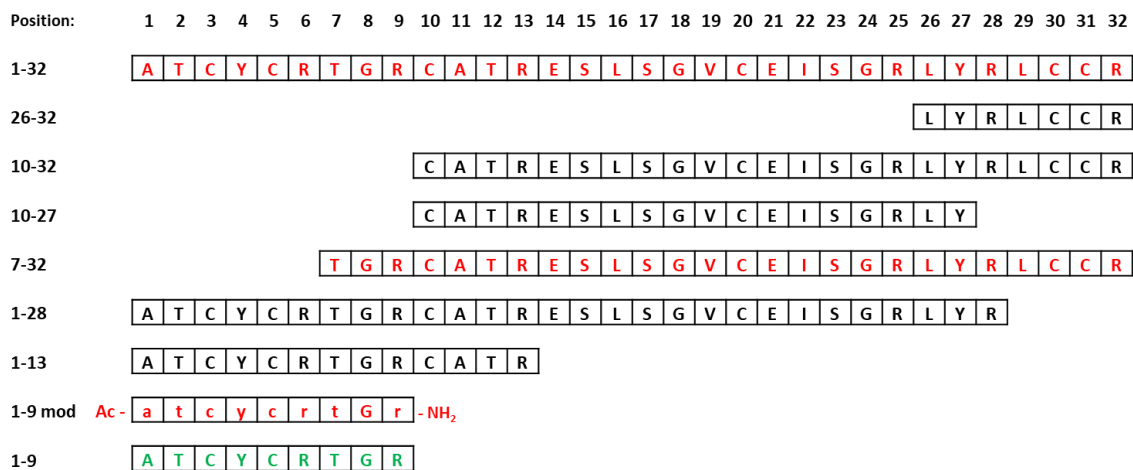
#### **4.3 Arginin und Cystein sind ausschlaggebend für den antiviralen Effekt von HD5 (1-9)**

Der gezielte Austausch einzelner Aminosäuren von HD5 (1-9) sollte Aufschluss darüber geben, welche Aminosäuren wichtig für den antiviralen Effekt sind. In der Literatur findet sich wiederholt die Hypothese, dass das positiv geladene Arginin für die Interaktion mit Phospholipiden in den Membranen wichtig ist (Ganz, 2003). Daher wurden in einem Derivat das Arginin an Position 6 und 9 durch Alanin ersetzt. Zudem stand die Hypothese im Raum, dass das Cystein die antivirale



Aktivität aufgrund nicht nativer Wechselwirkungen stören könnte, weshalb in einem anderen Derivat das Cystein an Position 3 und 5 durch Serin ersetzt wurde. Mit dem Ziel, die antivirale Aktivität weiter zu steigern, wurde ein weiteres Derivat in Auftrag gegeben, bei dem das Cystein an Position 3 durch Serin und das Cystein an Position 5 durch Arginin ersetzt wurde. Das Ergebnis, dass keines der Derivate antivirale Aktivität zeigt (Abbildung 15), spricht dafür, dass sowohl Arginin als auch Cystein für den antiviralen Effekt mitverantwortlich sind. Zudem zeigt der Verlust der antiviralen Aktivität durch den Austausch einzelner Aminosäuren, dass die antivirale Wirkung spezifisch ist.

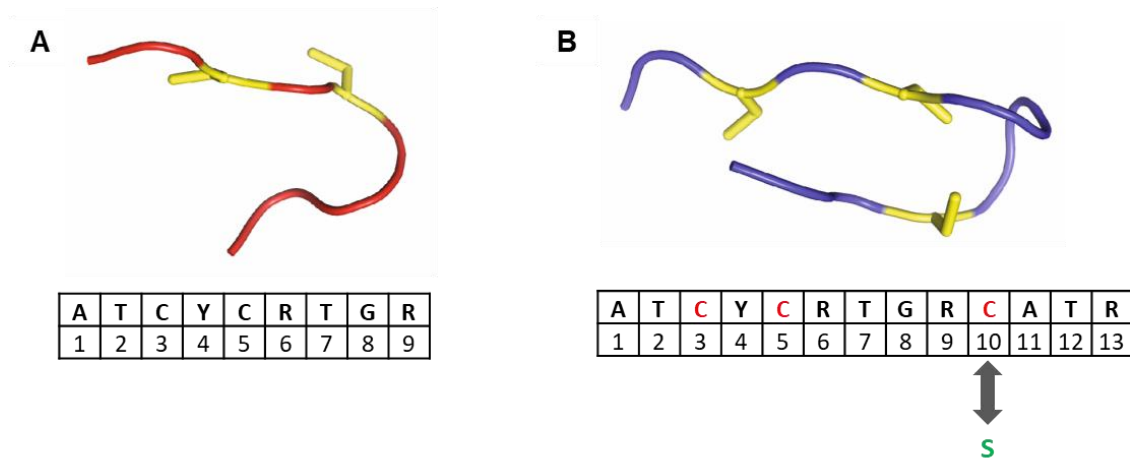
Um potentiell konservierte antiviral wirksame Domänen zu identifizieren, wurde die primäre Aminosäuresequenz von HD5 mit den korrespondierenden Bruchstücken verglichen (Abbildung 22). Ein Muster ließ sich weder in Bezug auf die Gesamtladung noch in Bezug auf die einzelnen Aminosäuren oder die wahrscheinlichste Sekundärstruktur erkennen. Es ist zudem nicht auszuschließen, dass sich in dem Volllängenpeptid mehrere unabhängige wirksame Domänen befinden.



**Abbildung 22: Überblick HD5 mit jeweiligen Bruchstücken**

Übersicht der Aminosäuresequenz von HD5 und allen korrespondierenden Fragmenten. Schwarz: keine antivirale Aktivität vorhanden; rot: antivirale Aktivität vorhanden, Toxizität nachgewiesen; grün: antivirale Aktivität vorhanden, keine Toxizität bis 150 µM nachgewiesen. Aminosäuren: A=Alanin, T=Threonin, C=Cystein, Y=Tyrosin, R=Arginin, G=Glycin, E=Glutaminsäure, S=Serin, L=Leucin, V=Valin, I=Isoleucin. Großbuchstaben: L-Aminosäuren, Kleinbuchstaben: D-Aminosäuren. Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

Auffallend ist, dass das Peptid HD5 (1-13) im Gegensatz zu HD5 (1-9) keine antivirale Aktivität besitzt, obwohl es zum größten Teil aus den gleichen Aminosäuren besteht. Möglich ist, dass HD5 (1-9) linear vorliegt, während bei HD5 (1-13) das Cystein an Position 10 eine Disulfidbrücke mit einem der Cysteine an Position 3 oder 5 ausbildet (Abbildung 23). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde mit dem Ziel, die Bildung einer Disulfidbrücke innerhalb des Peptids zu unterbinden, das Cystein an Position 10 durch Serin ersetzt. Tatsächlich führt die Behandlung mit HD5 (1-13) [C10S] im Gegensatz zu HD5 (1-13) zu einer signifikanten Verminderung der Infektionsrate ab 75 µM (Abbildung 15). Die Ausbildung einer intrachenenaren Disulfidbrücke scheint bei HD5 (1-13) also den Zugang zu den spezifisch antiviral wirksamen Aminosäuren zu verhindern. Außerdem belegt dieses Experiment, dass die antivirale Aktivität der Peptide durch den Austausch einzelner Aminosäuren grundsätzlich verbessert werden kann. Eine Testung der Toxizität der modifizierten Bruchstücke ist noch ausstehend und sollte zur verlässlichen Interpretation der Daten erfolgen.



### Abbildung 23: Loop HD5 (1-13)

Hypothese: HD5 (1-9) (**A**) liegt linear vor, bei HD5 (1-13) (**B**) bildet Cystein an Position 10 eine Disulfidbrücke mit Cystein an Position 3 oder 5 aus und verhindert dadurch den Zugang zu den antiviral wirksamen Aminosäuren. Aminosäuren: A=Alanin, T=Threonin, C=Cystein, Y=Tyrosin, R=Arginin, G=Glycin. Strukturen wurden erstellt mit PEP-FOLD 3 (Lamiabile et al., 2016). Diese Daten wurden bereits veröffentlicht (Böffert et al., 2020).

Peptide stellen aufgrund des schnellen Abbaus und der Gefahr der immunogenen Wirkung eine Herausforderung für die medikamentöse Verabreichung dar. In den letzten Jahren wurden jedoch auch die Vorteile wie z.B. die hohe Spezifität vieler Peptide hervorgehoben und es wurden vermehrt Peptide als Wirkstoffe zugelassen (Kaspar and Reichert, 2013). Alternativ könnte das Peptid nach einer genaueren Identifikation der antiviral wirksamen Domänen in ein Peptidmimetikum mit verbesserten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften umgewandelt werden (Vagner et al., 2008).

#### **4.4 HD5 (1-9) interagiert direkt mit der Zelle und inhibiert die Adsorption der viralen Partikel**

Wie in der Einleitung ausgeführt, gibt es für Defensine bekannte Mechanismen, die entweder auf einer Interaktion der Peptide mit den viralen Partikeln oder auf einer Interaktion der Peptide mit den Zellen beruhen können (Wilson et al., 2013). Die Ergebnisse der Präinkubations-Assays und der *Time of Addition*-Assays sprechen dafür, dass HD5 (1-9) direkt mit den Zielzellen interagiert. Eine Präinkubation von Virus und Peptid führt nicht zu einer verbesserten Infektionshemmung (Abbildung 17). Auch die Präinkubation von Virus und Peptid bei 100 µM führt auf den Zellen auf 10 µM Endkonzentration verdünnt nicht zu einer Inhibition der Infektion. Bei einer direkten Interaktion von Virus und Peptid bereits vor der Zugabe auf die Zellen, müsste die Infektion auch nach der Verdünnung inhibiert werden. Im Gegensatz dazu führt eine dreistündige Präinkubation von HD5 (1-9) mit den Zellen zu einer verbesserten Infektionshemmung, während die Infektionshemmung bei einer Zugabe des Peptids 3 h nach Infektion deutlich abgeschwächt ist (Abbildung 18). Um diese Hypothese zu untermauern, könnte man in einer weiteren Kondition das Peptid nach der dreistündigen Inkubation mit den Zellen vor der Infektion wieder von den Zellen nehmen. Auch könnte man in einer weiteren Untersuchung HD5 (1-9) biotinylieren und beobachten, ob das Biotin an den zellulären Interaktionspartner abgegeben wird. Es wurde ein Versuch unternommen, HD5 (1-9) mit einem Fluoreszenz-Tag zu versehen, um die Interaktionen mikroskopisch genauer

verfolgen zu können. Das Derivat Cy5-HD5 (1-9) zeigte in Vorversuchen jedoch zelltoxische Eigenschaften (Abbildung 16) und konnte nicht für weitere Versuche genutzt werden. Alle erzielten Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Interaktion des Peptides mit den Zellen und weisen darauf hin, dass die Infektion bereits zu einem frühen Zeitpunkt geblockt wird. In den durchgeführten *in vitro* Experimenten wurde zwar ausschließlich die zellfreie Virusübertragung untersucht, eine Interaktion von Peptid und Zellen könnte jedoch auch bei einer zellassozierten Übertragung *in vivo* von Vorteil sein (Digel et al., 2006), da kein extrazellulärer Kontakt zwischen Peptid und Virus notwendig ist. Zudem verringert sich durch die Interaktion von Peptid und Zelle das Risiko der Resistenzentwicklung, die vor allem bei antiviralen Substanzen auftreten, die direkt ein virales Protein inhibieren (Göhring et al., 2013; Fischer et al., 2016).

Der Einsatz des dual fluoreszierenden Virus TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP-UL100mCherry erlaubt die Unterscheidung zwischen viralen Partikeln, die an die Zellmembran angeheftet sind und Partikeln, deren Kapsid bereits in die Zielzelle eingeschleust wurde (Sampaio et al., 2013). Angeheftete Partikel besitzen noch ihre Hüllmembran und erscheinen dadurch gelb, Kapside innerhalb der Zielzelle erscheinen grün. Vereinzelt sieht man auch rote Partikel, bei denen es sich vermutlich um *dense bodies*, behüllte Partikel ohne Kapside, handelt. Im Gegensatz zu den Positivkontrollen mit 0,01 % HAc in H<sub>2</sub>O und HD5 (1-9) [R6A, R9A] zeigen sich bei der Behandlung mit HD5 (1-9) weder adsorbierte (gelbe) noch penetrierte (grüne) Partikel im Sichtfeld um eine Zelle herum (Abbildung 19). In einem Wiederholungsexperiment mit einer höheren MOI konnte Ramona Businger die Reduktion der adsorbierten sowie penetrierten Partikel durch die Behandlung mit HD5 (1-9) bestätigen und zeigen, dass der Effekt aufgehoben werden kann, wenn das Peptid erst drei Stunden nach Infektion zugegeben wird (Abbildung 20). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass das Peptid die Adsorption der Viruspartikel an die Zellmembran unterbindet. In Verbindung mit der Beobachtung, dass die positive Gesamtladung des Peptids wichtig für dessen antivirale Aktivität ist, könnte dieses Ergebnis darauf hindeuten, dass HD5 (1-9) an eine negativ geladene Struktur der Zielzellen bindet und somit die initiale Bindung von Virus und Zielzelle verhindert. Da es sich bei allen derzeitigen

Medikamenten um Hemmer der viralen Replikation handelt (Foolad et al., 2018), wäre eine Substanz, die den Eintritt der viralen Partikel in die Zelle unterbindet, ein vielversprechender neuer Ansatz. Dass das Peptid die Zielzelle nicht penetrieren muss, um es vor einer möglichen Infektion zu schützen, wäre dabei ein weiterer Vorteil.

#### **4.5 HD5 (1-9) hat bis zu einer Konzentration von 75 $\mu\text{M}$ keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung von Zebrafischen**

Mit den Untersuchungen an Zebrafischen wurde den Experimenten in Zellkultur ein erstes *in vivo* Experiment angeschlossen, das untersuchen sollte, inwiefern die Entwicklung von Zebrafischen durch das Peptid beeinflusst wird. Während die Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  und 75  $\mu\text{M}$  keinen Einfluss auf die phänotypische Entwicklung haben, zeigen die Embryonen, die mit Peptid in Konzentrationen ab 125  $\mu\text{M}$  behandelt wurden, Verzögerungen der Entwicklung sowie letale Verläufe (Abbildung 21). Der Versuch, in dem das Peptid bereits 30 min nach Fertilisation zugegeben wurde, legt nahe, dass Zebrafische in den frühen Entwicklungsstadien sensibler auf die Exposition mit Peptid reagieren. Grundsätzlich lässt sich die Entwicklung der Zebrafische mit der menschlichen Embryonalentwicklung nicht uneingeschränkt vergleichen. Die Organogenese ist jedoch bei Zebrafischen fünf Tage nach Fertilisation abgeschlossen (Zhang et al., 2003), bei menschlichen Embryonen geschieht sie im ersten Trimenon (Kirsch, 2010). Es wäre demnach interessant, in weitergehenden Untersuchungen zu überprüfen, wie die Embryonalentwicklung verläuft, wenn die Zebrafische erst nach Abschluss der Organogenese mit den hohen Peptidkonzentrationen exponiert werden.

#### **4.6 Ausblick**

Zunächst wurde von Vincent Truffault und Natalia Ruetalo Buschinger die Struktur von HD5 (1-9) mittels NMR-Spektroskopie genauer bestimmt, darüber könnten genauere Informationen über die wirksamen Domänen gewonnen und das Fragment weiter optimiert werden. Auch für das Volllängenpeptid HD5 ist

eine solche Analyse in der Literatur bereits beschrieben (Wommack et al., 2012). In der Zellkultur wäre es wichtig, zu beobachten, ob sich bei Langzeitexposition Hinweise auf Resistenzphänomene beobachten lassen. Da zum jetzigen Zeitpunkt keine Daten zur systemischen Kinetik bei Verabreichung des Peptids vorliegen, werden zunächst keine *in vivo* Untersuchungen mit Mäusen angestrebt. Dennoch konnte bereits gezeigt werden, dass die orale Verabreichung von HD5 (1-9) von Mäusen *in vivo* gut toleriert wird (Ehmann et al., 2019). Vielversprechend ist auch eine Testung von HD5 (1-9) auf seine antivirale Aktivität gegen andere Viren wie HSV. Sollte sich aus den hohen erforderlichen Konzentrationen oder einer fruchtschädigenden Wirkung eine Einschränkung für die systemische Anwendung bzw. die Anwendung in der Schwangerschaft ergeben, wäre dies bei einer topischen Anwendung bei HSV weniger limitierend.

#### **4.7 Schlussfolgerung**

Das Ziel dieser Arbeit war, Defensinfragmente als Leitstrukturen für eine neuartige antivirale Therapie gegen HCMV-Infektionen zu etablieren. Mit HD5 (1-9) wurde ein Peptidbruchstück identifiziert, das ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  antivirale Aktivität zeigt und bis zu einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  keine zelltoxischen Effekte aufweist. Neben der Infektion mit einem laboradaptierten Virusstamm kann HD5 (1-9) auch die Infektion mit klinischen HCMV-Isolaten hemmen. Mechanistische Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Peptid mit den Zellen interagiert und die Adsorption der Viruspartikel an die Zielzellen unterbindet. Experimente mit Zebrafischen zeigen, dass HD5 (1-9) bis zu einer Konzentration von 75  $\mu\text{M}$  keinen schädigenden Effekt auf die Embryonalentwicklung hat. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dienen zunächst als *proof of concept*. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits der Austausch einzelner Aminosäuren zu einer deutlichen Verstärkung der antiviralen Aktivität führen kann. In weitergehenden Untersuchungen sollen mit dem Ziel der Peptidoptimierung die antiviral wirksamen Domänen genauer bestimmt werden und HD5 (1-9) soll auf seine antivirale Aktivität gegen andere Viren getestet werden.

## 5 Zusammenfassung

HCMV ist weltweit die häufigste Ursache für kongenitale Infektionen und kann zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen bei Neugeborenen führen. Die zur Verfügung stehenden antiviralen Medikamente haben schwere Nebenwirkungen und führen häufig zu Resistenzen. Defensine sind von körpereigenen Zellen produzierte Peptide, die ein breites antimikrobielles Spektrum haben. Unser Ansatz beruht auf der Beobachtung, dass bei der proteolytischen Spaltung von Defensinen Fragmente entstehen, die immer noch antimikrobielle Aktivität besitzen. Das Ziel dieser Arbeit war es, Peptide zu identifizieren, die *in vitro* antiviral aktiv gegen HCMV sind, ohne dabei zytotoxisch zu wirken. Ein Set von Peptiden wurde auf unterschiedlichen Zellarten auf seine antivirale Aktivität und in verschiedenen Assays auf Toxizität untersucht. Das vielversprechendste Peptid wurde weitergehend auf seine antivirale Aktivität gegen klinische HCMV-Isolate getestet. Um Hypothesen zum Wirkmechanismus zu erarbeiten, wurden einzelne Aminosäuren des Fragments ausgetauscht, zudem wurden Präinkubations-Assays, *Time of Addition*-Assays und Untersuchungen mit einem dual fluoreszierenden Virus durchgeführt. In zusätzlichen Experimenten wurde das Peptid in Zebrafischen auf Toxizität untersucht. Mit HD5 (1-9) wurde ein Peptidbruchstück gefunden, das in der Zellkultur ab 50  $\mu\text{M}$  antivirale Aktivität gegen einen laboradaptierten HCMV-Stamm sowie gegen klinische HCMV-Isolate hat und bis zu einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  keine Toxizität in der Zellkultur zeigt. Bis zu einer Konzentration von 75  $\mu\text{M}$  hat das Peptid keinen schädigenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung von Zebrafischen. Arginine und Cysteine wurden als die für den antiviralen Effekt entscheidenden Aminosäuren identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass durch eine direkte Interaktion zwischen Peptid und Zelle vermutlich die Anheftung der viralen Partikel an die Zielzelle unterbunden wird. Insgesamt sind Defensin-abgeleitete Peptide als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer antiviraler Medikamente gegen HCMV-Infektionen ein vielversprechender neuer Ansatz.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abate, D. A., Watanabe, S. & Mocarski, E. S. 2004. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol*, 78(20), pp 10995-1006.
- Abou Alaiwa, M. H., Reznikov, L. R., Gansemer, N. D., Sheets, K. A., Horswill, A. R., Stoltz, D. A., Zabner, J. & Welsh, M. J. 2014. pH modulates the activity and synergism of the airway surface liquid antimicrobials beta-defensin-3 and LL-37. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(52), pp 18703-8.
- Bastian, A. & Schafer, H. 2001. Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul Pept*, 101(1-3), pp 157-61.
- Befus, A. D., Mowat, C., Gilchrist, M., Hu, J., Solomon, S. & Bateman, A. 1999. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol*, 163(2), pp 947-53.
- Berridge, M. V. & Tan, A. S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303(2), pp 474-82.
- Bodaghi, B., Slobbe-van Drunen, M. E., Topilko, A., Perret, E., Vossen, R. C., van Dam-Mieras, M. C., Zipeto, D., Virelizier, J. L., LeHoang, P., Bruggeman, C. A. & Michelson, S. 1999. Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(11), pp 2598-607.
- Böffert, R., Businger, R., Preiss, H., Ehmman, D., Truffault, V., Simon, C., Ruetalo, N., Hamprecht, K., Müller, P., Wehkamp, J. & Schindler, M. 2020. The human alpha-defensin-derived peptide HD5(1-9) inhibits cellular attachment and entry of human cytomegalovirus. *Antiviral Res*, 177:104779.
- Bonalumi, S., Trapanese, A., Santamaria, A., D'Emidio, L. & Mobili, L. 2011. Cytomegalovirus infection in pregnancy: review of the literature. *J Prenat Med*, 5(1), pp 1-8.
- Boppana, S. & Fowler, K. 2007. HCMV: persistence in the population: epidemiology and transmission. In: Arvin, A. & Whitley, R. (eds.) *Human Herpesviruses Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. New York: Cambridge University Press.



- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), pp 1532-5.
- Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*, 5(8), pp 577-82.
- Britt, W. 2007. HCMV: pathogenesis and disease consequences. In: Arvin, A. & Whitley, R. (eds.) *Human Herpesviruses Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. New York: Cambridge University Press.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3(3), pp 238-50.
- Buck, C. B., Day, P. M., Thompson, C. D., Lubkowski, J., Lu, W., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. 2006. Human alpha-defensins block papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(5), pp 1516-21.
- Businger, R. 2018. *Subversion of immune cells by HCMV and HIV-1*. Dr. rer. nat., Eberhard Karls Universität.
- Campopiano, D. J., Clarke, D. J., Polfer, N. C., Barran, P. E., Langley, R. J., Govan, J. R., Maxwell, A. & Dorin, J. R. 2004. Structure-activity relationships in defensin dimers: a novel link between beta-defensin tertiary structure and antimicrobial activity. *J Biol Chem*, 279(47), pp 48671-9.
- Cannon, M. J., Schmid, D. S. & Hyde, T. B. 2010. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*, 20(4), pp 202-13.
- Charp, P. A., Rice, W. G., Raynor, R. L., Reimund, E., Kinkade, J. M., Jr., Ganz, T., Selsted, M. E., Lehrer, R. I. & Kuo, J. F. 1988. Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils. *Biochem Pharmacol*, 37(5), pp 951-6.
- Chertov, O., Michiel, D. F., Xu, L., Wang, J. M., Tani, K., Murphy, W. J., Longo, D. L., Taub, D. D. & Oppenheim, J. J. 1996. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*, 271(6), pp 2935-40.
- Chong, K. T., Thangavel, R. R. & Tang, X. 2008. Enhanced expression of murine beta-defensins (MBD-1, -2, -3, and -4) in upper and lower airway mucosa of influenza virus infected mice. *Virology*, 380(1), pp 136-43.
- Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S. P., Castillo, P. A., de Jong, M. F., Winter, M. G., Winter, S. E., Wehkamp, J., Shen, B., Salzman, N. H.,

- Underwood, M. A., Tsolis, R. M., Young, G. M., Lu, W., Lehrer, R. I., Baumler, A. J. & Bevins, C. L. 2012. Human alpha-defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science*, 337(6093), pp 477-81.
- Compton, T., Nepomuceno, R. R. & Nowlin, D. M. J. V. 1992. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. 191(1), pp 387-395.
- Compton, T., Nowlin, D. M. & Cooper, N. R. 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, 193(2), pp 834-41.
- Crough, T. & Khanna, R. 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), pp 76-98, Table of Contents.
- Crump, C. 2018. Virus Assembly and Egress of HSV. In: Kawaguchi, Y., Mori, Y. & Kimura, H. (eds.) *Human Herpesviruses*. Singapore: Springer.
- Daher, K. A., Selsted, M. E. & Lehrer, R. I. 1986. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol*, 60(3), pp 1068-74.
- Davison, A. J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., McGeoch, D. J. & Hayward, G. S. 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol*, 84(Pt 1), pp 17-28.
- Demirkhanyan, L. H., Marin, M., Padilla-Parra, S., Zhan, C., Miyauchi, K., Jean-Baptiste, M., Novitskiy, G., Lu, W. & Melikyan, G. B. 2012. Multifaceted mechanisms of HIV-1 entry inhibition by human alpha-defensin. *J Biol Chem*, 287(34), pp 28821-38.
- Diemert, S., Dolga, A. M., Tobaben, S., Grohm, J., Pfeifer, S., Oexler, E. & Culmsee, C. 2012. Impedance measurement for real time detection of neuronal cell death. *J Neurosci Methods*, 203(1), pp 69-77.
- Digel, M., Sampaio, K. L., Jahn, G. & Sinzger, C. 2006. Evidence for direct transfer of cytoplasmic material from infected to uninfected cells during cell-associated spread of human cytomegalovirus. *J Clin Virol*, 37(1), pp 10-20.
- Dohner, K. & Sodeik, B. 2005. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 285(67-108).
- Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D. J., McGeoch, D. J., Gatherer, D., Emery, V. C., Griffiths, P. D., Sinzger, C., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W. & Davison,

- A. J. 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 85(Pt 5), pp 1301-12.
- Doss, M., White, M. R., Teclé, T., Gantz, D., Crouch, E. C., Jung, G., Ruchala, P., Waring, A. J., Lehrer, R. I. & Hartshorn, K. L. 2009. Interactions of alpha-, beta-, and theta-defensins with influenza A virus and surfactant protein D. *J Immunol*, 182(12), pp 7878-87.
- Dugan, A. S., Maginnis, M. S., Jordan, J. A., Gasparovic, M. L., Manley, K., Page, R., Williams, G., Porter, E., O'Hara, B. A. & Atwood, W. J. 2008. Human alpha-defensins inhibit BK virus infection by aggregating virions and blocking binding to host cells. *J Biol Chem*, 283(45), pp 31125-32.
- Ehmann, D. 2018. *Identifizierung neuer antimikrobiell aktiver Fragmente durch den proteolytischen Verdau von  $\alpha$ -Defensinen*. Dr. rer. nat. , Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Ehmann, D., Wendler, J., Koeninger, L., Larsen, I. S., Klag, T., Berger, J., Marette, A., Schaller, M., Stange, E. F., Malek, N. P., Jensen, B. A. H. & Wehkamp, J. 2019. Paneth cell alpha-defensins HD-5 and HD-6 display differential degradation into active antimicrobial fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(9), pp 3746-3751.
- Feire, A. L., Koss, H. & Compton, T. 2004. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(43), pp 15470-5.
- Fischer, L., Imrich, E., Sampaio, K. L., Hofmann, J., Jahn, G., Hamprecht, K. & Gohring, K. 2016. Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral Res*, 131(1-8).
- Foolad, F., Aitken, S. L. & Chemaly, R. F. 2018. Letermovir for the prevention of cytomegalovirus infection in adult cytomegalovirus-seropositive hematopoietic stem cell transplant recipients. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 11(10), pp 931-941.
- Fowler, K. B. & Boppana, S. B. 2018. Congenital cytomegalovirus infection. *Semin Perinatol*.
- Fujii, G., Selsted, M. E. & Eisenberg, D. 1993. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci*, 2(8), pp 1301-12.
- Funderburg, N., Lederman, M. M., Feng, Z., Drage, M. G., Jadowsky, J., Harding, C. V., Weinberg, A. & Sieg, S. F. 2007. Human  $\alpha$ -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(47), pp 18631-5.

- Furci, L., Sironi, F., Tolazzi, M., Vassena, L. & Lusso, P. 2007. Alpha-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. *Blood*, 109(7), pp 2928-35.
- Ganz, T. 1987. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*, 55(3), pp 568-71.
- Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3(9), pp 710-20.
- Gardner, T. J. & Tortorella, D. 2016. Virion Glycoprotein-Mediated Immune Evasion by Human Cytomegalovirus: a Sticky Virus Makes a Slick Getaway. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(3), pp 663-77.
- Ghosh, D., Porter, E., Shen, B., Lee, S. K., Wilk, D., Drazba, J., Yadav, S. P., Crabb, J. W., Ganz, T. & Bevins, C. L. 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol*, 3(6), pp 583-90.
- Göhring, K., Wolf, D., Bethge, W., Mikeler, E., Faul, C., Vogel, W., Vohringer, M. C., Jahn, G. & Hamprecht, K. 2013. Dynamics of coexisting HCMV-UL97 and UL54 drug-resistance associated mutations in patients after haematopoietic cell transplantation. *J Clin Virol*, 57(1), pp 43-9.
- Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M. & Wilson, J. M. 1997. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 88(4), pp 553-60.
- Goodrum, F., Caviness, K. & Zagallo, P. 2012. Human cytomegalovirus persistence. *Cell Microbiol*, 14(5), pp 644-55.
- Gounder, A. P., Myers, N. D., Treuting, P. M., Bromme, B. A., Wilson, S. S., Wiens, M. E., Lu, W., Ouellette, A. J., Spindler, K. R., Parks, W. C. & Smith, J. G. 2016. Defensins Potentiate a Neutralizing Antibody Response to Enteric Viral Infection. *PLoS Pathog*, 12(3), pp e1005474.
- Gounder, A. P., Wiens, M. E., Wilson, S. S., Lu, W. & Smith, J. G. 2012. Critical determinants of human alpha-defensin 5 activity against non-enveloped viruses. *J Biol Chem*, 287(29), pp 24554-62.
- Griffiths, P., Baraniak, I. & Reeves, M. 2015. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol*, 235(2), pp 288-97.
- Grigat, J., Soruri, A., Forssmann, U., Riggert, J. & Zwirner, J. 2007. Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *J Immunol*, 179(6), pp 3958-65.

- Gwyer Findlay, E., Currie, S. M. & Davidson, D. J. 2013. Cationic host defence peptides: potential as antiviral therapeutics. *BioDrugs*, 27(5), pp 479-93.
- Hahn, G., Jores, R. & Mocarski, E. S. 1998. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), pp 3937-42.
- Hamprecht, K. & Jahn, G. 2007. [Human cytomegalovirus and congenital virus infection]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 50(11), pp 1379-92.
- Hazrati, E., Galen, B., Lu, W., Wang, W., Ouyang, Y., Keller, M. J., Lehrer, R. I. & Herold, B. C. 2006. Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol*, 177(12), pp 8658-66.
- He, J. H., Gao, J. M., Huang, C. J. & Li, C. Q. 2014. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicol Teratol*, 42(35-42).
- Hill, C. P., Yee, J., Selsted, M. E. & Eisenberg, D. 1991. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*, 251(5000), pp 1481-5.
- Holly, M. K., Diaz, K. & Smith, J. G. 2017. Defensins in Viral Infection and Pathogenesis. *Annu Rev Virol*, 4(1), pp 369-391.
- Honess, R. W. & Roizman, B. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol*, 14(1), pp 8-19.
- Ibanez, C. E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C. & Nelson, J. A. 1991. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol*, 65(12), pp 6581-8.
- Jarczak, J., Kosciuczuk, E. M., Lisowski, P., Strzalkowska, N., Jozwik, A., Horbanczuk, J., Krzyzewski, J., Zwierzchowski, L. & Bagnicka, E. 2013. Defensins: natural component of human innate immunity. *Hum Immunol*, 74(9), pp 1069-79.
- Jean Beltran, P. M. & Cristea, I. M. 2014. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 11(6), pp 697-711.
- Kabanova, A., Marcandalli, J., Zhou, T., Bianchi, S., Baxa, U., Tsybovsky, Y., Lilleri, D., Silacci-Fregni, C., Foglierini, M., Fernandez-Rodriguez, B. M., Druz, A., Zhang, B., Geiger, R., Pagani, M., Sallusto, F., Kwong, P. D., Corti, D., Lanzavecchia, A. & Perez, L. 2016. Platelet-derived growth

factor-alpha receptor is the cellular receptor for human cytomegalovirus gHgLgO trimer. *Nat Microbiol*, 1(8), pp 16082.

- Kagan, K. O., Enders, M., Schampera, M. S., Baeumel, E., Hoopmann, M., Geipel, A., Berg, C., Goelz, R., De Catte, L., Wallwiener, D., Brucker, S., Adler, S. P., Jahn, G. & Hamprecht, K. 2019. Prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus after primary maternal infection in the first trimester by biweekly hyperimmunoglobulin administration. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 53(3), pp 383-389.
- Kalejta, R. F. 2008. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(2), pp 249-65, table of contents.
- Kaspar, A. A. & Reichert, J. M. 2013. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discov Today*, 18(17-18), pp 807-17.
- Kaye, J., Browne, H., Stoffel, M. & Minson, T. 1992. The UL16 gene of human cytomegalovirus encodes a glycoprotein that is dispensable for growth in vitro. *J Virol*, 66(11), pp 6609-15.
- Ke, N., Wang, X., Xu, X. & Abassi, Y. A. 2011. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol*, 740(33-43).
- Khalil, A., Heath, P., Jones, C., Soe, A. & Ville, Y. G. 2018. Congenital Cytomegalovirus Infection: Update on Treatment: Scientific Impact Paper No. 56. *Bjog*, 125(1), pp e1-e11.
- Kirsch, J. 2010. Embryologie - Grundlagen. In: Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spanel-Borowski, K., Wolff, W., Wurzinger, L. J. & Zilch, H.-G. (eds.) *Duale Reihe Anatomie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Klotman, M. E. & Chang, T. L. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*, 6(6), pp 447-56.
- Lamiable, A., Thevenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P. & Tuffery, P. 2016. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res*, 44(W1), pp W449-54.
- Lehrer, R. I. 2011. Immunology: Peptide gets in shape for self-defence. *Nature*, 469(7330), pp 309-10.
- Lehrer, R. I., Jung, G., Ruchala, P., Andre, S., Gabius, H. J. & Lu, W. 2009. Multivalent binding of carbohydrates by the human alpha-defensin, HD5. *J Immunol*, 183(1), pp 480-90.

- Lehrer, R. I. & Lu, W. 2012. alpha-Defensins in human innate immunity. *Immunol Rev*, 245(1), pp 84-112.
- Li, G. & Kamil, J. P. 2015. Viral Regulation of Cell Tropism in Human Cytomegalovirus. 90(2), pp 626-9.
- Liu, L. & Ganz, T. 1995. The pro region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting. *Blood*, 85(4), pp 1095-103.
- Manicklal, S., Emery, V. C., Lazzarotto, T., Boppana, S. B. & Gupta, R. K. 2013. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*, 26(1), pp 86-102.
- Marty, F. M., Ljungman, P., Chemaly, R. F., Maertens, J., Dadwal, S. S., Duarte, R. F., Haider, S., Ullmann, A. J., Katayama, Y., Brown, J., Mullane, K. M., Boeckh, M., Blumberg, E. A., Einsele, H., Snyderman, D. R., Kanda, Y., DiNubile, M. J., Teal, V. L., Wan, H., Murata, Y., Kartsonis, N. A., Leavitt, R. Y. & Badshah, C. 2017. Letemovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*, 377(25), pp 2433-2444.
- Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P. & Sinclair, J. 1996. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 12)(3099-102).
- Mertens, T., Haller, O. & Klenk, H.-D. 2004. *Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten*, München: Elsevier.
- Milde-Busch, A. 2014. Zytomegalievirus-Infektionen. *RKI-Ratgeber*.
- Miller, M. S. & Hertel, L. 2009. Onset of human cytomegalovirus replication in fibroblasts requires the presence of an intact vimentin cytoskeleton. *J Virol*, 83(14), pp 7015-28.
- Nakashima, H., Yamamoto, N., Masuda, M. & Fujii, N. 1993. Defensins inhibit HIV replication in vitro. *Aids*, 7(8), pp 1129.
- Nguyen, E. K., Nemerow, G. R. & Smith, J. G. 2010. Direct evidence from single-cell analysis that human alpha-defensins block adenovirus uncoating to neutralize infection. *J Virol*, 84(8), pp 4041-9.
- Nikitina, E., Larionova, I., Choinzonov, E. & Kzhyshkowska, J. J. I. j. o. m. s. 2018. Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs. 19(9), pp 2821.

- Nishimura, M. & Mori, Y. 2018. Structural Aspects of Betaherpesvirus-Encoded Proteins. *In: Kawaguchi, Y., Mori, Y. & Kimura, H. (eds.) Human Herpesviruses*. Singapore: Springer.
- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S. & Sata, T. 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol*, 77(15), pp 8541-7.
- Papayannopoulos, V. 2018. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, 18(2), pp 134-147.
- Park, M. S., Kim, J. I., Lee, I., Park, S., Bae, J. Y. & Park, M. S. 2018. Towards the Application of Human Defensins as Antivirals. *Biomol Ther (Seoul)*.
- Pazgier, M., Wei, G., Ericksen, B., Jung, G., Wu, Z., de Leeuw, E., Yuan, W., Szmecinski, H., Lu, W. Y., Lubkowski, J., Lehrer, R. I. & Lu, W. 2012. Sometimes it takes two to tango: contributions of dimerization to functions of human alpha-defensin HNP1 peptide. *J Biol Chem*, 287(12), pp 8944-53.
- Preisetanz, S. 2012. *Vergleich zellfreier und zellassoziierter HCMV-Mikroneutralisations-Testsysteme: Fibroblasten versus Epithelzellen*. master thesis, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Proud, D., Sanders, S. P. & Wiehler, S. 2004. Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both in vitro and in vivo. *J Immunol*, 172(7), pp 4637-45.
- Quayle, A. J., Porter, E. M., Nussbaum, A. A., Wang, Y. M., Brabec, C., Yip, K. P. & Mok, S. C. 1998. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol*, 152(5), pp 1247-58.
- Radsak, K. D., Brucher, K. H. & Georgatos, S. D. 1991. Focal nuclear envelope lesions and specific nuclear lamin A/C dephosphorylation during infection with human cytomegalovirus. *Eur J Cell Biol*, 54(2), pp 299-304.
- Ritter, M., Schmidt, T., Dirks, J., Hennes, P., Juhasz-Boss, I., Solomayer, E. F., Gortner, L., Gartner, B., Rohrer, T., Sester, U. & Sester, M. 2013. Cytomegalovirus-specific T cells are detectable in early childhood and allow assignment of the infection status in children with passive maternal antibodies. *Eur J Immunol*, 43(4), pp 1099-108.
- Rohrl, J., Yang, D., Oppenheim, J. J. & Hehlhans, T. 2010. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J Immunol*, 184(12), pp 6688-94.



- Ross, S. A., Fowler, K. B., Ashrith, G., Stagno, S., Britt, W. J., Pass, R. F. & Boppana, S. B. 2006. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr*, 148(3), pp 332-6.
- Ryckman, B. J., Jarvis, M. A., Drummond, D. D., Nelson, J. A. & Johnson, D. C. J. J. o. v. 2006. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. 80(2), pp 710-722.
- Salvatore, M., Garcia-Sastre, A., Ruchala, P., Lehrer, R. I., Chang, T. & Klotman, M. E. 2007. alpha-Defensin inhibits influenza virus replication by cell-mediated mechanism(s). *J Infect Dis*, 196(6), pp 835-43.
- Sampaio, K. L., Jahn, G. & Sinzger, C. 2013. Applications for a dual fluorescent human cytomegalovirus in the analysis of viral entry. *Methods Mol Biol*, 1064(201-9).
- Schampera, M. S., Schweinzer, K., Abele, H., Kagan, K. O., Klein, R., Rettig, I., Jahn, G. & Hamprecht, K. 2017. Comparison of cytomegalovirus (CMV)-specific neutralization capacity of hyperimmunoglobulin (HIG) versus standard intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations: Impact of CMV IgG normalization. *J Clin Virol*, 90(40-45).
- Schauflinger, M., Villinger, C., Mertens, T., Walther, P. & von Einem, J. 2013. Analysis of human cytomegalovirus secondary envelopment by advanced electron microscopy. *Cell Microbiol*, 15(2), pp 305-14.
- Schottstedt, V., Aepfelbacher, M., Bauerfeind, U., Bekeredjian-Ding, I., Blümel, J., Burger, R., Funk, M., Gröner, A., Gürtler, L., Heiden, M., Hildebrandt, M., Jansen, B., Offergeld, R., Pauli, G., Schlenkrich, U., Seitz, R., Stahl, D., Strobel, J. & Willkommen, H. 2017. Humanes Cytomegalievirus (HCMV),
- Schroeder, B. O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E. F. & Wehkamp, J. 2011. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature*, 469(7330), pp 419-23.
- Seidel, A., Ye, Y., de Armas, L. R., Soto, M., Yarosh, W., Marcisin, R. A., Tran, D., Selsted, M. E. & Camerini, D. 2010. Cyclic and acyclic defensins inhibit human immunodeficiency virus type-1 replication by different mechanisms. *PLoS One*, 5(3), pp e9737.
- Shafee, T. M., Lay, F. T., Hulett, M. D. & Anderson, M. A. 2016. The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. *Mol Biol Evol*, 33(9), pp 2345-56.

- Shafee, T. M., Lay, F. T., Phan, T. K., Anderson, M. A. & Hulett, M. D. 2017. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cell Mol Life Sci*, 74(4), pp 663-682.
- Shane Smith, M., Streblow, D. N., Caposio, P. & Nelson, J. A. 2013. Humanized Mouse Models of Cytomegalovirus Pathogenesis and Latency. In: Reddehase, M. J. (ed.) *Cytomegaloviruses From Molecular Pathogenesis to Intervention*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Sinclair, J. 2010. Chromatin structure regulates human cytomegalovirus gene expression during latency, reactivation and lytic infection. *Biochim Biophys Acta*, 1799(3-4), pp 286-95.
- Sinzger, C. 2008. Entry route of HCMV into endothelial cells. *J Clin Virol*, 41(3), pp 174-9.
- Sinzger, C., Digel, M. & Jahn, G. 2008. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325(63-83).
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S., The, T. H. & Jahn, G. 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol*, 76 (Pt 4)(741-50).
- Sinzger, C., Schmidt, K., Knapp, J., Kahl, M., Beck, R., Waldman, J., Hebart, H., Einsele, H. & Jahn, G. 1999. Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *J Gen Virol*, 80 (Pt 11)(2867-77).
- Smith, J. G. & Nemerow, G. R. 2008. Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins. *Cell Host Microbe*, 3(1), pp 11-9.
- Soruri, A., Grigat, J., Forssmann, U., Riggert, J. & Zwirner, J. 2007. beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *Eur J Immunol*, 37(9), pp 2474-86.
- Stefanowicz-Hajduk, J., Adamska, A., Bartoszewski, R. & Ochocka, J. R. 2016. Reuse of E-plate cell sensor arrays in the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. *Biotechniques*, 61(3), pp 117-22.
- Stegmann, C., Hochdorfer, D., Lieber, D., Subramanian, N., Stohr, D., Laib Sampaio, K. & Sinzger, C. 2017. A derivative of platelet-derived growth factor receptor alpha binds to the trimer of human cytomegalovirus and inhibits entry into fibroblasts and endothelial cells. *PLoS Pathog*, 13(4), pp e1006273.

- Stinski, M. F. 1978. Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J Virol*, 26(3), pp 686-701.
- Streblow, D. N., Varnum, S. M., Smith, R. D., Nelson, J. A. J. C. m. b. & immunology. Caister Academic Press, W., Norfolk, United Kingdom 2006. A proteomics analysis of human cytomegalovirus particles. 91-110.
- Tan, B. H., Meinken, C., Bastian, M., Bruns, H., Legaspi, A., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Bloom, B. R., Ganz, T., Modlin, R. L. & Stenger, S. 2006. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol*, 177(3), pp 1864-71.
- Teclé, T., White, M. R., Gantz, D., Crouch, E. C. & Hartshorn, K. L. 2007. Human neutrophil defensins increase neutrophil uptake of influenza A virus and bacteria and modify virus-induced respiratory burst responses. *J Immunol*, 178(12), pp 8046-52.
- Vagner, J., Qu, H. & Hruby, V. J. 2008. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 12(3), pp 292-6.
- Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Pasatolic, L., Wang, D., Camp, D. G., 2nd, Rodland, K., Wiley, S., Britt, W., Shenk, T., Smith, R. D. & Nelson, J. A. 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*, 78(20), pp 10960-6.
- Wang, X., Huong, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N. & Huang, E. S. 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*, 424(6947), pp 456-61.
- White, S. H., Wimley, W. C. & Selsted, M. E. 1995. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol*, 5(4), pp 521-7.
- Wille, P. T., Wisner, T. W., Ryckman, B. & Johnson, D. C. 2013. Human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein gB promotes virus entry in trans acting as the viral fusion protein rather than as a receptor-binding protein. *MBio*, 4(3), pp e00332-13.
- Wilson, S. S., Wiens, M. E. & Smith, J. G. 2013. Antiviral mechanisms of human defensins. *J Mol Biol*, 425(24), pp 4965-80.
- Wimley, W. C., Selsted, M. E. & White, S. H. 1994. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci*, 3(9), pp 1362-73.
- Wommack, A. J., Robson, S. A., Wanniarachchi, Y. A., Wan, A., Turner, C. J., Wagner, G. & Nolan, E. M. 2012. NMR solution structure and condition-

- dependent oligomerization of the antimicrobial peptide human defensin 5. *Biochemistry*, 51(48), pp 9624-37.
- Wroblewska, Z., Wellish, M. C., Wolinsky, J. S. & Gilden, D. 1981. Comparison of human cytomegalovirus growth in MRC-5 human fibroblasts, brain, and choroid plexus cells in vitro. *J Med Virol*, 8(4), pp 245-56.
- Yamada, S., Katano, H., Sato, Y., Fukuchi, S., Hashimoto, K. & Inoue, N. 2016. An Ex vivo culture model for placental cytomegalovirus infection using slices of Guinea pig placental tissue. *Placenta*, 37(85-8).
- Yamane, Y., Furukawa, T. & Plotkin, S. A. 1983. Supernatant virus release as a differentiating marker between low passage and vaccine strains of human cytomegalovirus. *Vaccine*, 1(1), pp 23-5.
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W. & Oppenheim, J. J. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol*, 23(6), pp 291-6.
- Zhang, C., Willett, C. & Fremgen, T. 2003. Zebrafish: an animal model for toxicological studies. *Curr Protoc Toxicol*, Chapter 1(Unit 1.7).
- Zhuravskaya, T., Maciejewski, J. P., Netski, D. M., Bruening, E., Mackintosh, F. R. & St Jeor, S. 1997. Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: model of HCMV latency. *Blood*, 90(6), pp 2482-91.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten in Tübingen unter Betreuung von Prof. Michael Schindler durchgeführt.

Die Konzeption erfolgte durch Prof. Michael Schindler und Prof. Jan Wehkamp. Die Experimente habe ich bis auf das Wiederholungsexperiment mit dem dual fluoreszierenden Virus, die Experimente mit Zebrafischen und die NMR-Massenspektrometrie unter Betreuung von Prof. Michael Schindler und Dr. Ramona Businger eigenständig durchgeführt und ausgewertet. Das Wiederholungsexperiment mit dem dual fluoreszierenden Virus wurde von Dr. Ramona Businger vom Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten in Tübingen durchgeführt und ausgewertet. Die Experimente mit Zebrafischen wurden von Hannes Preiss und Dr. Patrick Müller vom Friedrich-Miescher-Laboratorium am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen durchgeführt und ausgewertet. Die NMR-Massenspektrometrie wurde von Dr. Vincent Truffault vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen und Dr. Natalia Ruetalo Buschinger vom Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten in Tübingen durchgeführt und ausgewertet. Die Ideen zur Erstellung der Peptidderivate entstanden in Zusammenarbeit mit Dr. Claudia Simon aus dem Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten in Tübingen.

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

Für die Peptidsequenz HD5 (1-9) wurde ein Patent eingereicht (Name: *Peptides for use in therapy or prophylaxis of Herpesviridae-infections*, Referenznummer: 10 2019 112 244.9, eingereicht am 10.05.2019).

Tübingen, den 09.05.2020

## 8 Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikationsschrift veröffentlicht:

Böffert, R., Businger, R., Preiss, H., Ehmann, D., Truffault, V., Simon, C., Ruetalo, N., Hamprecht, K., Müller, P., Wehkamp, J. & Schindler, M. 2020. The human alpha-defensin-derived peptide HD5(1-9) inhibits cellular attachment and entry of human cytomegalovirus. *Antiviral Res*, 177:104779.

### **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Zunächst danke ich Prof. Michael Schindler für die von Anfang an herausragende Betreuung meiner Arbeit. Danke für die stete Unterstützung, die vielen konstruktiven Rückmeldungen und Gespräche und die immer offene Tür. Vor allem danke ich dir jedoch dafür, dass du vom ersten Moment an deine Begeisterung für Forschung mit mir geteilt hast!

Prof. Christian Sinzger und Prof. Karl Oliver Kagan danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit und die hilfreichen Anmerkungen.

Prof. Gerhard Jahn und Prof. Thomas Iftner danke ich für die Möglichkeit, meine medizinische Doktorarbeit am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten anzufertigen.

Ich danke Dr. Ramona Businger, Anthea Darius, Sandra Dehn, Maximilian Bunz, Dr. Natalia Ruetalo Buschinger, Brigitte Maurer und Alexander Kirschstein für die schöne Zeit im Labor, die lebhaften Diskussionen und die hilfreichen Anregungen. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei meiner Betreuerin und guten Freundin Dr. Ramona Businger, die mich vom ersten Tag an ermutigt und unterstützt hat, und mir bei der praktischen Arbeit sowie bei der schriftlichen Ausarbeitung mit unendlicher Geduld, Interesse und Hilfsbereitschaft zur Seite stand. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin wünschen können und danke dir von ganzem Herzen!

Unseren Kooperationspartnern aus der Inneren Medizin, Prof. Jan Wehkamp und Dr. Dirk Ehmman, danke ich für den regen Austausch und für die Bereitstellung der Peptide. Ich danke Prof. Patrick Müller und Dr. Hannes Preiss für die Durchführung der Zebrafischexperimente und Dr. Claudia Simon für die Unterstützung bei der Erstellung der Aminosäuresequenzen der HCMV-Derivate. Dr. Vincent Truffault und Dr. Natalia Ruetalo Buschinger danke ich für die Durchführung der NMR-Massenspektrometrie. Weiter gilt mein Dank Prof. Christian Sinzger und Kerstin Laib-Sampaio für die Bereitstellung von Virusstocks, Prof. Ulrich Lauer und Dr. Susanne Berchtold für die Möglichkeit, das

xCELLigence zu nutzen, und Prof. Klaus Hamprecht und Dr. Matthias Schampera für die Bereitstellung der klinischen HCMV-Isolate.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danke ich dem IZKF Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät Tübingen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freund\*innen, meiner Familie und meinen Kommiliton\*innen für ihre Unterstützung bedanken. Liebe Nina, danke für dein immer offenes Ohr und deine tatkräftige Unterstützung bei größeren und kleineren Verwirrungen. Lieber Markus und liebe Alisa, danke für eure tagtägliche Begleitung und die schöne gemeinsame Zeit, danke für eure geteilte Freude an guten und den motivierenden Zuspruch an schlechten Tagen. Markus danke ich außerdem für den unermüdlichen technischen Support und viel gutes Essen. Von ganzem Herzen danke ich dir, liebe Simona, dafür, dass du immer da warst und wir schon so viele Wege gemeinsam gegangen sind. Ohne dich wäre alles immer nicht halb so schön gewesen. Danke, dass ihr alle mich auf diesem Weg begleitet habt!