

Analyse neuer Therapiestrategien
zur Inhibition des
Humanen Immundefizienzvirus Typ 1

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt
der
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Department Biologie
der
Universität Hamburg

von
Birgit Schäfer

- Hamburg 2006 -

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. J. HAUBER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. WIENAND
Tag der Disputation: 02. Juni 2006

Hamburg, den 14. Mai 2006



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Erklärung:

Die vorliegende Dissertation wurde am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie in Hamburg in der Zeit von Januar 2003 bis Juni 2006 angefertigt.

Dissertationsgutachter:
Prof. Dr. Joachim Hauber & Prof. Dr. Udo Wienand

Disputationsgutachter:
Prof. Dr. Wilhelm Schäfer & Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Hauber für die Ermöglichung dieser Arbeit und die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, sowie für seine Unterstützung und Beratung.

Frau Dr. Ilona Hauber möchte ich sehr für ihre wissenschaftliche Betreuung, ihre stete Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen und für ihre wertvollen Anregungen danken. Ferner danke ich ihr, dass sie mir den Freiraum ließ, eigene Ideen zu entwickeln und zu verwirklichen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Udo Wienand, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Für seine sehr gute Kooperation und seine Ideen möchte ich mich bei Herrn Dr. Gerald Bacher bedanken.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung 4 gilt mein Dank für die stete Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere danke ich hier Andrea Bunk, Cordula Grüttner und Marcel Krepstakies für die immerwährende Unterstützung, das offene Ohr für Probleme sowie die gute Laune.

Den größten Dank möchte ich meiner Familie und Sven van Teeffelen aussprechen, für die immerwährende Hilfe, die unerschöpfliche Geduld, die stete Ermutigung und vor allem für die uneingeschränkte Unterstützung in anstrengenden Zeiten.

Meinen Eltern und Sven

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das humane Immundefizienzvirus	1
1.2	Retroviren	2
1.3	Der morphologische Aufbau von HIV-1	3
1.4	Die Genomorganisation von HIV-1	3
1.5	Der HIV-1 Lebenszyklus	5
1.6	Klinischer Verlauf einer HIV-1 Infektion	7
1.7	Therapie der HIV-1 Infektion	8
1.8	Das HIV-1 Rev-Protein	10
1.9	Kernexportweg	12
1.10	Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A)	13
1.11	Polyaminstoffwechsel	14
1.12	Aufgabenstellung	16
2	MATERIAL	17
2.1	Bakterien	17
2.2	Eukaryotische Zellen	17
2.3	Viren	18
2.4	Medien	18
2.4.1	Medien zur Anzucht von Bakterien	18
2.4.2	Medien zur Kultivierung von Zellen	19
2.5	Nukleinsäuren	20
2.5.1	Oligonukleotide	20
2.5.2	Expressionsvektoren	22
2.5.3	Sonstige Nukleinsäuren	24
2.6	Radioaktivität	24
2.7	Proteinstandard	24
2.8	Enzyme	24
2.8.1	Restriktionsendonukleasen / Puffer	24
2.8.2	Sonstige Enzyme	24
2.9	Antikörper	25
2.9.1	Primäre Antikörper	25
2.9.2	Sekundäre Antikörper	25
2.9.3	FACS Antikörper	26
2.9.4	Fluoreszenzgekoppelte Marker zur Kernfärbung (DNA-Färbung)	26
2.10	Standardlösungen und Puffer	26
2.11	Reagenzsysteme (Kits)	30
2.12	Reagenzien und Laborhilfsmittel	31
2.13	Spezielle Geräte	35
3	METHODEN	37
3.1	Bakterienkulturen	37
3.1.1	Herstellung kompetenter E.coli Bakterien	37
3.1.2	Transformation von Plasmid-DNA	37
3.1.3	Bakterienkultivierung zur Plasmidisolierung	37
3.2	Zellkultur	38
3.2.1	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen	38
3.2.2	Kultivierung von adhärenent wachsenden Zellen	38
3.2.3	Kultivierung von Suspensionszellen	39
3.2.4	Isolierung und Stimulierung von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells)	39
3.2.5	Analyse der zellulären Toxizität	39
3.2.6	Analyse der zellulären Apoptose	40
3.2.7	Zellzyklusanalyse	40
3.2.8	Transiente Transfektion mit Hilfe von Lipofectamin	40
3.2.9	Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)	41
3.2.10	Transiente Transfektion mit Calcium-Phosphat	42
3.3	Reportergenanalysen	42
3.3.1	Zellaufschluss zur Reportergenanalyse	42

3.3.2	<i>Fluorometrische CAT-Reporteranalysen</i>	43
3.3.3	<i>Luciferase Reporteranalysen</i>	43
3.3.4	<i>β-Galactosidase Assay</i>	43
3.3.5	<i>SEAP (secreted alkaline phosphatase) Assay</i>	43
3.3.6	<i>Ermittlung der Reporteraktivität</i>	44
3.4	Radioaktive Markierung von Hypusin-modifiziertem eIF-5A.....	44
3.5	Durchflusszytometrie (FACS).....	45
3.6	HIV-1 Infektion.....	45
3.6.1	<i>Infektion von Suspensionszellen</i>	45
3.6.2	<i>Infektion von adhärenten Zellen</i>	46
3.7	Zellfusion.....	46
3.8	Zell-Pseudotypen (lentiviral) Fusion.....	46
3.9	Methoden zur Arbeit mit DNA.....	47
3.9.1	<i>Analytische Plasmidisolierung (Mini-Präparation)</i>	47
3.9.2	<i>Quantitative Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)</i>	47
3.9.3	<i>Konzentrationsbestimmung von DNA</i>	47
3.9.4	<i>Isolierung genomischer DNA mit DNazol</i>	48
3.9.5	<i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>	48
3.9.6	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	50
3.9.7	<i>Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	51
3.9.8	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	51
3.10	Methoden zur Arbeit mit RNA.....	52
3.10.1	<i>Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen</i>	52
3.10.2	<i>Isolierung von zytoplasmatischer RNA aus Zellen</i>	52
3.10.3	<i>Konzentrationsbestimmung von RNA</i>	53
3.10.4	<i>Northern Blot Analyse</i>	53
3.11	Protein-Biochemische Methoden.....	54
3.11.1	<i>Protein-Mengenbestimmung nach Bradford (quantitativ)</i>	54
3.11.2	<i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen</i>	54
3.11.3	<i>Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen</i>	55
3.11.4	<i>Western Blot Analyse</i>	55
3.11.5	<i>Immunpräzipitation von Proteinen aus adhärenten Zellen</i>	56
3.11.6	<i>p24 Antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	56
3.12	Fluoreszenz Analyse.....	58
3.12.1	<i>Indirekte Immunfluoreszenz</i>	58
4	ERGEBNISSE TEIL I: INHIBITION VON HIV-1 DURCH SAM486A	59
4.1	Einfluss von SAM486A auf den zellulären Stoffwechsel.....	60
4.1.1	<i>Toxizität von SAM486A auf eukaryotische Zellen</i>	60
4.1.2	<i>Einfluss von SAM486A auf die Apoptose von Zellen</i>	61
4.1.3	<i>Einfluss von SAM486A auf den Zellzyklus</i>	62
	<i>Schlussfolgerung</i>	62
4.2	Inhibition der HIV-1-Replikation durch SAM486A.....	63
4.2.1	<i>Inhibition von M-tropen HI-Viren</i>	63
4.2.2	<i>Inhibition von T-tropen Viren</i>	65
4.2.3	<i>Neuinfektion und Integration</i>	66
4.2.4	<i>Inhibition von multiresistentem HIV-1 FE9</i>	68
	<i>Schlussfolgerung</i>	70
4.3	Potenzielle Resistenzbildung gegen SAM486A (Langzeitexperiment).....	70
4.4	Inhibition der Hypusin-Modifizierung von eIF-5A.....	71
	<i>Schlussfolgerung</i>	73
4.5	Einfluss von SAM486A auf die Funktion viraler Proteine.....	74
4.5.1	<i>Spezifische Inhibition des Rev-Kernexportweges durch spezifische SAMDC-Blockade</i>	74
4.5.2	<i>Einfluss von SAM486A auf die Tat-Transaktivierung</i>	75
	<i>Schlussfolgerung</i>	77
4.6	Einfluss von SAM486A auf verschiedene mRNA Kernexportwege.....	77
	<i>Schlussfolgerung</i>	80
5	ERGEBNISSE TEIL II: INHIBITION VON HIV-1 DURCH RDP58	81
5.1	Einfluss von RDP58 auf den zellulären Stoffwechsel.....	82
5.1.1	<i>Toxizität von RDP58 auf eukaryotische Zellen</i>	82
5.1.2	<i>Einfluss von RDP58 auf den Zellzyklus</i>	83

5.1.3	<i>Einfluss von RDP58 auf die Apoptose von Zellen</i>	84
	<i>Schlussfolgerung</i>	85
5.2	Inhibition der HIV-1-Replikation durch RDP58	85
5.2.1	<i>Inhibition von M-tropen HI-Viren</i>	85
5.2.2	<i>Spezifische Inhibition von HIV-1 durch RDP58</i>	87
5.2.3	<i>Inhibition von T-tropen HI-Viren</i>	87
5.2.4	<i>Inhibition von multiresistentem HIV-1 FE9</i>	89
5.2.5	<i>Inhibition von HIV-1 in einer adhärenzten Zelllinie</i>	90
	<i>Schlussfolgerung</i>	91
5.3	Hemmung der Virusreplikation bei Zugabe von RDP58 nach der Infektion	91
5.4	Kinetik zur Überprüfung einer nachhaltigen Wirkung von RDP58	92
5.5	Potenzielle Resistenzbildung gegen RDP58 (Langzeitexperiment)	93
5.6	Funktionsstudien	95
5.6.1	<i>Einfluss von RDP58 auf die Rezeptorexpression</i>	95
5.6.2	<i>Neuinfektion von Zellen und Integration des Provirus unter RDP58</i>	96
5.6.3	<i>Zellfusionsanalyse in Anwesenheit von RDP58</i>	98
5.6.4	<i>Zell-Pseudotypen-Fusion unter RDP58</i>	100
5.6.5	<i>Einfluss von RDP58 auf HIV-1-Transaktivatoren</i>	101
5.6.6	<i>Transkription und Lokalisation der viralen mRNAs in RDP58-behandelten Zellen</i>	103
5.6.7	<i>Einfluss von RDP58 auf die Translation viraler mRNA</i>	105
5.6.8	<i>Die Lokalisation von RDP58 in der Zelle</i>	110
DISKUSSION		117
6	DISKUSSION DER SAM486A-ERGEBNISSE	117
6.1	Antivirale Wirkung von SAM486A	117
6.2	Wirkmechanismus von SAM486A	119
6.3	Einfluss von SAM486A auf den Metabolismus der Zelle	121
6.4	Weitere Inhibitoren des eIF-5A Stoffwechsels mit antiviraler Wirkung	122
6.5	Induziert SAM486A die Bildung resistenter Viren?	123
6.6	Ausblick	124
7	DISKUSSION DER RDP58-ERGEBNISSE	126
7.1	Antivirale Wirkung von RDP58	126
7.2	Einfluss von RDP58 auf die frühen Schritte des HIV-1 Lebenszyklus	127
7.3	Einfluss von RDP58 auf den Rev-vermittelten Kernexport	128
7.4	Translation der viralen mRNAs	129
7.5	Lokalisation von RDP58 und Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus	131
7.6	Ausblick	131
8	ZUSAMMENFASSUNG	133
9	LITERATUR	135
10	ABKÜRZUNGEN	153
11	ANHANG	157

1 Einleitung

1.1 Das humane Immundefizienzvirus

Im Jahr 1981 wurde erstmals bei einer Vielzahl von homosexuellen Männern eine bis dahin unbekannte fatale Erkrankung des Immunsystems beschrieben [66,127]. Diese Patientengruppe erkrankte besonders häufig an normalerweise eher selten vorkommenden opportunistischen Infektionen, die durch Bakterien (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*), Protozoen (z.B. *Toxoplasma gondii*), Pilze (z.B. *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*) und Viren, wie beispielsweise Herpes Simplex, Varizella Zoster und Cytomegaloviren verursacht wurden. Zudem hatten die Patienten typische Hauttumore, wie das Kaposi Sarkom oder maligne Lymphome [184]. Dieses Krankheitsbild wurde kurze Zeit später als erworbenes Immunschwächesyndrom (*acquired immuno-deficiency syndrome*, AIDS) bezeichnet. Dass diese Erkrankung durch ein neuartiges menschliches Retrovirus hervorgerufen wird, bewiesen 1983 die Arbeitsgruppe von Luc Montagnier [7] und im darauf folgenden Jahr das Labor von Robert C. Gallo [165]. Dieses Virus wurde zunächst als Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV) bzw. humanes T-Zell Leukämie Virus Typ III (HTLV III) [165] bezeichnet. Im gleichen Jahr beschrieb die Arbeitsgruppe um Jay Levy das AIDS-assoziierte Virus (*AIDS-related virus*, ARV) [115]. Eine einheitliche Benennung der drei Isolate erfolgte 1986; man einigte sich auf das humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) [27].

Der genetische Ursprung von HIV stammt aus Affenarten (Grüne Meerkatzen, Rhesusaffen und Schimpansen), die auf dem afrikanischen Kontinent mit dem so genannten Simian Immundefizienzvirus (SIV) infiziert leben. Man geht davon aus, dass dieses Virus vor Jahrzehnten auf den Menschen übertragen wurde und sich im Laufe der Zeit zum humanpathogenen HIV-1 entwickelt hat.

Heute kennt man drei HIV-1-Subtypen, die sich aufgrund ihrer Sequenzunterschiede unterscheiden lassen. Der phylogenetische Subtyp M (*main phylogenetic group*) mit den Genotypen A bis K ist der weltweit meist verbreitete und verantwortlich für die AIDS-Pandemie [111]. Eine sehr viel geringere Verbreitung haben die Subtypen O (*outlier*) und N (*new*), die in nur etwa 5 % der weltweit infizierten Population nachzuweisen sind. Beide HIV-Subtypen sind nahezu ausschließlich in West-Zentral-Afrika vorzufinden [111,114,177].

1986 beschrieben Wissenschaftler aus dem Pasteur-Institut in Paris die Isolierung eines weiteren HIV-Typs aus AIDS-Patienten in West-Afrika. Da dieser Typ kaum mit dem

ursprünglichen Isolat verwandt war, wurde dieser HIV-2 genannt [23]. HIV-2 unterscheidet sich sowohl in seiner Seroreaktion als auch in der Genomstruktur von den bis dahin bekannten Isolaten [24]. Heute differenziert man bei HIV-2 sieben Genotypen (A bis G), die in Westafrika, Portugal und Indien vorkommen [10,169]. Die Prävalenz von HIV-2 in Westeuropa ist derzeit im Vergleich zu HIV-1 äußerst gering.

Trotz umfangreicher wissenschaftlicher Erforschung von HIV und der Entwicklung und Etablierung einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (*highly active antiretroviral therapy*, HAART) waren Ende 2005 weltweit 40,3 Millionen Menschen mit HIV infiziert. In diesem Jahr starben rund 2,6 Millionen Erwachsene und 570.000 Kinder an den Folgen von AIDS. (UNAIDS, Stand Dezember 2005).

1.2 Retroviren

Die humanen Immundefizienzviren (HIV-1, HIV-2) gehören zur Unterfamilie der Lentiviren, welche zusammen mit den Onkoviren (z.B. humanes T-Zell Leukämie Virus; HTLV) und den Spumaviren (z.B. *Foamyvirus*) die Familie der Retroviren darstellen. Die Retroviren ähneln sich in ihrer Morphologie. Sie sind von einer aus der Wirtszelle stammenden Lipiddoppelschicht umgeben, welche transmembrane und nach außen ragende, virale Glykoproteine trägt. Das Genom der Retroviren besteht aus zwei Kopien einer einzelsträngigen Plus-Strang-RNA mit einer durchschnittlichen Länge von 8.000-10.000 Nukleotiden. Diese virale RNA wird durch die im Viruspartikel vorhandene Reverse Transkriptase (RT) in ein doppelsträngiges DNA-Genom umgeschrieben [6], um in das Wirtszellgenom integrieren zu können. Der Weg der genetischen Information dieser Viren von der RNA zur DNA stellte eine Umkehrung des bis dahin bekannten zentralen Dogmas der Biologie dar und führte zur Nomenklatur der Viren („Retro“).

Retroviren werden aufgrund ihrer Genomorganisation in zwei Gruppen eingeteilt, in einfache und komplexe Retroviren. Beide Gruppen enthalten mindestens drei offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF), die für die Proteine Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol (virale Enzyme) und Env (Glykoproteine) kodieren [28,134]. Zu den einfachen Retroviren zählen beispielsweise das Mason-Pfizer Affenvirus (Mason-Pfizer monkey virus; MPMV), das Rous-Sarkom Virus (RSV) und das Moloney-Maus-Leukämie Virus (Mo-MLV) aus der Unterfamilie der Onkoviren, während Spuma-, Lenti- und δ -Retroviren zu den komplexen Retroviren gezählt werden. Diese besitzen neben den strukturellen auch regulatorische und akzessorische Proteine, welche unter anderem die retrovirale Genexpression kontrollieren und die Infektionseffizienz und Pathogenität steuern [55].

1.3 Der morphologische Aufbau von HIV-1

Das Virion (Abb. 1.1) von HIV-1 hat einen Durchmesser von etwa 100 nm. Das Kapsid ist von einer Lipiddoppelmembran (Hüllmembran) umgeben, die das Virus nach außen abschließt. Diese wird durch Abschnürung aus der Zytoplasmamembran der ehemaligen Wirtszelle gebildet. Mit dieser Hülle sind die viralen Glykoproteine assoziiert, das virale gp41-Transmembranprotein (TP) und das nicht kovalent gebundene, nach außen ragende Glykoprotein gp120 (SU). Auf der Innenseite der Hüllmembran befindet sich das über Myristinsäurereste gebundene Matrixprotein p17 (MA). Die Hülle ist über ein p6-Link-Protein (LI) mit dem sich überwiegend im zentralen Bereich des Virus befindenden Kapsid (*Core*) verbunden. Dieses setzt sich aus p24-Kapsidproteinen (CA) zusammen und weist die für Lentiviren charakteristische konische Form auf [63]. Das Kapsid enthält zwei indentische einzelsträngige Plus-Strang-RNA-Moleküle, die mit den Nukleokapsidproteinen p7 (NC) assoziiert sind und zusammen mit den viralen Enzymen Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) einen so genannten Ribonukleoproteinkomplex bilden.

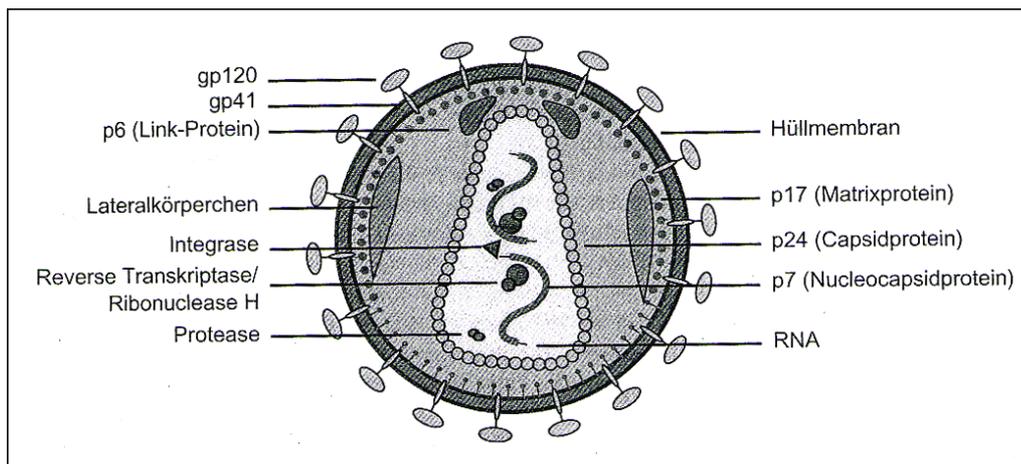


Abb. 1.1: Aufbau eines HIV-1-Partikels (Modrow *et al.* [134])

Darüber hinaus enthält das Viruspartikel die akzessorischen Proteine Vpr, Vif, Nef und diverse zelluläre Proteine wie beispielsweise Cyclophilin [19,54,117,118,119,201,212].

1.4 Die Genomorganisation von HIV-1

Das einzelsträngige RNA-Genom von HIV-1 hat eine Größe von 9 Kb und weist am 3'-Ende eine Polyadenylierung und am 5'-Ende eine Cap-Struktur auf. Im 5'-Bereich befindet sich eine Primer-Bindungsstelle (PB), an die eine zelluläre tRNA hybridisiert ist, welche bei HIV-1 eine Spezifität für die Aminosäure Lysin (tRNA^{Lys}) besitzt.

Die kodierende Region (Abb. 1.2) wird an beiden Enden von regulatorischen Sequenzwiederholungen (*long terminal repeats*, LTR) flankiert. Diese bestehen aus der U3- (*unique*), der R- (*repeat*) und der U5-Region, denen sich am 5'-Ende die PB-spezifische Sequenz anschließt. Es folgt eine *Leader*-Sequenz, welche die Spleißdonorstelle (SD) für alle gespleißten mRNAs und die Bindungsstelle für das Nukleokapsidprotein (ψ) enthält. Hieran schließt sich der kodierende Bereich der proviralen DNA an, welcher am 3'-Ende an einem Polypurintrakt (PP) endet, gefolgt von der U3-, R- und U5-Region. Diese flankierenden Bereiche sind für die Initiation und Termination der reversen Transkription sowie für die Integration des Provirus essenziell.

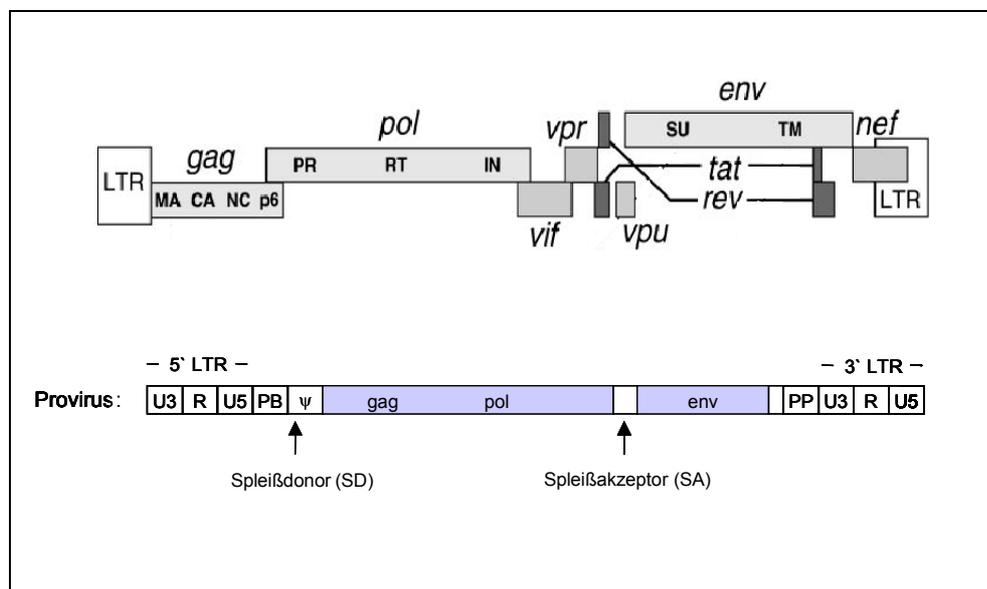


Abb. 1.2: Genomstruktur von HIV-1. Im oberen Teil der Abbildung ist der offene Leserahmen der viralen Proteine dargestellt (Frankel *et al.* [55]). Im unteren Teil der Abbildung ist die DNA-Struktur des Provirus (nach Modrow *et al.* [134]) dargestellt. MA: Matrix, CA: Kapsid, NC: Nukleokapsid, PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase, IN: Integrase, TM: tranmembranes Glykoprotein (gp41), SU: Oberflächen Glykoprotein (gp120).

Der kodierende Bereich der proviralen DNA (Abb. 1.2 oben) besteht aus den Strukturgenen *gag*, *pol* und *env*. Die Strukturproteine Matrix (MA), Kapsid (CA), Nukleokapsid (NC) und das Link-Protein (LI, p6) kodieren auf dem *gag*-Gen und werden als gemeinsames Vorläuferprotein (55 kD) translatiert. Die virusspezifischen Enzyme Integrase (IN), Protease (PR) und Reverse Transkriptase (RT) kodieren auf dem *pol*-Genbereich.

Der offene Leserahmen des *gag*-Gens überlappt mit dem des *pol*-Gens, wodurch letzteres nur durch einen Wechsel des Leserahmens (*frameshift*) translatiert werden kann. Dieser Wechsel wird durch eine uridinreiche Sequenz im NC-Bereich initiiert. Dies führt in etwa 5 % der Translationsereignisse zu einer Verschiebung des ribosomalen Leserasters, wodurch das *gag*-

Stoppkodon überlesen wird und dadurch ein Gag-Pol-Fusionsprotein entsteht, welches eine autokatalytische Aktivität besitzt.

Die Translation des *env*-Gens resultiert wiederum in einem 160 kD großen Vorläuferprotein, aus dem nach Spaltung durch eine zelluläre Protease und weiteren Modifizierungen die Hüllproteine gp120 (SU) und gp41 (TP) gebildet werden.

Neben den Leserahmen für die Strukturproteine verfügt HIV-1 noch über sechs weitere offene Leserahmen, die für die regulatorischen Proteine Tat und Rev und die akzessorischen Proteine Nef, Vpu, Vpr und Vif kodieren [55,134].

1.5 Der HIV-1 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus (Abb. 1.3) von HIV-1 beginnt mit der spezifischen Bindung des gp120-Hüllproteins an den zellulären CD4-Rezeptor [102] und an einen Korezeptoren (z.B. CXCR4, CCR5) aus der Chemokinrezeptorfamilie [39,41]. Dieser ternäre Bindungskomplex löst im gp41 eine Konformationsänderung aus, die zur Fusion der Virusmembran mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle (Zielzelle) führt. Hierbei wird das Viruskapsid in das zelluläre Zytoplasma freigesetzt [61,160,196]. Das Kapsid löst sich auf und entlässt einen so genannten Reverse-Transkriptase-Komplex (RTC). Anschließend wird das virale RNA-Genom durch die Reverse Transkriptase in ein doppelsträngiges DNA-Genom umgeschrieben, wobei neben linearer viraler DNA, die in das Wirtszell-Chromosom integriert, auch virus-spezifische zirkuläre DNA-Zwischenformen gebildet werden. Bei letzteren handelt es sich um transiente ringförmige Strukturen von Präintegrations-DNA (PID) mit unbekannter Funktion, welche entweder eine oder zwei Kopien der LTR-Sequenz enthalten [196]. Aus dem Reverse-Transkriptase-Komplex geht schließlich ein Präintegrationskomplex (PIC) hervor, der aus dem viralen Genom, Matrixproteinen, Nukleokapsidproteinen, der Reversen Transkriptase, der Integrase und dem Vpr-Protein besteht. Dieser Präintegrationskomplex wird entlang der Mikrotubuli in den Zellkern transportiert, in dem die virale Integrase die Integration der viralen DNA in das Wirtszellgenom als so genanntes Provirus katalysiert [17,18,56,68]. Es hängt dann vom Aktivierungszustand der Wirtszelle ab, wann diese latente Infektion zu einer erneuten Virusproduktion führt. Wird das integrierte Provirus transkribiert, kommt es zunächst zur Expression der frühen HIV-1-Proteine Tat, Rev und Nef [67,175].

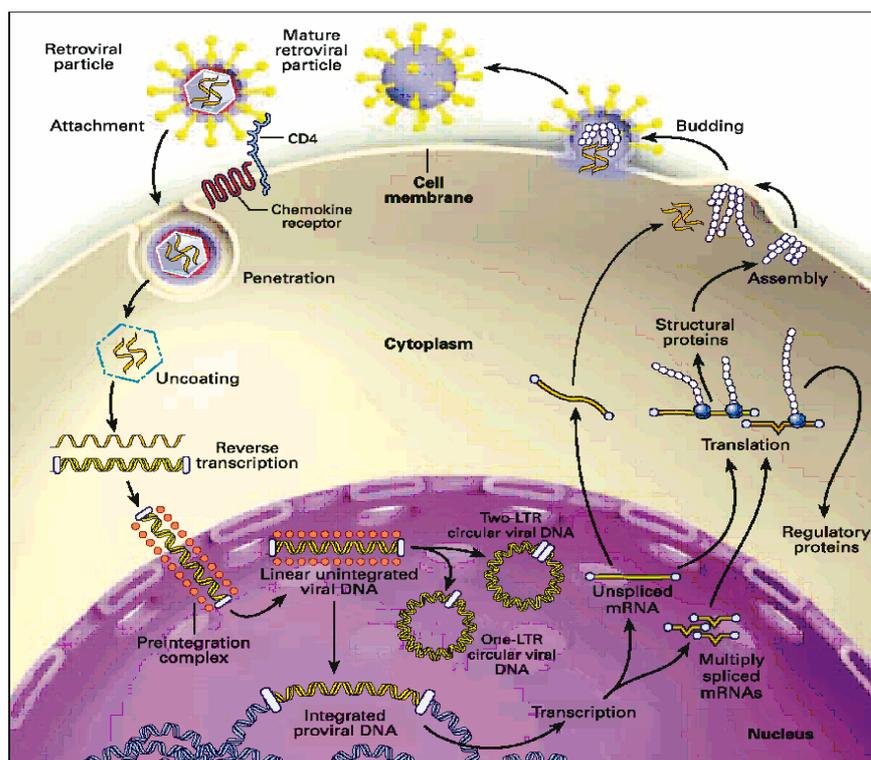


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des HIV-1 Lebenszyklus (Furtado *et al.* [60]).

Das Tat-Protein ist ein Transaktivator der Transkription. Durch die Bindung von Tat an ein *cis*-regulatorisches TAR (*trans-activation response*)-Element, welches Bestandteil aller viralen Transkripte ist, wird die Prozessivität des zellulären RNA-Polymerase-II-Komplexes verstärkt. Tat wird auch von der infizierten Zelle sezerniert und kann nach Aufnahme in benachbarte Zellen durch Induktion von Signalkaskaden ein verändertes Genexpressionsmuster induzieren. Es wurde beschrieben, dass sezerniertes Tat an Vorgängen im Zusammenhang mit der HIV-1-Pathogenese beteiligt ist [56,95,134,137].

Das Rev-Protein wirkt auf posttranskriptioneller Ebene, indem es den nukleozytoplasmatischen Transport retroviraler mRNAs vermittelt. Die genaue Funktion von Rev ist in Kapitel 1.8 ausführlich beschrieben.

Das Nef-Protein (*negative factor*) ist ein Zytoplasmamembran-assoziiertes oder frei vorliegendes myristyliertes Phosphoprotein, das für die Herabregulation der CD4-Rezeptoren und MHC I (*major histocompatibility class I*) Moleküle verantwortlich ist. Weiterhin aktiviert Nef Signalkaskaden, die zur Expression von Transkriptionsfaktoren führen, die ihrerseits die infizierte Zelle aktivieren und somit die Expression des Provirus steigern. Zusätzlich werden durch Nef chemotaktisch wirkende Faktoren aktiviert, die auf T-Lymphozyten wirken [56,134].

Das Env-Vorläuferprotein (gp160) wird nach der Synthese und Glykosylierung am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert.

Zuvor wird das Vorläuferprotein durch eine mit dem Golgi-Apparat assoziierte zelluläre Furinprotease [74] in die Glykoproteine gp120 und gp41 prozessiert [134].

Das Gag-Pol- und das Gag-Protein werden an freien zytoplasmatischen Ribosomen translatiert, an die Plasmamembran transportiert und dort zu höheren Komplexen assoziiert.

Nach Anlagerung der viralen RNA-Genom-Kopien, der Proteine Vpr, Vif, Vpu und den in der Zellmembran eingelagerten Hüllproteinen schnüren (knospen) sich die noch unreifen Virus-Partikel ab. Die Reifung zu infektiösen HI-Viren erfolgt nach der Abschnürung mit der Spaltung der Gag- und der Gag-Pol-Polyproteine in Kapsid, Nukleokapsid, Matrix, Link-Protein, Integrase und Reverse Transkriptase durch die virale Protease [28,55,68].

1.6 Klinischer Verlauf einer HIV-1 Infektion

Das HI-Virus wird beim Menschen durch kontaminiertes Blut (z.B. Bluttransfusion, kontaminierte Injektionsnadeln u.ä.) sowie durch Samen- oder Vaginalflüssigkeit übertragen. Das Virus kann auch von einer infizierten Schwangeren auf ihr Kind übertragen werden, was in der Regel während der Geburt (im Geburtskanal) oder danach durch das Stillen geschieht.

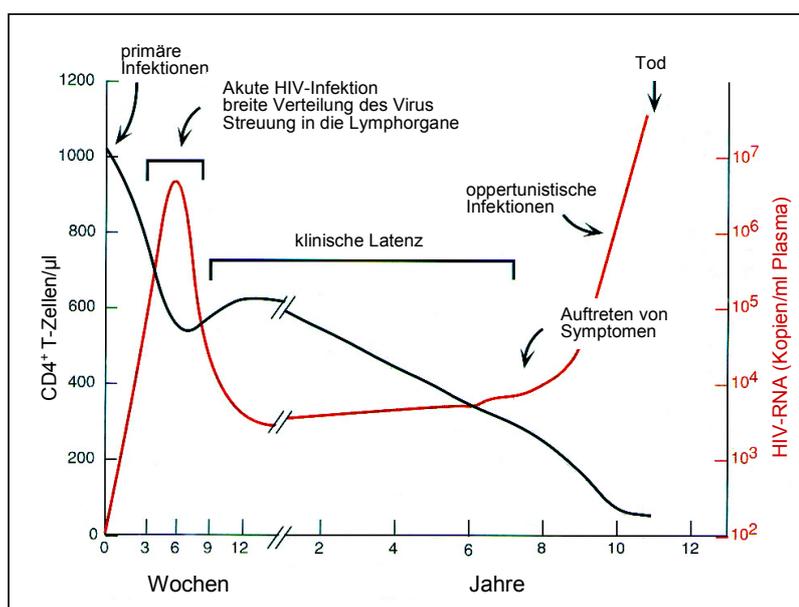


Abb. 1.4: Serologischer Verlauf einer HIV-1 Infektion. Dargestellt ist die Anzahl der $CD4^+$ T-Lymphozyten pro μl Blut und die Anzahl der RNA-Genomäquivalente (Kopien/ml Plasma) als Funktion der Zeit (modifiziert nach Coffin *et al.* [28]).

Der Krankheitsverlauf einer HIV-1 Infektion lässt sich anhand serologischer Parameter ($CD4^+$ T-Zellzahl und Bestimmung der Viruslast) in drei klinisch relevante Phasen einteilen (Abb. 1.4). Die Primärinfektion verläuft meist ohne auffällige Symptome. In seltenen Fällen (20-30 %) treten Grippe-ähnliche Symptome oder Pfeiffersches Drüsenfieber auf. In dieser

primären Phase der Infektion kommt es zu einer Virusvermehrung in den infizierten Zellen, und die Viruslast im Patienten steigt deutlich an (10^6 bis 10^8 virale RNA-Genomäquivalente/ml Plasma). Dabei sinkt die Anzahl der $CD4^+$ -Zellen vorübergehend auf < 600 Zellen/ μ l Blut, und Antikörper-produzierende Zellen werden durch virale Antigene stimuliert. Nach 4-8 Wochen sind HIV-spezifische Antikörper im Blut nachweisbar. Die Phase der Primärinfektion kann mehrere Wochen andauern, dann sinken die Virusmengen im Blut ab.

Darauf folgt eine meist mehrere Jahre andauernde Symptom-freie Phase der Latenz (zweite Phase), in der sich die Viruslast auf ein relativ konstantes Niveau einpendelt und die $CD4^+$ Zellzahl bei > 500 Zellen/ μ l Blut liegt.

Sobald es zu einem generellen Anstieg der Viruslast im Blut des Patienten kommt, sinkt die Anzahl der $CD4^+$ -Zellen weiter ab und es folgt die Phase der symptomatischen Erkrankung (dritte Phase). In den Patienten kann sich über mehrere Wochen bis Jahre ein Lymphadenopathisches Syndrom (LAS) etablieren, welches durch eine mehr als drei Monate andauernde Schwellung von mindestens zwei der peripheren Lymphknoten gekennzeichnet ist. Es schließt sich der *AIDS-related complex* (ARC) an, der durch Beschwerden wie Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Fieber, chronische Diarrhö und AIDS-definierte Makroinfektionen gekennzeichnet ist. Die Phase des LAS/ARC kann über Jahre stabil bleiben oder unmittelbar in das Vollbild AIDS übergehen, d.h. die Anzahl der $CD4^+$ -Zellen sinkt unter 200 Zellen/ μ l Blut und opportunistische Infektionen, wie beispielsweise *Toxoplasma-Encephalitis*, *Candida*-Infektionen (z.B. des Ösophagus, der Luftröhre, der Lunge), *Pneumocystis carinii*-Pneumonie, pulmonale und extrapulmonale Tuberkulose, das Auftreten von malignen Tumoren (Lymphome, Kaposi-Sarkom) und latente Virusinfektionen mit dem Herpes-Simplex-Virus, Epstein-Barr-Virus, Cytomegalovirus und Varicella-Zoster-Virus bestimmen das klinische Bild. Zudem können in manchen Patienten neurologische Symptome, wie eine subakute Encephalitis und Demenzsyndrome mit Gehirnatrophien (bei ca. 25 % der Patienten), diagnostiziert werden [28,45,48,134].

1.7 Therapie der HIV-1 Infektion

Zur antiretroviralen Therapie von HIV-infizierten Patienten stehen gegenwärtig verschiedene Medikamentengruppen zur Verfügung. Es handelt sich dabei um nukleotidische oder nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs), nicht-nukleosidische-Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs), Protease-Inhibitoren (PI) und *Entry*-Inhibitoren,

welche *Attachment*-Inhibitoren, Korezeptor-Antagonisten und Fusions-Inhibitoren zusammenfassen [20,38,64,133,173].

Seit 1996 wird Infizierten eine Kombinationstherapie (HAART) verabreicht, die aus einem Cocktail von Medikamenten der unterschiedlichen oben genannten Medikamentengruppen besteht. Zum Beispiel werden zwei Nukleosidanaloga mit einem Proteaseinhibitor oder einem nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor kombiniert, wodurch gleichzeitig verschiedene, unabhängige Funktionen des Virus blockiert werden [20].

Zu den Nukleosidanaloga zählen beispielsweise Zidovudin, Didanosin, Zalcitabin, Stavudin Lamivudin und Abacavir und die Kombinationspräparate aus Lamivudin und Zidovudin (Combivir) oder aus Lamivudin und Zidovudin und Abacavir (Trizivir) [82]. Nach der Phosphorylierung der Nukleosidanaloga konkurrieren diese mit den zellulären Nucleotiden um das aktive Zentrum der Reversen Transkriptase und werden durch diese in die viralen DNA-Stränge eingebaut. Da ihnen aber die 3'-Hydroxygruppe fehlt, kommt es zu einem Kettenabbruch [20,59]. Tenofovir ist das einzige in der Therapie verwendete Nucleotidanalogen der Reversen Transkriptase. Es weist den gleichen Wirkmechanismus wie die Nucleosidanaloga auf [20].

Zu den nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren gehören Nevirapin, Delaviridin und Efavirenz. Diese werden nicht phosphoryliert und konkurrieren nicht um das aktive Zentrum, sondern binden außerhalb von diesem an die Reverse Transkriptase und induzieren dadurch eine Konformationsänderung, die zur Inaktivierung des Enzyms führt [142,183].

Als Protease-Inhibitoren stehen derzeit beispielsweise Saquinavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Fosamprenavir und Atazanavir zur Verfügung. Diese sind gegen das aktive Zentrum der retroviralen Protease gerichtet.

Zur Gruppe der Fusionsinhibitoren gehört der seit 2003 zugelassene Wirkstoff Enfuvirtid (T20) [109]. T20 entspricht einem Aminosäurebereich der zentralen Domäne des gp41-Hüllproteins, die durch eine Umlagerung die Voraussetzung für die Virus-Zellmembranfusion schafft. Bei Anwesenheit des T20-Peptids in der Membran der Zielzellen verhindert dieses die zur Fusion notwendige Umlagerung der Proteinstruktur, so dass keine Infektion der Wirtszelle stattfinden kann. All den zuvor genannten HIV-Inhibitoren ist gemein, dass sich relativ zügig Resistenzen gegen sie ausbilden können [13,20,190].

Die neue Entwicklung von CCR5 (R5) und CXCR4 (X4) Korezeptor-Antagonisten schreitet schnell voran. SCH-D, ein CCR5-Antagonist befindet sich bereits in einer klinischen Phase II Studie. Eine Kohorten-Analyse, in der virale Tropismen untersucht wurden, zeigte, dass 80 %

aller Viren CCR5 als Kofaktor benutzen. Der Korezeptor-Tropismus korreliert gut mit dem Infektionsstadium – je höher die CD4-Zellzahl ist, desto eher liegen R5-Viren vor. X4-Viren sind im eher fortgeschrittenen Stadium einer HIV-1 Infektion zu finden.

Trotz aller Euphorie über die stetige Entwicklung neuer Kombinationspräparate gibt es große Probleme mit ihrer Verträglichkeit. Beispielsweise kommt es durch die Behandlung mit Proteaseinhibitoren zu einer Umverteilung des Körperfettes (Lipodystrophie) und zu Hyperglykämie [40,43]. Da zudem viele Patienten den ihnen vorgegebenen Einnahmemodus nicht einhalten, wird die Entwicklung von therapieresistenten Viren begünstigt [174].

1.8 Das HIV-1 Rev-Protein

Die Transkription des HIV-1-Genoms führt zu über 30 verschiedenen viralen mRNAs. Hierbei werden während des alternativen Spleißens vier verschiedene 5'-Spleißdonorstellen und acht unterschiedliche 3'-Spleißakzeptorstellen verwendet [70,168,186]. Die entstehenden RNA-Spezies werden in drei Klassen eingeteilt. Die mRNAs der 2 Kb-Klasse sind mehrfach gespleißt und kodieren für die regulatorischen und akzessorischen Proteine Tat, Nef und Rev. Die 4 Kb-Klasse besteht aus einfach-gespleißten mRNAs, die für die Proteine Env, Vif, Vpr und Vpu kodieren. Die 9 Kb-Klasse besteht aus ungespleißten Transkripten, welche der vollen Länge des HIV-Genoms entsprechen. Sie kodieren für die Gag- und Gag-Pol-Polyproteine. Ferner werden sie als Genom in neu entstehende Viruspartikel verpackt [100,164,211].

Im *env*-Gen befindet sich das RRE (*Rev response element*), eine *cis*-aktive RNA-Zielsequenz, an welche das Rev-Protein direkt bindet [75]. Diese Interaktion ist für die Virusvermehrung essenziell, da durch sie der Transport der 9 Kb- und 4 Kb-mRNAs aus dem Zellkern in das Zytoplasma der Wirtszelle ausgelöst wird. In Abwesenheit von Rev verbleiben RRE-enhaltende Transkripte dagegen im Zellkern und werden entweder vollkommen gespleißt oder letztendlich abgebaut [122]. Da die vollkommen gespleißten mRNAs der 2 Kb-Klasse, zu denen auch das *rev*-Transkript selbst gehört, keine RRE-Sequenz enthalten, werden diese nicht durch Rev reguliert.

Das RRE (Abb. 1.5) ist 234 Nukleotide lang und bildet eine aus fünf Stammschleifen bestehende Sekundärstruktur aus. Durch Mutationsstudien wurde die Stammschleife II als primäre Rev-Bindungsstelle identifiziert [80,85,164].

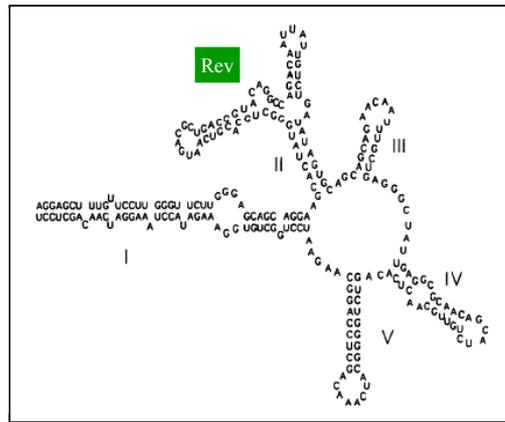


Abb. 1.5: Das *Rev response element* (RRE) bestehend aus fünf Stammschleifen. Stammschleife II wirkt als primäre Rev-Bindungsstelle (Wang *et al* [211]).

In Abb. 1.6 ist das Rev-Protein (*regulator of expression of virion proteins*) dargestellt. Es ist 116 Aminosäuren lang, hat ein Molekulargewicht von ungefähr 18 kD und ist phosphoryliert. Es beinhaltet drei funktionelle Domänen. Die aminoterminalen argininreiche Sequenz enthält die RNA-Bindungsdomäne (RBD) sowie das Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) [12,35]. Diese sind von zwei Regionen flankiert [121,144], welche eine singuläre Multimerisierungs-Domäne ausbilden [161]. In der C-terminalen Region findet sich die Aktivierungsdomäne, die eine hydrophobe, leucinreiche NES-Sequenz (*nuclear export signal*, NES) enthält und für den Kernexport von Rev verantwortlich ist [50,213].

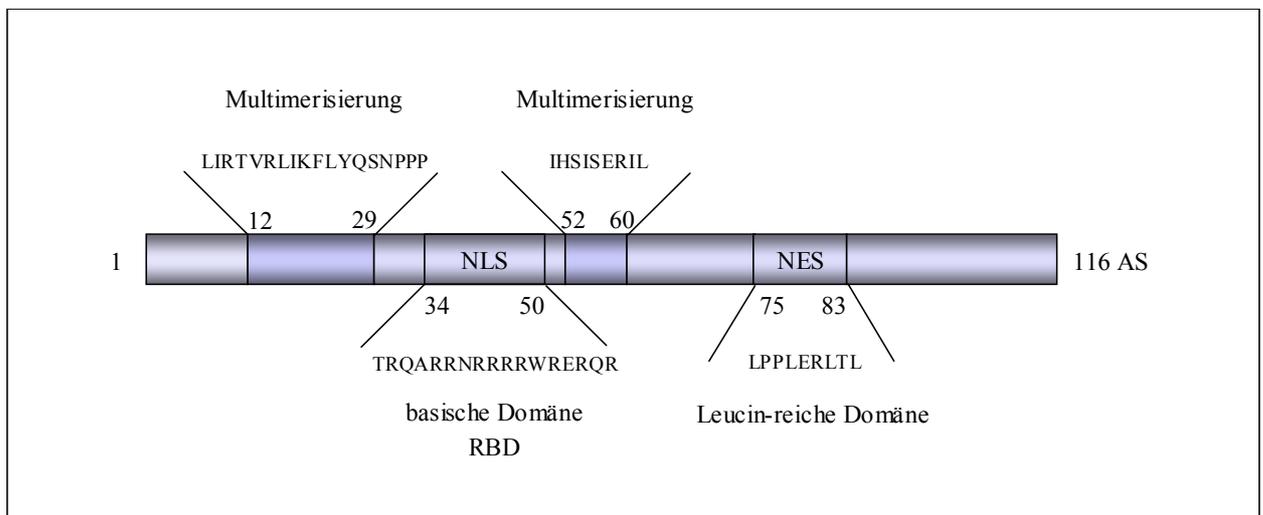


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des HIV-1 Rev-Proteins. Dargestellt sind die funktionellen Domänen des Rev-Proteins und ihre Lokalisation in der Aminosäuresequenz. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen.

Rev bindet an das RRE der ungespleißten und einfach gespleißten mRNAs, multimerisiert [36], und interagiert mit Hilfe seiner Aktivierungsdomäne bzw. seiner NES-Sequenz mit verschiedenen zellulären Kofaktoren. Diese sind für den Kernexport und die

zytoplasmatische Akkumulation der an Rev gebundenen Transkripte verantwortlich [11,57,139,181]. Zusätzlich scheint das Rev-Protein RRE-enhaltende mRNAs zu stabilisieren [49,187] und deren Translation zu verstärken [4,32].

1.9 Kernexportweg

Der nukleozytoplasmatische Transport ist hoch spezifisch, erfolgt über Kernporenkomplexe (*nuclear pore complexes*, NPCs) und wird durch Transportrezeptoren vermittelt. Diese Rezeptoren sind *Shuttle*-Proteine, die sich zwischen Kern und Zytoplasma bewegen und folglich NES und NLS besitzen.

Die zwei wichtigsten zellulären RNA-Exportwege sind durch die Kernexportrezeptoren TAP/NXF1 und CRM1/Exportin1 (*chromosomal maintenance gene*, CRM1) charakterisiert. Das Heterodimer TAP/NXF1 und seine Interaktionspartner vermitteln den Kernexport der meisten zellulären mRNAs, beispielsweise der Haushalts-Gene (*housekeeping genes*) [198]. TAP/NXF1 vermittelt den zellulären mRNA-Transport indem es mit spezifischen Bestandteilen der Kernporen, den so genannten Nukleoporinen, wechselwirkt. Auch einige retrovirale mRNAs, beispielsweise Transkripte des Mason-Pfizer Affenvirus, werden über diesen Kernexportweg in das Zytoplasma transportiert. Die entsprechenden viralen mRNAs enthalten ein *cis*-aktives Sequenzelement, das als konstitutives Transportelement bzw. CTE (*constitutive transport element*) bezeichnet wird [15] und an das TAP/NXF1 direkt bindet.

Nur ein geringer Anteil der zellulären mRNAs wird CRM1/Exportin1-abhängig transportiert. Hierbei handelt es sich oftmals um so genannte ERG-mRNAs (*early response gene*), die unter anderem für wichtige Zytokine, Lymphokine und Transkriptionsfaktoren kodieren [166,185]. Beispielhaft seien hier die mRNAs von c-Fos [16], COX-2 [90] und INF- α 1 [101] genannt.

Auch der retrovirale Rev-abhängige mRNA-Kernexport erfolgt über den CRM1/Exportin1-Transportweg. Die initiale Bindung von Rev an die RRE-RNA-Sequenz der viralen mRNAs findet im Zellkern statt und führt zur sukzessiven Anlagerung weiterer Rev-Proteine durch Protein-Protein- und sekundäre Protein-RNA-Wechselwirkungen [120,121]. Der zelluläre Kernexportrezeptor CRM1/Exportin1 bindet unter Beteiligung der GTPase Ran (Ran-GTP) an die NES-Region von Rev und vermittelt die Translokation des Rev-spezifischen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes durch die Kernpore in das Zytoplasma. Einen weiteren wichtigen zellulären Kofaktor dieses Prozesses stellt der eukaryotischer Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) dar, der die Affinität von CRM1/Exportin1 für das retrovirale Rev-Protein deutlich erhöht [9,92]. Eine detaillierte Beschreibung von eIF-5A folgt in Kapitel 1.10.

Im Zytoplasma wird das Ran-gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und es erfolgt die Dissoziation des Kernexportkomplexes. Freigesetztes monomeres Rev bindet daraufhin an den Importrezeptor Importin- β und wird zur erneuten Bindung an retrovirale mRNAs in den Kern zurücktransportiert [164].

1.10 Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A)

eIF-5A ist ein 154 Aminosäuren großes, saures Protein mit einem Molekulargewicht von 16,7 kD [193]. Es ist in der Zelle das einzig bekannte Protein, das die außergewöhnliche Aminosäure Hypusin [N^{ϵ} -(4-Amino-2-hydroxybutyl)-lysin] enthält [21,150]. Die Hypusin-Modifikation ist essenziell für die Aktivität von eIF-5A [151,152]. Die Synthese erfolgt posttranslational in zwei katalytischen Schritten (Abb. 1.7). Zuerst wird ein Aminobutylrest von Spermidin auf die ϵ - NH_2 -Gruppe eines Lysinrestes (Lys⁵⁰) des eIF-5A-Proteins übertragen. Dieser Schritt wird NAD^+ -abhängig durch die Deoxyhypusin-Synthase (DHS) katalysiert und führt zu einer inaktiven Zwischenform von eIF-5A (Deoxyhypusin). In einem weiteren Schritt wird der angefügte 4-Aminobutylrest am C2 durch die Deoxyhypusin-Hydroxylase (DHH) in einer Fe(II)-abhängigen Reaktion hydroxyliert [25]. Aus dieser letzten Reaktion geht die aktive, Hypusin-modifizierte Form des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A hervor.

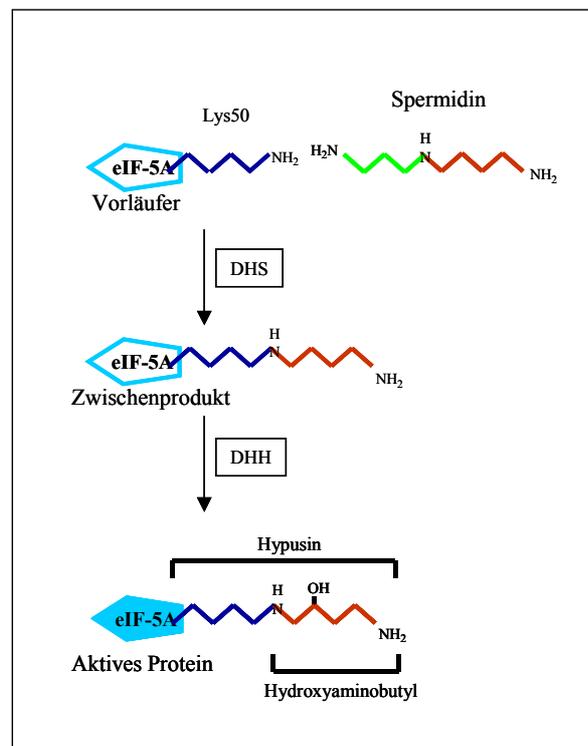


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Hypusin-Modifikation des eukaryotischen Initiationsfaktor 5A.

Aktives Hypusin-modifiziertes eIF-5A scheint für die Zellteilung essenziell zu sein [140,152]. Die exakte zelluläre Funktion von eIF-5A ist jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt ungeklärt. Aufgrund von *in vitro* Studien wurde zuerst vermutete, dass eIF-5A an der Initiation der Translation beteiligt ist, da es die Bildung der Methionyl-Puromycin-Synthese stimuliert [149,193]. Dieser Assay imitiert die erste Peptidbindung im Rahmen der Proteinsynthese. Basierend auf diesen Befunden wurde das Protein als „eukaryotischer Initiationsfaktor“ bezeichnet [149,193]. In späteren Studien wurde jedoch bewiesen, dass eIF-5A nicht an der Initiation der Translation beteiligt ist. So zeigte beispielsweise die Depletion von eIF-5A in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* keinen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Translationsrate [93,94].

Neuere Studien bringen eIF-5A in Zusammenhang mit dem zellulären mRNA-Abbau. Insbesondere scheint das Protein nach dem Entfernen der 7-Methylguanisinium-Kappe am Abbau besonders kurzlebiger mRNAs beteiligt zu sein [140,141,208,218]. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die zytoplasmatische Degradation kurzlebiger zellulärer mRNAs an deren Kernexport gekoppelt ist [71,153,216].

Eine Serie früherer Studien hat zum einen gezeigt, dass eIF-5A mit CRM1/Exportin1 interagiert und dadurch aus dem Zellkern exportiert wird [179], und zum anderen, dass eIF-5A am Rev-vermittelten Kernexport viraler mRNAs beteiligt ist, indem es, wie zuvor erwähnt, anscheinend die Affinität von CRM1/Exportin1 für das Rev-NES deutlich erhöht [9,84,179]. Es existieren verschiedene Inhibitoren, die die Hypusin-Modifikation von eIF-5A verhindern. Spermidin-Analoga wie N1-Guanyl-1,7-diaminoheptan (GC7) oder 1,8-Diaminooctan (GC8) oder das Guanylhydrazon CNI-1493 sind effiziente Hemmer des eIF-5A-modifizierenden DHS-Enzyms (Abb. 1.7) [76,78,191,194]. Interessanterweise konnte in unabhängigen Studien gezeigt werden, dass mit Hilfe von GC8 oder CNI-1493 die Rev-Funktion blockiert, und dadurch die Neubildung viraler Partikel verhindert wird [76,78,97]. Somit stellt die Hypusin-Modifizierung von eIF-5A eine wichtige neuartige Zielstruktur zur Hemmung von HI-Viren dar.

1.11 Polyaminstoffwechsel

Die Hypusin-Modifizierung von eIF-5A ist eine DHS-vermittelte Enzymreaktion, welche stark vom Polyamin Spermidin abhängig ist [151]. Neben Spermidin zählen zu den Polyaminen auch Putrescin und Spermin. Diese aliphatischen Amine können mit den unterschiedlichsten Liganden (z.B. DNA, RNA, Proteinen und Phospholipiden) interagieren. Die Polyamine spielen eine wichtige Rolle innerhalb der Zellteilung und der

Zelldifferenzierung [2,157,188,200,202]. Weiterhin sind sie an der embryonalen Entwicklung [53,108], der Krebsentstehung [91,157,203] und der Funktion des Immunsystems [189,204] beteiligt. Die zelluläre Biosynthese der Polyamine (Abb. 1.8) beginnt mit der Synthese von Putrescin, indem Ornithin durch die Ornithindecaboxylase (ODC) zu Putrescin decarboxyliert wird. Im nächsten Schritt, katalysiert durch die Putrescin-Aminopropyl-Transferase (PAPT), wird eine Aminopropylgruppe an Putrescin angefügt. Dadurch bildet sich das trivalente Polyamin Spermidin, das für die Synthese eines aktiven eIF-5A essenziell ist. Nach Addition einer weiteren Aminopropylgruppe an Spermidin, katalysiert durch die Spermidin-Aminopropyl-Transferase (SAPT), entsteht das tetravalente Spermin.

Als Donor der Aminopropylgruppen dient hier die decarboxylierte Form des S-Adenosylmethionins, welches mit Hilfe der S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAMDC) synthetisiert wird [202,203].

Die limitierenden Enzyme des Polyaminstoffwechsels sind ODC und SAMDC [128,158]. Inhibitoren von ODC und SAMDC werden deshalb aufgrund ihrer antiproliferativen Effekte als Wirkstoffe gegen verschiedene Krebsarten [125,172,203] eingesetzt.

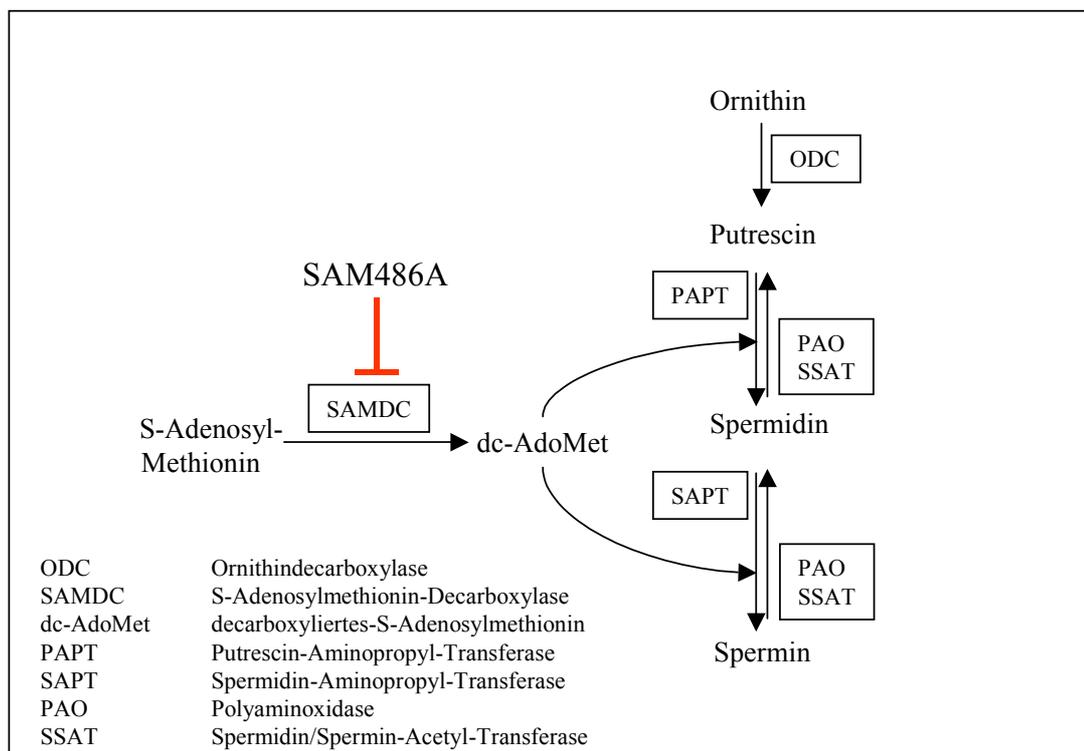


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des Polyaminstoffwechsels mit SAM486A-Angriffspunkt (rot).

Als ein hochpotenter und spezifischer niedermolekularer Inhibitor der SAMDC ist SAM486A (IC₅₀: 5 nM) beschrieben worden [172,205]. Regenass *et al.* konnten zeigen, dass die SAM486A-vermittelte Hemmung der SAMDC Enzymaktivität die intrazelluläre

Anreicherung von Putrescin und gleichzeitige Abreicherung von Spermidin und Spermin bewirkt [171]. Indirekt sollten dadurch keine oder nur unzureichende Mengen an zellulärem Spermidin zur Hypusin-Modifizierung von eIF-5A zur Verfügung stehen.

1.12 Aufgabenstellung

Mit Hilfe der Kombinationstherapie konnte die Morbidität und Mortalität HIV-1-infizierter Patienten stark verringert werden. Trotzdem weist diese Therapieform einige negative Aspekte auf, wie beispielsweise das Auftreten starker Nebenwirkungen und die Ausbildung resistenter Viren. Aus diesen Gründen ist es notwendig neuartige antivirale Substanzen zu entwickeln, die neue und verbesserte Möglichkeiten zur antiretroviralen Therapie bieten, besonders auch zur Hemmung von HI-Viren, die gegen die derzeitig eingesetzten Medikamente Resistenzen aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit sollten neuartige HIV-Inhibitoren identifiziert und funktionell analysiert werden. Basierend auf früheren Befunden, die zeigten, dass der Kernexport retroviraler mRNAs von der funktionellen Interaktion des HIV-Rev-Proteins mit seinem zellulären Kofaktor eIF-5A abhängt, sollte versucht werden, diesen für die Virusvermehrung essenziellen Vorgang mit neuartigen experimentellen Wirkstoffen zu hemmen bzw. die Wirkweise neuartiger, potenzieller Inhibitoren zu erforschen.

2 Material

2.1 Bakterien

E.coli (lat.: *Escherichia coli*) XLII Blue (Stratagene, LaJolla, CA) Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F, ' proAB, lacI^qZΔM15, Tn10, (Tet^r), Amy, Cam^r]^a

E.coli (lat. *Escherichia coli*) XL10-Gold (Stratagene, LaJolla,CA) Genotyp: Tet^r, Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F['], proAB, lacI^q ZΔM15, Tn10, (Tet^r), Amy, Cam^r]^a

2.2 Eukaryotische Zellen

HeLa Humane epitheliale Cervixcarzinomzelllinie (ATCC Nr.: CCL-2)

HeLaCD4-CAT Humane epitheliale Cervixcarzinomzelllinie, exprimiert den CD4-Rezeptor und Chloramphenicol-AcetylCoA-Transferase (CAT) unter Kontrolle des HIV-1 LTR Promotors (NIH)

293T Humane embryonale Nierenzelllinie, exprimiert das große T-Antigen des SV-40 Virus (ATCC Nr CRL-11268)

HIV-1 p24 Hybridom (183-H12-5C) Balb/c Maus Milzzell x SP2-0 Myelom, exprimiert monoklonalen IgG₁ Antikörper, welcher gegen HIV-1 p24 Gag gerichtet ist (NIH)

CEM-SS Humane T4-Lymphoblastoide Zelllinie, infizierbar mit HIV-1 und HIV-2 (NIH Nr. 776)

PM1 Humane Hautzell-T-Lymphom Zelllinie, Subklon von HUT78, infizierbar mit M- und T-tropen HI-Viren

CEMx174 Humane T-B-Hybridzelllinie, CD4 und CXCR4 Expression, CCR5 Überexpression, SIV-LTR-LUC und SIV-LTR-GFP (Dr. Pöhlmann, Erlangen [87])

PBMCs Periphere Blut Mononukleare Zellen (Blutspendezentrale UKE)

2.3 Viren

HIV-1 BaL	Makrophagen-trophes HI-Virus, Laborstamm (NIH Nr. 510)
HIV-1 NL4-3	T-Zell-trophes HI-Virus, Laborstamm (NIH)
HIV-1 FE9	Proviralear NL4-3 Klon HΔPRT mit Proteinase- und Reverse Transkriptase-Gen eines HAART-resistenten Patientenvirus (Multi-resistent) (Nationales Referenzzentrum für Retroviren, Erlangen)
HIV-NL4-3/VSV-G	Mit pcVSV-G pseudotypisiertes NL4-3, infiziert Zellen ohne CD4 und Corezeptor (Dr. Wiegers, HPI)
HIV-NL4-3*env*nef/env-NL4-3/env-ADA/env-SIV/VSV-G/pcDNA3	Proviralear NL4-3 Klon mit verschiedenen Hüllproteinen pseudotypisiert (Dr. Pöhlmann, Erlangen)

2.4 Medien

2.4.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 8 g/l NaCl; 1 g/l Glucose; pH 7,2 mit Natriumhydroxid eingestellt; vor Gebrauch Zugabe von 100 mg/l Ampicillin bzw. 30 mg/l Kanamycin

Luria-Bertani-Agarplatten (LB-Platten)

15 g Agar in 1 l LB-Medium gelöst und autoklaviert; nach Abkühlen auf 55°C, Zugabe von 100 mg/l Ampicillin bzw. 30 mg/l Kanamycin;

Thym-Broth-Medium (zur Herstellung kompetenter Bakterien)

2 % Bacto-Trypton; 5 % Bacto-Hefeextrakt; 0,1 M NaCl; 0,01 M MgCl₂

SOC-Medium

20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 2,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl;
10 mM MgCl₂; 20 mM Glucose; pH 7,0

2.4.2 Medien zur Kultivierung von Zellen

293T, HeLa und HeLaCD4-CAT wurden in DMEM (Biochrom, Berlin) kultiviert

Zugabe von 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 0,05 mg/ml Penicillin/Streptomycin, 3,75 mg/ml Natriumbicarbonat

PM1, CEM-SS, HIV-1 p24 Hybridom und PBMCs wurden in RPMI 1640 (BioWhittaker, Cambrex, Belgien) kultiviert

Zugabe von 10 % FKS (Pansystem), 2 mM L-Glutamin, 0,05 mg/ml Penicillin/Streptomycin

Medienzusätze

Fötale <u>K</u> älberserum (FKS)	Biochrom (Berlin) bzw. PAN Biotech (Aidenbach); vor Gebrauch, einmalige Inaktivierung für 30 min bei 60°C
Dialysiertes FKS	PAN Biotech (Aidenbach)
Gelatine	Sigma (München), verwendet als 0,1 % Lösung in H ₂ O
L-Glutamin	Biochrom (Berlin)
Natriumpyruvat	Biochrom (Berlin)
Natriumbicarbonat	Biochrom (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin)
Opti-MEM I (serumreduziertes Medium)	Gibco BRL (Eggenstein)

Trypsin/EDTA	Biochrom (Berlin)
Polybren	Sigma (München)
Liquemin N10.000 (Heparin)	Roche (Mannheim)
SAM486A (Dihydrochlorid-Salz-Monohydrat von 4-(Aminoiminomethyl)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one-diaminomethylenhydrazon)	Novartis Pharma AG (Basel)
RDP58	EMC microcollections GmbH (Tübingen)
RDP58-Carboxyfluorescein (RDP58-CFSC)	EMC microcollections GmbH (Tübingen)

2.5 Nukleinsäuren

2.5.1 Oligonukleotide

Alle synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen.

2.5.1.1 Oligonukleotide zur Überprüfung einer *de novo* Infektion von HIV (Präintegrations-DNA; PID)

PID-outer (erste, äußere PCR):

s = *sense*, as = *antisense*

O#8878s 5'-GAGCAGTATCTCGAGACCTAG-3'

O#712as 5'-GCTTCAGCAAGCCGAGTCCTG-3'

PID-nested (zweite, innere PCR):

N#8910s 5'-GCAATCACAAGTAGCAATACAGC-3'

N#691as 5'-CGTCGAGAGATCTCCTCTGG-3'

β-Globin (Interne Kontrolle):

BG#2165s 5'-CGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTC-3'

BG#2812as 5'-GCAGAATGGTAGCTGGATTGTAGC-3'

2.5.1.2 Oligonukleotide zum Nachweis integrierter proviraler DNA (Alu-PCR)

Alu-outer für T-trophe HI-Viren:

O#T8905s 5'-GAGCAGTATCTCGAGACCTAG-3'

Alu#SB704as 5'-TGCTGGGATTACAGGCGTGAG-3'

Alu-nested für T-trophe HI-Viren:

N#M/T8938s 5'-GAGCAATCACAAGTAGCAATACAGC-3'

N#T8939as 5'-CCTTGTAGCAAGCTCGATGTCAG-3'

Alu-outer für M-trophe HI-Viren:

O#M8905s 5'-GAGCAGTATCTCGAGACCTGG-3'

Alu#SB704as s.o.

Alu-nested für M-trophe HI-Viren:

N#M8938s 5'-GAGCAATCACAAGTAGCAATACAGC-3'

N#M8939as 5'-CCTTGTAGAAAGCTCGGTGTCAG-3'

2.5.1.3 Oligonukleotide zur Herstellung einer GAPDH Sonde für die Northern Blot Analyse

GAPDH_{as} 5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCAC-3'

GAPDH_s 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT-3'

2.5.2 Expressionsvektoren

2.5.2.1 Vektoren zur Analyse der Tat-Transaktivierung

Vektor	Herkunft/Referenz	Beschreibung
pBC12/CMV	Cullen 1986 [31]	Beinhaltet den konstitutiven CMV-IE Promotor und die Polyadenylierungsstelle des Ratten-Präpro-Insulin-II-Gens; parentaler Vektor
pcTat	Malim <i>et al.</i> , 1988 [123]	Beinhaltet das <i>tat</i> -Gen unter der Kontrolle des CMV-IE-Promotors und die Polyadenylierungsstelle des Ratten-Präpro-Insulin-II-Gens
pBC12/CMV/ β Gal	Ruhl <i>et al.</i> , 1993 [181]	Beinhaltet das <i>βgal</i> -Gen unter der Kontrolle des CMV-IE-Promotors und die Polyadenylierungsstelle des Ratten-Präpro-Insulin-II-Gens
pBC12/HIV/CAT	Berger <i>et al.</i> , 1988 [8]	Beinhaltet das <i>cat</i> -Gen unter der Kontrolle des HIV-1 LTRs und die Polyadenylierungsstelle des Ratten-Präpro-Insulin-II-Gens

2.5.2.2 Vektoren zur Analyse der Rev-Transaktivierung

Vektor	Herkunft/Referenz	Beschreibung
pBC12/CMV	siehe 2.5.2.1	siehe 2.5.2.1
pcRev	Malim <i>et al.</i> , 1988 [123]	Beinhaltet das <i>rev</i> -Gen unter der Kontrolle des CMV-IE-Promotors und die Polyadenylierungsstelle des Ratten-Präpro-Insulin-II-Gens
pBC12/CMV/ β Gal	siehe 2.5.2.1	siehe 2.5.2.1
pCMVgagLucRRE	Daelemans <i>et al.</i> , 2002 [33]	Beinhaltet das <i>gag</i> (p17)-Gen fusioniert mit dem <i>luc</i> -Gen der „ <i>Firefly</i> “-Luciferase (<i>Photinus pyralis</i>) unter der Kontrolle des CMV-IE-Promotors. Im 3'UTR befindet sich die Sequenz des <i>Rev response element</i> (RRE).

2.5.2.3 Vektoren zur Analyse des gag-pol mRNA Exports

Vektor	Herkunft/Referenz	Beschreibung
pBC12/CMV	siehe 2.5.2.1	siehe 2.5.2.1
pcRev	siehe 2.5.2.2	siehe 2.5.2.2
pBC12/CMV/SEAP	Berger <i>et al.</i> , 1988 [8]	Beinhaltet das <i>seap</i> -Gen (<i>secreted alkaline phosphatase</i>) unter der Kontrolle des CMV-IE-Promotors und die Polyadenylierungs-stelle des Ratten-Präpro-Insulin-II-Gens
GPV-RRE	Swanson <i>et al.</i> , 2004 [199]	Beinhaltet das <i>gag</i> -, <i>pol</i> -, <i>vif</i> - und <i>vpr</i> -Gen mit den wichtigen Spleißdonor und Spleißakzeptor Stellen von HIV-1, gefolgt von der RRE Sequenz und einer Polyadenylierungsstelle des <i>bovine growth hormone</i> (BGH). Alle Gene stehen unter der Kontrolle des CMV-IE Promotors
GPV-4xCTE	Swanson <i>et al.</i> , 2004 [199]	Beinhaltet das <i>gag</i> -, <i>pol</i> -, <i>vif</i> - und <i>vpr</i> -Gen mit den wichtigen Spleißdonor und Spleißakzeptor Stellen, gefolgt von vier Kopien des CTE (<i>constitutive transport element</i>) Sequenz des Mason-Pfizer Affenvirus (MPMV) und einer Polyadenylierungs-stelle des <i>bovine growth hormone</i> (BGH). Alle Gene stehen unter der Kontrolle des CMV-IE Promotors

2.5.2.4 Virale Plasmide

Vektor	Herkunft/Referenz	Beschreibung
pNL4-3	NIH	pUC18 Vektor, der das vollständige replikations- und infektiionskompetente virale HIV-1 (Stamm NL4-3) Genom beinhaltet
pNL_LucR ⁺ E ⁻	Connor <i>et al.</i> , 1995 [30]	Basiert auf pNL4-3 mit deletiertem <i>vpr</i> - und <i>nef</i> -Bereich. Enthält Stoppkodon im <i>env</i> -Gen. Beinhaltet Anstelle von <i>nef</i> das „Firefly“-Luciferase (<i>luc</i>)-Gen.

2.5.3 Sonstige Nukleinsäuren

Sonde für Northern Blot Experimente

pNL4-3 mit NcoI und XhoI geschnitten (beinhaltet *nef*-Gen und einen Teil des Vektors, 1681 bp)

DNA Längenstandard

SmartLadder (200-10.000 bp) Eurogentec (Seraing, Belgien)

Nukleotide für die Polymerase Ketten Reaktion

dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) sind im MasterMix (2,5x) enthalten, Eppendorf (Hamburg)

2.6 Radioaktivität

[1,4-¹⁴C] Putrescin-Dihydrochlorid Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)

[alpha-³²P] dCTP Hartmann Analytic (Braunschweig)

2.7 Proteinstandard

BenchMarkTM Prestained Invitrogen (Karlsruhe)

2.8 Enzyme

2.8.1 Restriktionsendonukleasen / Puffer

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach, Traunstein) bezogen und mit den von den Herstellern empfohlenen Puffersystemen verwendet.

2.8.2 Sonstige Enzyme

Taq-DNA Polymerase / Puffer Eppendorf (Hamburg)
(Eppendorf Mastermix 2.5x)

Klenow-Polymerase Roche (Mannheim)

Proteinase K Sigma (München)

2.9 Antikörper

2.9.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung Western Blot	Verdünnung Immu- markierung	Konzentration Immun- präzipitation	Herkunft
anti- α - Tubulin	Maus	1:5000	-	-	Sigma (München)
183 (anti- p24)	Maus	1:4000	1:200	10 μ g	NIH
anti-gp120 HIV-1	Maus	1:1000	-	-	Immuno- diagnostics (Woburn, USA)
anti-eIF-5A	Kaninchen	1:500	-	1:100	Schatz <i>et al.</i> , 1998 [182]
anti- Cathepsin D	Kaninchen	-	1:50	-	Dianova (Hamburg)
anti-Calnexin	Kaninchen	-	1:200	-	Stressgen (Kanada)

2.9.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Konjugat	Verdünnung Western Blot	Verdünnung Immun- markierung	Herkunft
anti-Maus	Ziege	Peroxidase	1:5000	-	Dianova (Hamburg)
anti- Kaninchen	Ziege	Peroxidase	1:5000	-	Dianova (Hamburg)
anti-Maus	Ziege	Cy3	-	1:200	Rockland (Gilbertsville, PA)
anti-Maus	Ziege	Texas Red	-	1:100	Dianova (Hamburg)

anti-Kaninchen	Ziege	Cy3	-	1:150	Rockland (Gilbertsville, PA)
Annexin V	Ziege	FITC	-	-	Bender MedSystems (Wien, Österreich)

2.9.3 FACS Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Konjugat	Herkunft
anti-human CD4	Maus	PE	BD Biosciences (Belgien)
anti-human CXCR4	Maus	PE	BD Biosciences (Belgien)

2.9.4 Fluoreszenzgekoppelte Marker zur Kernfärbung (DNA-Färbung)

Bezeichnung	Verdünnung Immunfluoreszenz	Herkunft
Propidiumjodid (PI)	1:15	Sigma (München) bzw. Becton Dickinson (CA)
Hoechst	1:200	Sigma (München)
DRAQ5	1:1000	Alexis (Lausen, Schweiz)

2.10 Standardlösungen und Puffer

Dissoziationspuffer (5x)	125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5 % SDS; 20 % Glycerol; 5 % Mercaptoethanol; 0,2 % Bromphenolblau
EIA-Puffer	50 mM HEPES; 150 mM NaCl; 0,1 % NP-40; pH mit KOH auf 7,0-7,5 eingestellt; sterilfiltriert

RIPA-Puffer	1 % SDS, 1 % NP40; 1 % Natrium-Deoxycholate; 50 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 8,2; vor Verwendung frisch hinzufügen: 5 µg/ml Aprotinin; 5 µg/ml Leupeptin; 5 µg/ml PepstatinA; 125 µg/ml Pefabloc
NP-40 Lysis Puffer für lymphoide Zellen	10 mM Hepes-NaOH pH 7,6; 50 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 0,05 % NP-40
SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 0,1 % SDS
Transferpuffer (10x)	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin; 1% SDS; vor Verwendung frisch hinzufügen: 20 % Methanol
Coomassie-Färbelösung	125 g Coomassie Blau R250; 125 ml Methanol; 25 ml Essigsäure; ad 250 ml H ₂ O
Ponceau S-Färbelösung (10x)	2 % Ponceau S; 30 % Trichloressigsäure; 30 % Sulfosalicylsäure
Gel-Entfärber	25 % Isopropanol; 10 % Essigsäure; 65 % H ₂ O
TBS-Puffer (<i>tris buffered saline</i>) (10x)	10 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl
TBS/Tween-Puffer	TBS-Puffer; 0,05 % Tween 20
ECL-Entwicklerlösung 1	18 ml H ₂ O; 2 ml Tris-HCl pH 8,5; 88 µl para- Cumarin-Säure-Lösung (74 mg/5 ml DMSO); 200 µl Luminol (443 mg/10 ml DMSO)
ECL-Entwicklerlösung 2	18 ml H ₂ O; 2 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5; 30 µl 30 % H ₂ O ₂
SDS-Trenngel-Puffer	1,5 M Tris; 0,4 % SDS
SDS-Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris; 0,4 % SDS

SDS-Trenngel 12 %	6,932 ml H ₂ O; 3,6 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 7,2 ml 30% PAA; 180 µl 10 % SDS; 80 µl APS; 10 µl TEMED
SDS-Sammelgel 4,5 %	7,1 ml H ₂ O; 1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8; 1,5 ml 30% PAA; 100 µl 10% SDS; 45 µl APS; 10 µl TEMED
Farbmarker für Agarosegele	40 % Saccharose; 1 mM EDTA III; 0,25 % Bromphenolblau
TAE-Puffer	2,0 M Tris; 1,0 M NaAc; 50 mM EDTA II; mit Essigsäure auf pH 7,5 einstellen
Denhardts Puffer	2 % Ficoll Typ 400; 2 % BSA; 2 % Polyvinylpyrrolidon
MOPS (5x)	0,2 M MOPS; 50 mM NaAc; 5 mM EDTA III (0,5 M)
RNA-Probenpuffer	500 µl deionisiertes Formamid; 175 µl 37 % Formaldehyd; 100 µl 5x MOPS, steril filtrieren
Hybridisierungsmix für Northern Blot	175 ml 20 % SDS; 50 ml Denhardts Puffer; 100 ml Na-Phosphat-Puffer pH 7,0; 175 ml 20x SSC; 50 g Dextransulfat; ad 500 ml H ₂ O; vor Verwendung frisch hinzufügen: 1/10 Volumen Lachssperma DNA (1 mg/ml)
Vorhybridisierungsmix für Northern Blot	175 ml 20 % SDS; 50 ml Denhardts Puffer; 100 ml Na-Phosphat-Puffer pH 7,0; 175 ml 20x SSC; ad 500 ml H ₂ O, vor Verwendung frisch hinzufügen: 1/10 Volumen Lachssperma DNA (1 mg/ml)
SSC (20x)	3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat; pH 7,0
Wasch-Puffer I	75 ml 20x SSC; 125 ml 20 % SDS, 50 ml 0,1M Na-Phosphatpuffer (pH 7,0); 50 ml Denhardts Puffer; ad 500 ml H ₂ O (H ₂ O = bidestilliertes, autoklaviertes H ₂ O)

Wasch-Puffer II	25 ml 20x SSC; 25 ml 20 % SDS; ad 500 ml H ₂ O
Wasch-Puffer III	50 ml 20x SSC; 50 ml 20 % SDS; ad 500 ml H ₂ O
RNA-Probenauftrags-Puffer	50 % Glycerol (86 %); 0,4 % Bromphenolblau; 0,4 % Xylencyanid; 1 mM EDTA III (0,5 M); ad 5 ml H ₂ O
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	138 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄
3 % PFA (<u>Para</u> formaldehyd)	1,5 g PFA in 40 ml H ₂ O; 13 µl 10 M NaOH unter Erwärmen (ca. 40-50°C) lösen; 5 ml 10x PBS zugeben; mit H ₂ O auf ein Gesamtvolumen von 50 ml einstellen; pH 7,5
Elvanol	20 g Polyvinylchlorid in 160 ml PBS; 80 ml Glycerin (100 %); einmalig über 80°C erhitzen
Tbf I-Puffer	30 mM KOAc; 50 mM MnCl ₂ ; 100 mM KCl; 10 mM CaCl ₂ ; 15 % Glycerin
Tbf II-Puffer	10 mM MOPS, pH 7,0; 75 mM CaCl ₂ ; 10 mM KCl; 15 % Glycerin
2x HBS-Puffer	3,2 g NaCl; 0,148 g KCl; 0,054 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 0,4 g Dextrose (D(+)-Glucose); 2 g HEPES; ad 200 ml H ₂ O; pH 7,0 mit NaOH oder HCl einstellen
2 M CaCl ₂	14,7 g CaCl ₂ ad 50 ml H ₂ O; sterilfiltrieren
2x SEAP-Puffer	2 M Diethanolamin; 2 mM MgCl ₂ ; 20 mM L- Homoarginin
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O; 40 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O; 10 mM KCl; 1 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O, pH 7,0
Arbeitspuffer (<i>working buffer</i>)	10 ml Z-Puffer; 8 µl 10 % SDS; 28 µl β- Mercaptoethanol

FACS-Puffer	PBS mit 2 % FKS und 0,1 % Natriumazid
FACS-Waschpuffer	PBS mit 2 % FKS
Para- <i>Coumaric-Acid</i> -Lösung	74 mg p- <i>Coumaric-Acid</i> in 5 ml DMSO
Luminol-Lösung	443 mg Luminol in 10 ml DMSO lösen
Lösung 1	18 ml H ₂ O; 2 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5; 88 µl para- <i>Coumaric-Acid</i> -Lösung
Lösung 2	18 ml H ₂ O; 2 ml 1M Tris-HCl pH 8,5; 30 µl 30 % H ₂ O ₂
PBS/Heparin	500 ml PBS; 250 µl Liquemin N 10.000
PBS/EDTA	500 ml PBS, 1 ml 1 M EDTA

2.11 Reagenzsysteme (Kits)

DNA Minipräparations-Kit	Qiagen (Hilden)
DNA Maxipräparations-Kit	Qiagen (Hilden)
DNA Gel-Extraktions-Kit	Qiagen (Hilden)
Eppendorf® MasterMix (2,5x)	Eppendorf (Hamburg)
Lipofectamine™ 2000/+Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Biorad Protein Assay	Biorad (München)
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega (Mannheim)
Random Primed DNA-Labeling Kit	Roche (Mannheim)

2.12 Reagenzien und Laborhilfsmittel

Agrarose	Peqlab (Erlangen) bzw. Gibco BRL (Eppenstein)
Acrylamid/Bis 29:1	Biorad (München)
<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat (APS)	Sigma (München)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Aprotinin	Biomol (Hamburg)
β -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Biocoll	Biochrom (Berlin)
Biotin-AG-501 alpha B-Resin	Biorad (München)
Bromphenolblau	Sigma (München)
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck (Darmstadt)
Coomassie Blau R250	Biomol (Hamburg)
CPRG (<u>C</u> hlorophenol- <u>r</u> ed- β -D- <u>G</u> alactopyranosid)	Roche (Mannheim)
Dextransulfat	Sigma (München)
<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonate (DEPC)	Roth (Karlsruhe)
<u>D</u> imethylsulfo <u>x</u> id (DMSO)	Sigma (München)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Serva (Heidelberg)
DNAzol	Invitrogen (Karlsruhe)

Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
<u>E</u> thidium <u>b</u> romid (EtBr)	Biomol (Hamburg)
<u>E</u> thylen- <u>D</u> iamin- <u>T</u> etra <u>a</u> ccetat (EDTA)	Merck (Darmstadt) bzw. Sigma (München)
Ficoll Typ 400	Sigma (München)
Filterpapier	Schleicher&Schüll (Dassel)
37 % Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Formamid	Sigma (München)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glyzin	Biomol (Hamburg)
G-Sephadex Säulchen	Roche (Mannheim)
Guanidinium Isothiocyanat	Invitrogen (Karlsruhe)
Wasserstoff-Peroxid (H ₂ O ₂)	Amersham (Freiburg)
<u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl- <u>P</u> iperazin- <u>E</u> thansulfonsäure (HEPES)	Sigma (München)
Hybond™-N (Nylonmembran)	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂)	Merck (Darmstadt)

Kälberserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Sigma (München)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Lachssperma DNA	Sigma (München)
Leupeptin	Biomol (Hamburg)
Liquemin N 10.000 (Heparin)	Roche (Mannheim)
Luminol	Sigma (München)
Magermilchpulver	Heirler (Radolfzell)
Magnesiumacetat (MgAc)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Biomol (Hamburg)
Natriumacetat-Trihydrat (CH ₃ COONa*3H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium</i> -, SDS)	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
NKS (<i>newborn calf serum</i> ; NCS)	Biochrom (Berlin)

N, N, N', N'- <u>T</u> etramethylendiamin (TEMED)	Biorad (München)
Nonidet-P40 (Igepal)	Sigma (München)
Nunc-Immuno-Platte	VWR (Darmstadt)
Opti-MEM I (serumreduziertes Medium)	Gibco BRL (Eggenstein)
para-Cumarinsäure	Sigma (München)
Pefabloc	Biomol (Hamburg)
Protran [®] Nitrocellulosemembran	Schleicher&Schüll (Dassel)
Pepstatin A	Biomol (Hamburg)
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma (München)
<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonylfluorid (PMSF)	Merck (Darmstadt)
<u>P</u> oly <u>e</u> thylen <u>i</u> min (PEI)	Polyscience, Inc. (Eppelheim)
Protein-A-Sepharose	Amersham (Uppsala)
Protein-G-Sepharose	Amersham (Uppsala)
Polyvinylpyrrolidone	Sigma (München)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg) bzw. Nerbe Plus (Winsen)
RNase, DNase freies H ₂ O	Invitrogen (Karlsruhe)
Röntgenfilme	Fuji (Japan) bzw. Kodak (Stuttgart)

Schwefelsäure	Merck (Darmstadt)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Tris	Biomol (Hamburg)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Fluka (Neu-Ulm)
Verdünnungsplatten mit 96 Vertiefungen	VWR (Darmstadt)
<i>Whatman</i> 3MM Papier	Whatman (Maidstone)
Zellkulturflaschen	Sarstedt (Nümbrecht) bzw. BD Labware (USA)
Zellkulturplatten	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)

2.13 Spezielle Geräte

Geldokumentation	DIANA II CCD Camera System Raytest (Straubenhardt)
Luminometer	Centro LB 960 Berthold Instruments (Bad Wildbach)

PCR-Maschine	DNA-Engine PTC-200 MJ Research (Watertown; USA)
Photometer	DU 640 Spectrophotometer Beckman (München)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss (Jena)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM 510 Meta/Confocorr II	Carl Zeiss (Jena)

3 Methoden

3.1 Bakterienkulturen

3.1.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

5 ml Thym-Broth-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von einer Kulturplatte (10 mM MgSO₄, ohne Antibiotika) eines entsprechenden *E.coli*-Stammes beimpft. Nach einer ca. 12 h Inkubation bei 37°C wurden 2,5 ml dieser Vorkultur zu 250 ml Thym-Broth-Medium (ohne Antibiotikum) gegeben und bei 37°C schüttelnd kultiviert. Sobald die optische Dichte (OD) bei 595 nm einen Wert von 0,5-0,6 erreicht hatte, wurde die Kultur für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 3.000 Upm (2500 xg) für 15 min und 4°C. Das Bakteriensediment wurde in 75 ml eiskaltem, sterilem Tbf I-Puffer resuspendiert. Nach einer 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 3.000 Upm (2500 xg) und 4°C. Im Anschluss wurden die kompetenten Bakterien in 10 ml 0,1 M Tbf II-Puffer resuspendiert und in 200 µl Portionen in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren.

3.1.2 Transformation von Plasmid-DNA

200 µl eines kompetenten *E.coli* Stammes wurden auf Eis aufgetaut und mit einer entsprechenden Plasmid-DNA versetzt. Nach einer 45 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 2 min auf 42°C erwärmt, sofort auf Eis abgekühlt und 1 ml SOC-Medium bzw. LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben. Die transformierten Bakterien inkubierten anschließend 60 min im 37°C Wasserbad. Danach wurde die Bakteriensuspension in verschiedenen Volumina auf antibiotikahaltige LB-Platten ausgestrichen. Nach einer Inkubation von ca. 12 h bei 37°C konnten Einzelkolonien zum Ansetzen von Flüssigkulturen verwendet werden.

3.1.3 Bakterienkultivierung zur Plasmidisolierung

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden *E.coli* XLII Blue bzw. XL Gold verwendet. Alle Plasmid-Konstrukte enthielten ein Ampicillin-Resistenzgen, wodurch die Bakterien auf

entsprechenden ampicillinhaltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatten bzw. in LB-Flüssigmedien kultiviert werden konnten.

Zur präparativen Plasmidisolierung wurde über Nacht eine Vorkultur in 5 ml LB-Medium angefertigt. Diese diente zur Animpfung von 500 ml ampicillinhaltigem LB-Medium in sterilen Erlenmeyerkolben, wodurch größere DNA Mengen extrahiert werden konnten. Die Inkubation dieser Kulturen erfolgte für 12-16 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator. Für eine Langzeitlagerung wurden 800 µl der Bakteriensuspension mit 800 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren wurden ca. 5×10^6 Zellen in 500 µl kaltem Kulturmedium aufgenommen und in einem Kryoröhrchen bei 0°C (Eisbad) aufbewahrt. Danach wurden 500 µl Einfriermedium (30 % DMSO in FCS) zugefügt und die Mischung mehrmals invertiert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in einer Polystyrolbox für etwa 2 h bei -20°C langsam eingefroren und danach in der Polystyrolbox auf -80°C überführt. Nach weiteren 24 h konnten die eingefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert werden.

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch bei 37°C. Um das enthaltene DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension in 10 ml vorgewärmtes Medium gegeben und für 5 min bei 1.200 Upm (150 xg) zentrifugiert. Die pelletierten Zellen konnten nun in dem passenden Kulturmedium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche kultiviert werden.

3.2.2 Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen

Die adhärennten Zelllinien HeLa, HeLaCD4-CAT und 293T wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5 % CO₂ und einer humiden Atmosphäre (95 % relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Als Medium diente *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 0,05 mg/ml Penicillin/Streptomycin, 3,75 mg/ml Natriumbicarbonat. Die Zellen wurden ungefähr alle drei Tage umgesetzt, zu diesem Zeitpunkt waren 80-90 % des Kulturflaschenbodens bedeckt. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Kulturflaschenboden abgelöst. Anschließend wurde das

Trypsin/EDTA mit einem 10-fachen Überschuss an warmem Kulturmedium inaktiviert und die resuspendierten Zellen in einer Dichte von 10-20 % neu ausgesät.

3.2.3 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Suspensionszelllinien PM1 und CEM-SS wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Als Medium diente RPMI mit 10 % FKS (PAN-System), 2 mM L-Glutamin und 0,05 mg/ml Penicillin/Streptomycin. Die Dichte der Zellen wurde per Sicht beurteilt. In der Regel wurden alle drei Tage 1/10 der Suspensionskultur weiterkultiviert.

3.2.4 Isolierung und Stimulierung von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*)

Zur Isolierung von PBMCs wurden *Buffy Coats* (50 ml plasma- und erythrozytenfreies Blut) aus dem Blutspendezentrum des Universitätsklinikums Eppendorf verwendet. Um eine gute Zellisolierung zu erhalten wurde das Blut zunächst 1:1 mit PBS/Heparin vermischt. 10 ml Biocoll (Biochrom) wurden mit je 30 ml dieser Mischung überschichtet. Danach erfolgte eine mit geringer Beschleunigung durchgeführte Zentrifugation (1 min 500 Upm, 1 min 1.000 Upm, 30 min 1.200 Upm/150 xg) bei Raumtemperatur, welche man ohne Bremswirkung beendete. Anschließend wurden die PBMCs aus der Interphase in 10 ml kaltes PBS-EDTA überführt und mittels Zentrifugation (1.200 Upm/150 xg, 8 min, 4°C) pelletiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS-EDTA (1.000 Upm/100 xg, 10 min, 4°C), wurden ca. 13×10^6 PBMCs in 10 ml RPMI aufgenommen und in einer 10 cm Zellkulturschale kultiviert. Den Zellen wurde jeden dritten bis vierten Tag 3-5 µl Interleukin-2 [10 U/µl] pro ml Kulturmedium verabreicht.

3.2.5 Analyse der zellulären Toxizität

Um zu untersuchen, in welchen Konzentrationen die antivirale Substanzen toxisch auf die Zellen wirken, musste ein Vitalitätstest über mindestens 12 Tage durchgeführt werden. Hierzu wurde ein alamarBlue Redox Indikator (Serotec) nach Angaben des Herstellers eingesetzt, welcher quantitativ die Proliferation der behandelten Zellen misst und somit ein Parameter für die metabolische Aktivität der Zelle darstellt. Hierzu wurden alle drei Tage 100 µl Zellsuspension mit 20 µl alamarBlue Lösung versetzt und nach 3 h Inkubation im Brutschrank die Extinktion in einem ELISA-Lesegerät bei 560/595 nm bestimmt.

3.2.6 Analyse der zellulären Apoptose

Mit einer ausgewählten Substanz-Konzentration wurde ein Apoptose-Test in PBMCs durchgeführt. Dieser erfolgte nach Angaben des Herstellers, mittels eines humanen Annexin V-FITC Tests (Bender MedSystems). Die Auswertung erfolgte im Durchflusszytometer (FACS) der Firma Becton Dickinson.

3.2.7 Zellzyklusanalyse

Zur Analyse der unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen wurde entweder ein Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson) nach Angaben des Herstellers verwendet oder alternativ eine Propidiumiodidmarkierung durchgeführt. Hierzu wurden $1,7 \times 10^5$ PM1 Zellen einmal mit 5 ml kaltem PBS gewaschen. Nach einem 5 min Zentrifugationsschritt bei 1.200 Upm (150 xg) und 4°C wurden diese pelletiert und in 500 µl PBS/0,1 % EDTA resuspendiert. Zum Fixieren der Zellen wurde anschließend 5 ml eiskalter 80 % Ethanol zugetropft und die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1.200 Upm (150 xg) und 4°C, erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml PBS/0,1 % EDTA mit anschließender Zentrifugation (s.o.). Zur eigentlichen Propidiumiodidfärbung wurde das Pellet mit 165 µl Propidiumiodid (0,1 mg/ml) + 16,6 µl RNase A (QIAGEN) und 318,4 µl PBS für 30 min bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Analyse der Zellen erfolgte in einem Durchflusszytometer.

3.2.8 Transiente Transfektion mit Hilfe von Lipofectamin

HeLaCD4-CAT Zellen wurden mit Lipofectamin Reagent (Invitrogen) transfiziert. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen in einer Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung (\varnothing 3,5 cm) in DMEM ohne Antibiotika ausgesät.

Transfektionsansatz:

Lösung 1 (pro Vertiefung):

1-3 µg Plasmid-DNA
3 µl PlusReagent
ad 30 µl OptiMEM I

mischen und für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren

Lösung 2 (pro Vertiefung):

3 μ l Lipofectamin

6 μ l OptiMEM I

mischen und für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren

Anschließend wurde Lösung 2 vorsichtig mit Lösung 1 gemischt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Zugabe der Transfektionslösung zu den Zellen, wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 500 μ l Minimalmedium (DMEM ohne FKS/Antibiotika) ersetzt. Hierzu wurden dann 40 μ l der Transfektionslösung getropft und die Platte für 3-4 h auf einer Wippe bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Transfektionsmischung von der Platte entfernt und durch Kulturmedium ersetzt. Die Kultivierung erfolgte bis zur Weiterverarbeitung im Zellkultur Brutschrank für ca. 48-72 h.

3.2.9 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

HeLa und HeLaCD4-CAT Zellen wurden mit Polyethylenimin (Polysciences) transient transfiziert. Hierzu wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung (\varnothing 3,5 cm) ausgesät. Zur eigentlichen Transfektion wurde folgender Ansatz verwendet:

Pro Vertiefung:

maximal 1 μ g Plasmid-DNA

6 μ l PEI

ad 200 μ l OptiMEM I

sofort mischen (Vortex) und für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren

Vor Zugabe von 200 μ l Transfektionsmischung wurde das Kulturmedium durch 1 ml Minimalmedium ersetzt. Nach einer Inkubation von 3-4 h im Brutschrank, wurde das Gemisch entfernt und durch Kulturmedium ersetzt. Die weitere Kultivierung bis zur Ernte der Zellen nach ca. 48–72 h erfolgte bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂.

3.2.10 Transiente Transfektion mit Calcium-Phosphat

293T Zellen wurden mit Hilfe der Calcium-Phosphat Methode transfiziert. Da sich adhären wachsende 293T Zellen nicht fest auf dem Boden einer Zellkulturplatte anheften, wurden die Zellkulturplatten ein Tag vor der Transfektion mit 0,1 % Gelatinelösung behandelt. Pro Plattenviertiefung (\varnothing 3,5 cm) wurden 2 ml Gelatinelösung gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Vertiefung zweimal mit PBS gewaschen, anschließend konnten $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung ausgesät werden. Am Tag der Transfektion wurde nach folgendem Schema transient transfiziert.

Pro Vertiefung:

4-5 μ g Plasmid-DNA

ad 100 μ l H₂O

125 μ l 2 x HBS

der Reihenfolge nach miteinander mischen

16 μ l CaCl₂

CaCl₂ vorsichtig zutropfen und für 30 min bei RT inkubieren

Anschließend wurde pro Vertiefung 500 μ l Kulturmedium und 200 μ l Transfektionsmischung zugefügt. Die Zellkulturplatte wurde für 4-5 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ersatz des Transfektionsansatzes durch Kulturmedium, erfolgte bis zur Zellernte nach ca. 48-72 h eine weitere Inkubation im Zellkultur Brutschrank.

3.3 Reportergenanalysen

3.3.1 Zellaufschluss zur Reportergenanalyse

Die Ernte der mit Reportergen-transfizierten Zellen erfolgte 48-72 h nach der Transfektion. Hierzu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Zum eigentlichen Zellaufschluss wurde der Zell-Lysis-Puffer des CAT ELISA Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Hierzu wurden pro 3,5 cm Vertiefung je 500 μ l 1x Lysis-Puffer zugegeben und die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurden die Zell-Lysate durch gleichmäßiges resuspendieren in ein

Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (5 min, 16.000 Upm/24.000 xg, RT). Der Überstand konnte nun zur Analyse der Reportergenaktivitäten verwendet werden.

3.3.2 Fluorometrische CAT-Reporteranalysen

Sämtliche Analysen der CAT-Reportergenaktivitäten wurden mit Hilfe des CAT-ELISA Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Analyse des CAT-Assay erfolgte im ELISA-Lesegerät bei OD 405 nm.

3.3.3 Luciferase Reporteranalysen

Alle Luciferase-Reporteranalysen wurden mit dem Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte im Luminometer Centro LB 960 (Berthold Instruments, Bad Wildbad).

3.3.4 β -Galactosidase Assay

Um artifizielle Effekte aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen auszuschließen, wurde neben dem eigentlichen Reporterkonstrukt stets eine interne Kontrolle mitgeführt. β -Galactosidase wird von der transfizierten Zelle nicht sezerniert und kann daher nur als Kontrolle für Reporterkonstrukte dienen, die im Zell-Lysat gemessen werden. Zur Analyse der β -Galactosidase-Aktivität wurden 20 μ l Zell-Lysat mit 205 μ l Arbeitspuffer und 20 μ l CPRG (Chlorophenol-red- β -D-Galactopyranosid; Roche) versetzt. Durch die Enzymaktivität wird das gelbliche CPRG-Substrat gespalten und es kommt zu einem Farbumschlag von gelb nach rot. Als Nullwert wird anstelle von Zell-Lysat H₂O eingesetzt. Der Farbumschlag kann anschließend im ELISA-Lesegerät bei OD 595nm gemessen werden.

3.3.5 SEAP (secreted alkaline phosphatase) Assay

Zur Transfektionskontrolle von sezernierten Reporterprodukten diene SEAP, eine Phosphatase, die in den Kulturüberstand sekretiert wird.

Für die Analyse der SEAP-Aktivität wurden 250 μ l Überstand für 5 min bei 65°C inkubiert und im Anschluss bei 13.000 Upm (15.700 xg) für 2 min zentrifugiert. Nachdem 100 μ l Probe mit 100 μ l 2x SEAP-Puffer versetzt worden waren, erfolgte eine weitere Inkubation für

10 min bei 37°C mit anschließender Zugabe von 20 µl Paranitrophenol (120 mM). Der einsetzende Farbumschlag nach gelb konnte bei OD 405 nm im ELISA-Lesegerät gemessen werden.

3.3.6 Ermittlung der Reporteragenaktivität

Um die genaue Reporteragenaktivität bestimmen zu können, musste diese stets mit der mitgeführten internen Kontrolle verrechnet werden.

Berechnung:

Mittelwert aus höchstem und niedrigstem internen Kontrollwert bilden. Alle internen Kontrollwerte durch diesen Mittelwert teilen und den entstehenden Faktor mit der zugehörigen Reporteraktivität multiplizieren.

3.4 Radioaktive Markierung von Hypusin-modifiziertem eIF-5A

Hierzu wurden einerseits markierte Zellen in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese und andererseits mittels Immunpräzipitation untersucht.

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden PM1 Zellen, die sieben Tage mit einer auszutestenden Wirksubstanz vorinkubiert (präinkubiert) wurden bzw. unbehandelte Zellen auf eine Zellzahl von 6×10^6 Zellen eingestellt. Über Nacht erfolgte dann eine Markierung mit 25 µCi [1,4-¹⁴C] Putrescin-Dihydrochlorid (100 mCi/mmol, Amersham) in 3 ml Medium. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und danach lysiert. Die Proteine im Lysat wurden zuerst nach ihrem Isoelektrischen Punkt in einem *Immobiline Dry Strip* Gel (IPG pH 4-7) und anschließend nach ihrer Größe in einem 14 % SDS-Gel mittels Autoradiographie visualisiert.

Für die Immunpräzipitation wurden HeLaCD4-CAT Zellen, die für sechs Tage in einer zu testenden Wirksubstanz präinkubiert waren bzw. unbehandelte Zellen, auf eine Zellzahl von 2×10^6 eingestellt und in einer 10 cm Schale ausgesät. Die radioaktive Markierung erfolgte über Nacht in 7 ml Medium mit 25 µCi [1,4-¹⁴C] Putrescin-Dihydrochlorid (100 mCi/mmol, Amersham). Am darauf folgenden Tag wurde mit den Zell-Lysaten eine Immunpräzipitation (Kap. 3.11.5) durchgeführt.

3.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Detektion der Oberflächenrezeptoren (CD4 und CXCR4) erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Hierzu wurden die Zellen zuerst mit PBS und anschließend mit 5 ml FACS-Waschpuffer gewaschen. Zum Pelletieren der Zellen erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1.200 Upm (150 xg) für 5 min. Danach wurden die Zellen in einer gewünschten Menge FACS-Puffer aufgenommen und zu je 100 µl in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. In diesen erfolgte die eigentliche Färbung mit 10 µl eines fluoreszenzkonjugierten Antikörpers. Zusätzlich wurde eine zum Antikörper gehörige Isotypen-Kontrolle (5 µl) mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C im Dunkeln, wurden die Zellen in 700 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen und bei 2.500 Upm (600 xg) für 3 min zentrifugiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 500 µl PBS und die Analyse im Durchflusszytometer.

3.6 HIV-1 Infektion

3.6.1 Infektion von Suspensionszellen

PM1 bzw. CEM Zellen wurden in einer 175 cm² Zellkulturflasche zu einer dichten Zellsuspension angezogen. Die Zellen konnten dann in einem 50 ml Falcon bei 1.200 Upm (140 xg) für 5 min abzentrifugiert werden. Je nach Pelletgröße wurde dieses in 4-7 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. In einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen wurden dann je 50 µl uninfizierte Zellen (ca. 5×10^5) in 900 µl Medium (mit Wirksubstanz bzw. Lösungsmittelkontrolle z.B. DMSO) vorgelegt. Die restlichen Zellen wurden erneut pelletiert und anschließend in ca. 400 µl Medium aufgenommen. Die darauf folgende Infektion der vorbereiteten Zellen mit M-trophem, T-trophem oder multiresistentem HIV-1 erfolgte in einem S3 Labor. Hierbei wurden Virusmengen zwischen 4-50 ng (p24-Antigen) eingesetzt. Nach Zusatz des HI-Virus zur Zellsuspension folgte eine Inkubation von 2,5 bis 4 h bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Anschließend wurden die infizierten Zellen 2 x mit 25 ml PBS gewaschen und in der oben genannten Mediummenge (4-7 ml) resuspendiert. Nun konnten 50 µl infizierte Zellen zu dem 950 µl Medium/uninfizierten Zellgemisch hinzugefügt werden.

Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen 1:5 auf eine neue Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen und mit frischem Medium (mit Wirksubstanz bzw. Lösungsmittelkontrolle) umgesetzt. Gleichzeitig erfolgte die Entnahme von zellfreiem Kulturüberstand zur p24-

Antigenanalyse. Ebenfalls wurden bei jeder Entnahme die Zellen auf ihre Vitalität (AlamarBlue-Assay) getestet und Zellen zur Protein- bzw. RNA-Analyse (Western Blot bzw. Northern Blot) lysiert.

3.6.2 Infektion von adhärennten Zellen

Die Infektion erfolgte entweder in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen (\varnothing 3,5 cm) oder in 10 cm Kulturschalen. Hierzu wurden HeLa bzw. HeLaCD4-CAT Zellen einen Tag vor der Infektion in einer Dichte von $1-2 \times 10^5$ pro Vertiefung (\varnothing 3,5 cm) bzw. $2,5 \times 10^6$ pro 10 cm Schale ausgesät.

Zur Infektion wurden pro 3,5 cm Vertiefung 500 μ l Medium und 2-10 ng Virus und für die 10 cm Schale 4 ml Medium und 100 ng Virus verwendet (Kultivierung und Analyse Kap. 3.6.1).

3.7 Zellfusion

Die Zellfusionsanalyse wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Pöhlmann am Nikolaus-Fiebiger-Zentrum für Molekulare Medizin in Erlangen durchgeführt. Zur Analyse der Zellfusion wurden 293T Zellen in einer Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen ausgesät und am darauf folgenden Tag mittels Calcium-Phosphat-Transfektion mit 1,8 μ g Env-exprimierendem Plasmid (pNL4-3-env, pYu-2-env [170]) bzw. einem pcDNA3 Kontrollplasmid (negative Kontrolle) und einem SIV-Tat-exprimierenden Plasmid [180] transient transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden sowohl die transfizierten 293T Zellen, als auch die CEMx174 Zellen für 1 h mit 20, 10 und 5 μ g/ml RDP58 (Wirksubstanz) bzw. DMSO (Lösungsmittelkontrolle) behandelt. Nach dieser Inkubation wurden pro 293T Zellen-Vertiefung 5×10^4 CEMx174 Zellen zugefügt. Die Luciferasemessung erfolgte nach 72 h in einem Luminometer.

3.8 Zell-Pseudotypen (lentiviral) Fusion

Dieser Versuch wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Pöhlmann durchgeführt. Es wurden pseudotypisierte Viren verwendet, die dem HI-Virus Stamm NL4-3 [30] entsprechen, wobei das *env*-, *nef*- und *vpr*-Gen deletiert waren. Durch Kotransfektion wird nach Bedarf das *env*-Gen von NL4-3 (T-troph) bzw. YU2 (M-troph) [170] oder VSV-G [44] exprimiert. Als Negativkontrolle diente ein Virus, das mit pcDNA3 kotransfiziert wurde und dadurch infektionsdefizient ist.

1. Präinkubation der CEMx174 Zellen mit RDP58

Hierzu wurden in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen pro Vertiefung 3×10^4 CEMx174 Zellen in 50 μ l RPMI mit 40, 20 und 10 μ g/ml RDP58 (doppelte Konzentration) bzw. DMSO ausgesät. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank erfolgte der Zusatz der Virus-Pseudotypen in je 50 μ l RPMI/ Vertiefung. Die Viren wurden zuvor auf gleiche Infektiösität eingestellt. Durch den Zusatz der Pseudotypen (50 μ l), betrug die endgültige Peptidkonzentration dann 20, 10 und 5 μ g/ml. Nach 24 h wurden nochmals 100 μ l RPMI Medium zugesetzt und nach insgesamt 72 h erfolgte die Luciferasemessung in einem Luminometer.

2. Präinkubation der pseudotypisierten Viren mit RDP58

In diesem Ansatz wurden gleiche Mengen an infektiösen Viren in je 50 μ l pro Vertiefung mit doppelter Peptidkonzentration (s.o.) bzw. DMSO vorgelegt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 3×10^4 CEMx174 Zellen pro 50 μ l und Vertiefung hinzugegeben. Nach 24 h wurden nochmals 100 μ l RPMI zugefügt und die Zellen für weitere 72 h kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität in einem Luminometer.

3.9 Methoden zur Arbeit mit DNA

3.9.1 Analytische Plasmidisolierung (Mini-Präparation)

Eine analytische Plasmidisolierung erfolgte aus 5 ml LB-Bakterienkultur mit Hilfe des Minipräp-Plasmid *Kits* der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben.

3.9.2 Quantitative Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)

Eine quantitative Plasmidisolierung erfolgte aus 500 ml Bakterienkultur mit Hilfe des Maxipräp-Plasmid *Kits* der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.

3.9.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA erfolgte in einer Quarzküvette im Spektralphotometer bei einer OD 260 nm/280 nm. Als Referenz diente die Extinktion des Lösungsmittels.

Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 mg/ml doppelsträngiger DNA

3.9.4 Isolierung genomischer DNA mit DNAzol

Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl DNAzol (Invitrogen) aufgenommen. Zur Lyse der Zellen wurden diese mehrmals vorsichtig auf- und abpipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 400 µl 100 % Ethanol (Raumtemperatur). Nach mehrmaligem Invertieren und einer Lagerung für 1-3 min bei Raumtemperatur, wurden die Proben bei 8.000 Upm (6.000 xg), 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Das DNA Pellet wurde anschließend mit 600 µl kaltem 75 % Ethanol gewaschen und anschließend bei 8.000 Upm (6.000 xg) für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanols konnte das Pellet im Heizblock (55°C) angetrocknet und anschließend in TE-Puffer mit einem geringen Anteil an 8 mM NaOH gelöst werden.

3.9.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktionen (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden in einem *Thermocycler* mit Deckelheizung (PTC-200, *Peltier Thermal Cycler*) unter Verwendung des Eppendorf Mastermix (2,5x) durchgeführt.

3.9.5.1 Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis einer Neuinfektion von Zellen

Bei dieser PCR wird die Tatsache ausgenutzt, dass sich nach der Neuinfektion einer Zelle eine so genannte präintegrative zirkuläre DNA (PID) bildet. Diese DNA kann nur mit Hilfe einer *Nested-PCR* nachgewiesen werden. Hierbei erkennen die Primerpaare extrachromosomale, zirkuläre DNAs, welche 1 LTR oder 2 LTRs besitzen.

Reaktionsansatz <i>Outer-PCR</i> (1. PCR)		Reaktionsansatz <i>Nested-PCR</i> (2.PCR)	
3,0 µg	genomische DNA	5 µl	Produkt aus <i>Outer-PCR</i>
1 µl	<i>Sense</i> -Primer (100 pmol/µl)	1,5 µl	<i>Sense</i> -Primer (100 pmol/µl)
1 µl	<i>Antisense</i> -Primer (100 pmol/µl)	1,5 µl	<i>Antisense</i> -Primer (100 pmol/µl)
18 µl	Eppendorf MM (2,5x)	18 µl	Eppendorf MM (2,5x)
ad 50 µl	H ₂ O	ad 50 µl	H ₂ O

Die Amplifikation erfolgte unter folgendem Programmprofil:

<i>Outer</i> -Profil		<i>Nested</i> -Profil	
1 Zyklus	94°C für 3 min	1 Zyklus	94°C für 3 min
	58°C für 2 min		58°C für 2 min
	72°C für 6 min		72°C für 6 min
25 Zyklen	94°C für 1 min	40 Zyklen	94°C für 1 min
	58°C für 1 min		58°C für 1 min
	72°C für 4 min		72°C für 4 min
<i>Termination</i>	72°C für 10 min	<i>Termination</i>	72°C für 10 min

Um die Mengen der eingesetzten genomischen DNA vergleichend kontrollieren zu können, wurde zusätzlich eine β -Globin PCR durchgeführt:

Reaktionsansatz

2,5-3,0 μ g	genomische DNA
1 μ l	<i>Sense</i> -Primer (100 pmol/ μ l)
1 μ l	<i>Antisense</i> -Primer (100 pmol/ μ l)
18 μ l	Eppendorf MM (2,5x)
ad 50 μ l	H ₂ O

Die Reaktion wurde mit folgendem Programmprofil durchgeführt:

Profil

1 Zyklus	95°C für 3 min
25 Zyklen	95°C für 30 sec
	58°C für 1 min
	72°C für 4 min
<i>Termination</i>	72°C für 10 min

3.9.5.2 Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis proviraler DNA

Zum Nachweis einer in das Genom einer Zelle integrierten proviralen DNA wurde zunächst eine erste, *Outer-PCR* durchgeführt. Hier wurden Primerpaare verwendet, welche komplementär zum HIV-1 LTR und zu humanen Alu-Sequenzen sind. In einer anschließenden zweiten, *Nested-PCR* waren die Primerpaare innerhalb des HIV-1 Genoms lokalisiert.

Reaktionsansatz <i>Outer-PCR</i>		Reaktionsansatz <i>Nested-PCR</i>	
2,5-3,0 µg	genomische DNA	5 µl	Produkt aus <i>Outer-PCR</i>
1 µl	<i>Sense</i> -Primer (100 pmol/µl)	1,5 µl	<i>Sense</i> -Primer (100 pmol/µl)
1 µl	<i>Antisense</i> -Primer (100 pmol/µl)	1,5 µl	<i>Antisense</i> -Primer (100 pmol/µl)
18 µl	Eppendorf MM (2,5x)	18 µl	Eppendorf MM (2,5x)
ad 50 µl	H ₂ O	ad 50 µl	H ₂ O

Die Amplifikation erfolgte unter folgendem Programmprofil:

<i>Outer</i> -Profil		<i>Nested</i> -Profil	
1 Zyklus	95°C für 2 min	1 Zyklus	95°C für 2 min
	54°C für 2 min		54°C für 2 min
	72°C für 4 min		72°C für 2 min
30 Zyklen	95°C für 1 min	55 Zyklen	95°C für 50 sec
	54°C für 1 min		54°C für 50 sec
	72°C für 3 min		72°C für 1 min
	+ 1 sec pro Zyklus		+ 1 sec pro Zyklus
<i>Termination</i>	72°C für 10 min	<i>Termination</i>	72°C für 7 min

3.9.6 Agarosegelelektrophorese

DNA wandert aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. In einem Agarosegel lassen sich Nukleinsäuren zwischen 0,1–60 Kb

auftrennen, wobei die Wandergeschwindigkeit von Form und Größe, bei linearer DNA nur von der Größe, abhängig ist. Die Agarosegele wurden zur präparativen Isolierung und zur analytischen Auftrennung von Restriktionsanalysen verwendet. Für diese Verfahren wurden 1 % Agarosegele (1 g Agarose/ 100 ml TAE-Puffer, aufkochen, bis Agarose gelöst ist, Zusatz von ca. 5 µl Ethidiumbromid [10 mg/ml] pro 40 ml Agarose) verwendet, welche sich zur Auftrennung von Fragmentgrößen zwischen 0,5-10 Kb eignen. Da Ethidiumbromid während der Elektrophorese in die DNA interkaliert, kann diese unter UV-Licht (450 nm) sichtbar gemacht werden.

3.9.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des DNA-Gel-Extraktions-*Kits* von QIAGEN (Hilden).

3.9.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Unter optimalen Bedingungen katalysiert 1 U (internationale Enzymeinheit, *Unit*) die Spaltung von 1 µg DNA des Phagen λ pro Stunde. Um eine quantitative Spaltung zu erlangen, wurden die Enzyme im Überschuss eingesetzt und die Inkubationszeiten verlängert.

x µg DNA
1 µl geeigneter 10x Puffer
x Unit Restriktionsendonuklease (Herstellerangaben)

ad 10 µl H₂O

Der Ansatz wurde für 2-3 h im 37°C Wasserbad inkubiert und anschließend in einem Agarosegel analysiert.

Zur präparativen Spaltung wurde mit größeren Volumina gearbeitet und die Parameter hieran angepasst.

3.10 Methoden zur Arbeit mit RNA

3.10.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Zellen aus denen RNA isoliert werden sollte, wurden 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 800-1000 µl TRIzol (Invitrogen) lysiert. Das Zell-Lysat konnte nun bis zur Weiteraufarbeitung bei -80°C eingefroren werden. Zur RNA-Isolierung wurden dann 200 µl Chloroform zugefügt und für 1 min gemischt (Vortex). Nach einer Inkubation von 2-3 min bei Raumtemperatur erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 9.000 Upm (7.500 xg) und 4°C. Die obere wässrige Phase wurde nun zu 500 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Gemischs pipettiert. Nach intensivem Invertieren für mehrere Minuten wurden die Proben bei 14.000 Upm (18.000 xg), 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Präzipitation der RNA wurde die obere wässrige Phase zu 500 µl Isopropanol gegeben und kurz gemischt. Es folgte eine 10 min Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließender Zentrifugation bei 9.000 Upm (7.500 xg) und 4°C für 20 min. Das RNA-Pellet wurde mit 80 % kaltem Ethanol gewaschen und bei 14.000 Upm (18.000 xg) für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Pellet bei 55°C im Heizblock angetrocknet, in 20-30 µl RNase freiem H₂O aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

3.10.2 Isolierung von zytoplasmatischer RNA aus Zellen

Vor der Isolierung von zytoplasmatischer RNA wurden die Zellen 3 x mit kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 400 µl NP-40 Lysepuffer resuspendiert und für 5 sec gemischt (Vortex). Nach einer 5 min Inkubation auf Eis (Lyse der Zellmembran), erfolgte die Trennung des zytoplasmatischen Überstands von den Zellkernen durch Zentrifugation (14.000 Upm/18.000 xg, 10 sec, 4°C). Der zytoplasmatische Überstand wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß mit 400 µl 8 M GTC-Puffer überführt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben auf ein 5,7 M Cäsiumchloridkissen (500 µl) in einem Beckman TLA 100.2 Zentrifugenröhrchen geschichtet und in einer Beckman Ultrazentrifuge (Optima TLX) für 2,5 h bei 100.000 Upm (435.000 xg) und 25°C zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen und die pelletierte RNA in 300 µl RNase freiem H₂O gelöst werden. Zusätzlich wurde die RNA mit 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Nach einer 15 min Zentrifugation bei Raumtemperatur und 14.000 Upm (18.000 xg) wurde der Überstand zu 30 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 gegeben und mit 750 µl eiskaltem Ethanol

versetzt. Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei -20°C . Die gefällte RNA wurde 20 min bei 4°C und 16.400 Upm (25.000 xg) abgefugt, mit 80 % EtOH gewaschen, im Heizblock bei 50°C angetrocknet und in 15-25 μl RNase freiem H_2O gelöst.

3.10.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA erfolgte in einem Spektralphotometer bei OD 260 nm/280 nm in einer Quarzküvette. Als Nullwert wurde das jeweilige Lösungsmittel der RNA verwendet.

Eine OD_{260} von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 40 mg/ml RNA.

3.10.4 Northern Blot Analyse

Die Auftrennung der RNA erfolgte über ein denaturierendes 0,7 %-Agarosegel (0,7 g Agarose, 63 ml DEPC- H_2O , 17 ml Formaldehyd, 20 ml MOPS). Hierbei wurde das Gel zuerst für 1 h bei 50 V und anschließend für ungefähr 4 h bei 40 V unter Spannung gesetzt. Die im Agarosegel aufgetrennte RNA wurde mit Hilfe des unten abgebildeten Blot-Aufbaus (Abb. 3.1) über Nacht auf eine *Hybond-N*-Membran übertragen.

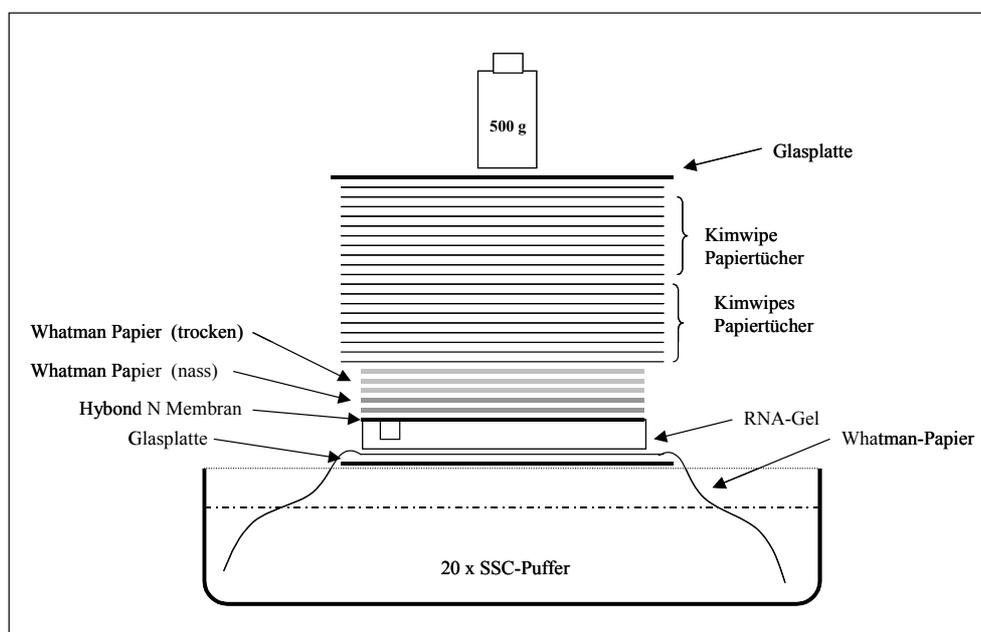


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau eines Northern Blots.

Die so geblottete RNA wurde mit Hilfe eines UV-Stratalinkers (Stratagene GmbH, Heidelberg) auf der Membran fixiert. Zur Detektion der drei HIV-RNA Typen wurde eine *nef*-Sonde verwendet. Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dCTP}$,

welches mit Hilfe eines *Random Primed DNA-Labeling Kits* (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben in die Sonde eingebaut wurde. Um die spezifische Sonde von nicht eingebauten, radioaktiven Nukleotiden zu trennen, wurde diese über eine G-50 Micro-Säule (Amersham) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Im Anschluss an die Hybridisierung (16 h, 65°C) erfolgten drei Waschschrte mit Hochsalzpuffern, um unspezifisch gebundene Oligonukleotide zu entfernen. Die spezifisch gebundenen und radioaktiv markierten Proben wurden durch Autoradiographie detektiert.

3.11 Protein-Biochemische Methoden

3.11.1 Protein-Mengenbestimmung nach Bradford (quantitativ)

Um die Proteinmenge in einem Zell-Lysat anhand des Bradford-Test (Biorad) zu ermitteln, musste zuerst eine Eichkurve mit Hilfe bekannter BSA Mengen (1–7 mg/ml) erstellt werden. Hierzu wurden je 2 µl der BSA-Lösung zu 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz gegeben. Nach 10 min Inkubation konnten die Eichpunkte spektrophotometrisch ermittelt werden. Als Referenz diente hier die Absorption eines 1:5 verdünnten Bradford-Reagenz. Der Koeffizient zur Bestimmung der Proteinkonzentration ergibt sich aus der Konzentration der Eichpunkte dividiert durch die Absorption bei OD 595 nm. Zur Protein-Mengenbestimmung eines Lysats wurden 2 µl hiervon zu 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ungefähr 10 min wurde anhand der Absorption bei OD 595 nm und dem Eichkurvenkoeffizienten der Proteingehalt bestimmt.

3.11.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel erfolgt ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht. Hier wird in Abwandlung zu Laemmli [110] zusätzlich ein diskontinuierliches Puffersystem eingesetzt, um eine verbesserte Auftrennung zu erreichen. Das SDS-Gel besteht je nach Größe der Proteine aus einem 7-12 % Trenngel und einem 4 % Sammelgel (Zusammensetzung der Gele siehe Materialteil). Das Gießen der Gele erfolgte in einer Proteingelkammer der Firma BioRad (München). Um eine gerade Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel zu erlangen, wurde letzteres sofort nach dem Gießen mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels, wurde der Alkohol gründlich entfernt und das Sammelgel gegossen. Auspolymerisierte SDS-Gele konnten in

feuchten Tüchern und Frischhaltefolie bei 4°C gelagert werden. Vor dem Auftragen wurden alle Proteinlysate mit 1 x Laufpuffer versetzt und nochmals für 4 min bei 99°C gekocht. Die Auftrennung erfolgte bei 20 mA in 1 x Laufpuffer, wobei die Dauer der Elektrophorese der gewünschten Trennung angepasst wurde.

3.11.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Eine Anfärbung der SDS-Gele erfolgte für mindestens 20 min in Coomassie-Färbelösung. Nach Entfernen der Färbelösung wurde das Gel kurz in Wasser geschwenkt und solange mit Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die angefärbten Banden konnten nun zwischen zwei Klarsichtfolien gescannt werden. War das SDS-Gel mit radioaktiv markierten Proteinen (^{35}S , ^{14}C) beladen, so wurde es nach dem Entfärben nochmals 30 min mit *Amplify* (Amersham) behandelt. Die Trocknung der Gele erfolgte bei 80°C je nach deren Größe für 20–60 min in einem Vakuumtrockner der Firma Hofer.

3.11.4 Western Blot Analyse

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine, wurden durch das *Semi-Dry-Blot*-Verfahren (BioRad, München) auf eine Protean-Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll) übertragen. Der Aufbau des Blots gestaltete sich folgendermaßen: Anode – 3 x Whatman-3MM-Papier – Nitrocellulosemembran – SDS-Polyacrylamidgel – 4 x Whatman-3MM-Papier – Kathode. Das Whatman-Papier, das Gel und die Nitrocellulosemembran wurden zuvor in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte zuerst für 10 min bei 10 V und anschließend je nach Proteingröße für 20–40 min bei 20 V. Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen (Blocken), wurde die Membran für 1 h in 10 % Milchpulver (gelöst in TBS) inkubiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit einem primären Antikörper bei 4°C auf einer Wippe. Die Antikörper wurden je nach Herstellerangaben bzw. nach Austestung, in 5 % Milchpulver/TBS/0,05 % Tween verdünnt. Die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugiertem Sekundäntikörper erfolgte in 5 % Milchpulver/TBS/0,05 % Tween bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach erneuten Waschsritten in TBS/0,05 % Tween (3 x 30 min) wurden die Antikörper-beladenen Proteine mittels Chemilumineszenz visualisiert. Hierzu wurde entweder eine frisch hergestellte Entwicklerlösung oder ein sensitiver ECL-Kit der Firma Pierce verwendet. Das entstehende Lichtsignal wurde mittels Autoradiographie nach verschiedenen Expositionszeiten ausgewertet.

Die Membran konnte nach erneutem Blocken zur Detektion mit einem anderen spezifischen Antikörper wieder verwendet werden, wobei die Block-Lösung nun Natriumazid enthielt, um die Peroxidase der gebundenen Sekundärantikörper zu inaktivieren.

3.11.5 Immunpräzipitation von Proteinen aus adhärennten Zellen

Die Zellen wurden zunächst in kaltem PBS mit einem Zellschaber von der Platte abgeschabt und bei 2.500 Upm (600 xg), 4°C für 3 min zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde das Zellpellet in 300 µl RIPA-Puffer (0,1 % SDS, Proteaseinhibitoren) gleichmäßig resuspendiert. Die Zell-Lyse erfolgte für 30 min auf Eis. Anschließend wurde das Lysat bei 16.000 Upm (24.000 xg) und 4°C für 15 min abzentrifugiert und der Überstand zu 40 µl Protein A-Sepharose gegeben. Durch eine Inkubation von 1 h bei 4°C auf einem Drehrad, wurden unspezifisch Sepharose bindende Proteine aus dem Lysat entfernt. Der Überstand wurde nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (1.000 Upm/100 xg, 4°C, 1 min) zur Protein-Mengenbestimmung nach Bradford verwendet. Nachdem alle Proben auf gleiche Proteinkonzentrationen und Volumina (mit RIPA-Puffer) eingestellt worden waren, konnte der spezifische Antikörper (1:100) hinzugefügt werden. Während einer Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad binden die Proteine spezifisch an den Antikörper, sodass anschließend die eigentliche Kopplung des Antikörpers an 40 µl Protein A-Sepharose erfolgen konnte. Hierzu wurde das Antikörper/Protein/Protein A-Sepharose Gemisch für eine weitere Stunde auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 ml RIPA-Puffer, wurden die Sepharose-*Beads* mittels einer Hamiltonspritze trocken gesaugt, mit 50 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 99°C für 5 min aufgekocht. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE und der Nachweis dieser durch Autoradiographie.

3.11.6 p24 Antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit Hilfe dieses Assays konnte im zellfreien Kulturüberstand HIV-infizierter Zellen die Konzentration des p24-Kapsidproteins bestimmt werden. Zur Inaktivierung von infektiösen Virusüberständen wurden die Proben mit 10 % SPDL bzw. 10 % Triton X-100 (Stock 5 %) versetzt (z.B. 50 µl Inaktivierungslösung + 450 µl Virusüberstand).

Es handelt sich hierbei um ein *Sandwich*-ELISA, bei welchem zuerst ein gegen das p24-Kapsidprotein gerichteter Antikörper (mα183) auf eine Flachbodenplatte mit 96 Vertiefungen (*Immuno Plate, MaxiSorp Surface*) gebunden wurde. Hierzu wurden pro Platte 200 µg mα183

in 10 ml PBS verdünnt und zu je 100 µl pro Vertiefung aufgetragen. Nach einer Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit je 200 µl PBS/0,05 % Tween pro Vertiefung. Zur Beseitigung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen, erfolgte im Anschluss eine 2 h Inkubation bei 37°C mit je 200 µl PBS/10 % NKS pro Vertiefung. Nach drei weiteren Waschschriften (200 µl PBS/0,05 % Tween) wurden die inaktivierten Zellkulturüberstände in geeigneten Verdünnungen zu je 100 µl pro Vertiefung auf die beschichteten Platten aufgetragen. Analog wurde ein Standard mit definierten Kapsidmengen (4-0,0625 ng, Duplikate) aufgetragen. Während einer weiteren Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, konnten die Kapsidproteine spezifisch an den Erstantikörper binden. Nach drei weiteren Waschzyklen mit PBS/0,05 % Tween wurde ein weiterer gegen das Kapsidprotein gerichteter Antikörper (α CA) zugegeben. Pro Platte wurden hier 10 ml 10 % NKS (in PBS) mit 100 µl PBS/10 % Tween und 10 µl α CA gemischt und 100 µl in jede Vertiefung pipettiert. Nach einer 1 h Inkubation bei 37°C, wurden ungebundene Antikörper durch erneutes Waschen (s.o.) entfernt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation (1 h, 37°C) mit einem anti-rabbit-Peroxidase Antikörper. Von diesem wurden pro Platte 5 µl in 10 ml 10 % NKS und 100 µl PBS/10 % Tween gelöst und 100 µl pro Vertiefung aufgetragen. Nach erneutem Waschen wurde die Platte mit entionisiertem Wasser geflutet und trocken geklopft. Durch Zugabe von 100 µl Tetramethylbenzidin-Lösung pro Vertiefung (TMB; 10 ml 0,1 M Natriumacetat-Puffer pH 6,0; 100 µl TMB (Stock 10 mg/ml DMSO); 2 µl H₂O₂) wurde die Peroxidase in einen blauen Farbstoff umgesetzt. Nach 5 min erfolgte der Reaktionsstopp mit 50 µl 0,5 M Schwefelsäure pro Vertiefung, was zu einem sofortigen Farbumschlag von blau nach gelb führte. Die Extinktion konnte anschließend bei OD 450 nm/560 nm in einem ELISA-Lesegerät gemessen werden.

Zur Bestimmung der p24-Antigenkonzentrationen aus den Extinktionswerten, wurde mittels der Eichgeraden eine Regressionsgleichung erstellt. Dadurch konnten die Extinktionswerte unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors bestimmten p24-Antigenkonzentrationen (ng/ml) zugeordnet werden.

3.12 Fluoreszenz Analyse

3.12.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz diente zum Nachweis von intrazellulären Proteinen, welche im Fluoreszenzmikroskop bzw. im konfokalen Laser Scanning-Mikroskop sichtbar gemacht werden konnten. Die Zellen wurden hierfür auf Deckgläschen kultiviert. Infizierte Zellen wurden mit Hilfe von einem Methanol/Aceton-Gemisch (1:1) fixiert. Hierzu wurden die bewachsenen Deckgläschen für 15 min, bei -20°C in einer Methanol/Aceton-Lösung inkubiert. Durch diese Fixierungsmethode werden die Zellen gleichzeitig permeabilisiert, wodurch eine spätere Behandlung mit Triton X-100 nicht mehr benötigt wird. Uninfizierte Zellen wurden durch 3 % Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min, wobei das PBS im zweiten Waschrte zusätzlich 100 nM Glycin enthielt. Glycin reduziert die Eigenfluoreszenz des Paraformaldehyds. Zur Permeabilisierung der Zellmembran, wurden die Objektträger exakt 4 min in PBS/0,1 % Triton X-100 inkubiert und anschließend zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Um den Hintergrund beim späteren Fluoreszenznachweis zu reduzieren, wurden die Zellen für 30 min mit PBS/1 % BSA Lösung versetzt. Zur eigentlichen Antikörperbindung wurden die in PBS/1 % BSA-Lösung verdünnten primären Antikörper als Tropfen (50 µl) auf Parafilm pipettiert und das Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf den Tropfen gelegt. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt von 30 min, gefolgt von dreimaligem waschen mit PBS für je 5 min. Die mit den gewünschten Fluoreszenzfarbstoffen markierten und gegen die primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper, wurden mit PBS/1 % BSA-Lösung verdünnt und in der gleichen Weise, wie oben beschrieben, mit den Deckgläschen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 min, wurden die Zellkerne für 10 min mit Hoechst-Färbelösung (1:300 in PBS; Sigma) bzw. DRAQ5 (1:1000 in PBS; Alexis) angefärbt. Zum vollständigen Entfernen von wasserlöslichen Substanzen, wurden die Deckgläschen einmal kurz mit 100 % Ethanol gespült. Mit Hilfe eines Eindeckmediums (Elvanol) konnten die Deckgläschen anschließend auf einem Objektträger fixiert und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet werden.

4 Ergebnisse Teil I: Inhibition von HIV-1 durch SAM486A

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) ist das einzige bekannte Protein in Säugerzellen, das die außergewöhnliche Aminosäure Hypusine enthält. Diese hochspezifische Modifikation wird durch zwei Katalysereaktionen gebildet (Abb. 4.1). Nach Translation der eIF-5A-mRNA wird durch die Deoxyhypusin-Synthase (DHS) ein Aminobutylrest von Spermidin auf einen spezifischen Lysinrest (Lys⁵⁰) des eIF-5A-Vorläuferproteins übertragen. Es entsteht die eIF-5A-Deoxyhypusin-Zwischenform. In einer zweiten Enzymreaktion wird diese Zwischenform durch die Deoxyhypusin-Hydroxylase (DHH) zur funktionellen eIF-5A-Hypusine-Form hydroxyliert (Kap. 1.10).

Das Polyamin Spermidin ist aufgrund seines Aminobutylrestes essenziell zur Synthese eines aktiven eIF-5A. Spermidin wird innerhalb des Polyaminstoffwechsels aus Putrescin gewonnen. Hierbei spielt das Enzym S-Adenosylmethionin-Decarboxylase eine tragende Rolle [203].

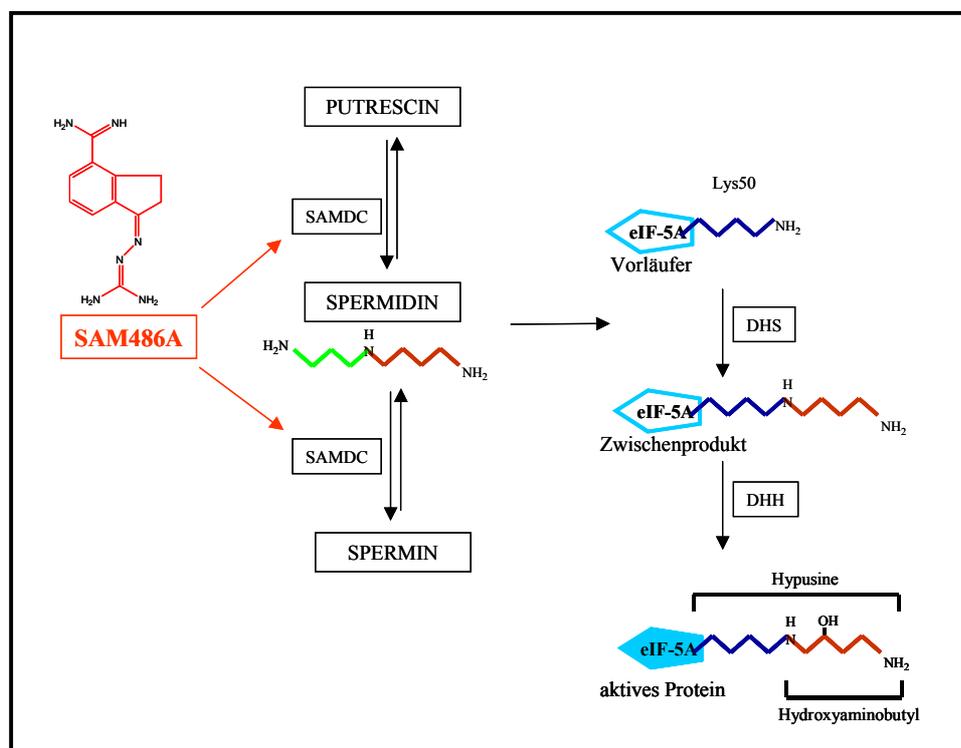


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Polyaminstoffwechsels mit Angriffsstelle von SAM486A und der eIF-5A-Biosynthese.

Durch frühere Veröffentlichungen [105,172,205] ist bekannt, dass SAMDC durch den niedermolekularen Inhibitor, SAM486A (Strukturformel Abb. 4.1) effektiv inhibiert

(IC₅₀: 5 nM) [172] wird. Ebenfalls fand man heraus, dass SAM486A *in vivo* das Wachstum von Tumorzellen signifikant beeinträchtigt [42,72,88,125,131,172].

Funktionelles Hypusin-modifiziertes eIF-5A ist ein essenzieller Kofaktor des viralen HIV-1-Rev-Regulatorproteins [9,84] (Kap. 1.9). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Deoxyhypusin-Synthase (DHS) zu einem Mangel an aktivem eIF-5A führt und dass dadurch die Rev-Aktivität des humanen Immundefizienzvirus inhibiert wird. Dies hat eine Blockade der HIV-1-Replikation zur Folge [78].

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Inhibition von SAMDC durch die Wirksubstanz SAM486A ebenfalls zu einer Blockade der HIV-1 Rev-Transaktivierung führt.

4.1 Einfluss von SAM486A auf den zellulären Stoffwechsel

Polyamine (Ornithin, Putrescin, Spermidin, Spermin) sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt, beispielsweise am Zellwachstum und der Zelldifferenzierung. Inaktiviert SAM486A die Decarboxylase SAMDC, so kommt es zu einem Mangel an essenziellem Spermin und Spermidin, wodurch der zelluläre Stoffwechsel beeinträchtigt werden kann.

Aus diesem Grund musste zu Beginn der Studie zunächst getestet werden, welchen Einfluss SAM486A auf den Metabolismus der eukaryotischen Zelle hat.

4.1.1 Toxizität von SAM486A auf eukaryotische Zellen

Um herauszufinden, in welchen Konzentrationen SAM486A die Vitalität von Zellen beeinflusst, wurden PM1 Zellen mit unterschiedlichen SAM486A-Konzentrationen (0,1 µM bis 0,8 µM) behandelt. Als Kontrolle diente Kulturmedium, in dem die Substanz gelöst war. Über einen Zeitraum von 17 Tagen wurden die Zellen alle drei Tage in neue Kulturschalen umgesetzt und gleichzeitig die Zellvitalität mit Hilfe eines alamarBlue-Assays (Kap. 3.2.5) kontrolliert.

In der folgenden Abbildung (Abb. 4.2) ist zu sehen, dass bis zu einer Konzentration von 0,4 µM keine toxischen Effekte auf die Zellen zu erkennen waren. Der Kurvenverlauf zeigt, dass erst eine Konzentration von 0,8 µM die Zellvitalität ab Tag 6 nach Versuchsbeginn signifikant beeinträchtigte.

Alle weiteren Experimente wurden aufgrund dieser Ergebnisse mit einer maximalen Konzentration von 0,4 µM SAM486A durchgeführt.

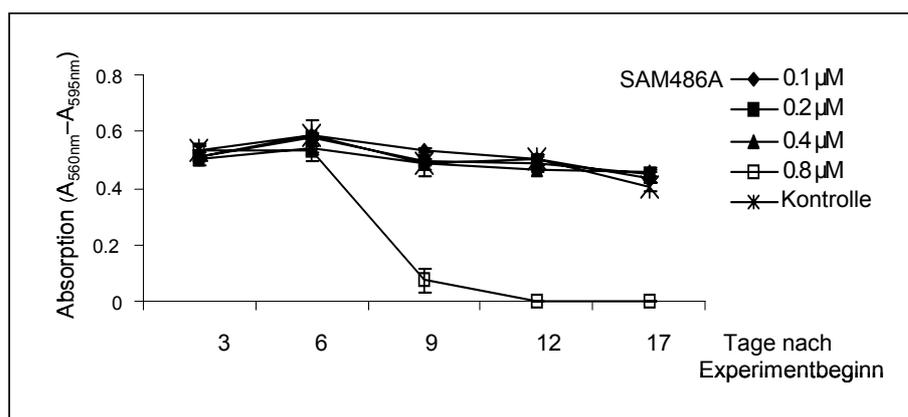


Abb. 4.2: Zellvitalitätstest (AlamarBlue-Assay). PMI Zellen wurden für 17 Tage in verschiedenen Konzentrationen von SAM486A oder Medium (Kontrolle) kultiviert. Dargestellt ist die Absorption des Vitalitätstests an den Tagen 3, 6, 9, 12 und 17.

4.1.2 Einfluss von SAM486A auf die Apoptose von Zellen

Um auszuschließen, dass die Substanz in Zellen Apoptose induziert, wurden PBMCs aus gesundem Spenderblut isoliert und für 12 Tage in 0,4 μM SAM486A bzw. Medium (Kontrolle) inkubiert. Die PBMC-Kulturen wurden jeden dritten Tag mit frischem Medium mit und ohne SAM486A und mit IL-2 versehen. Mit Hilfe eines Annexin V-FITC Kits (Kap. 3.2.6) wurde am Tag 6 (Daten nicht gezeigt) und Tag 12 nach Substanzgabe der Anteil der nekrotischen (FITC⁺/PI⁺), apoptotischen (FITC⁺/PI⁻) und toten (FITC⁻/PI⁺) Zellen bestimmt. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).

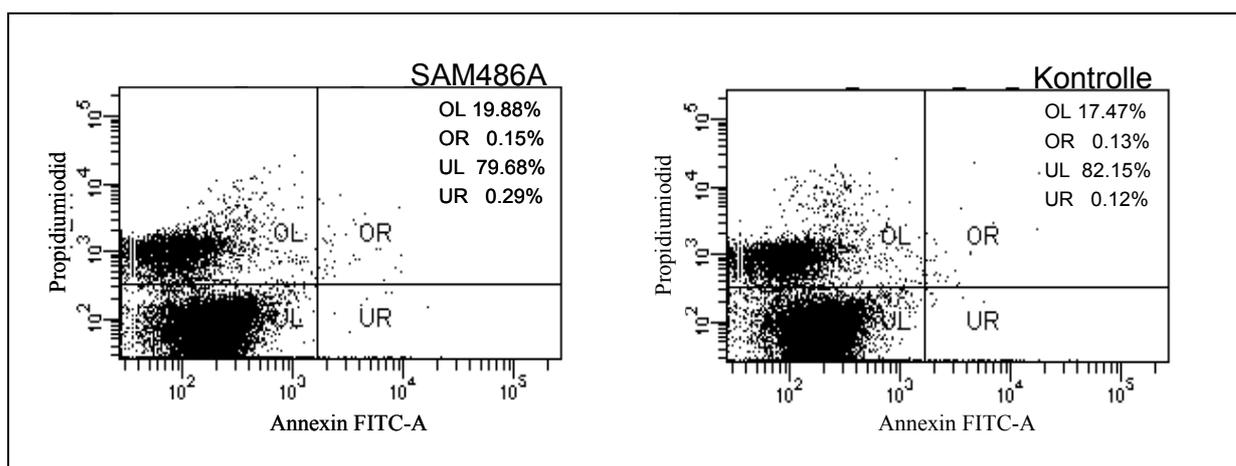


Abb. 4.3: Apoptose-Assay. PBMCs aus einem gesunden Spender wurden für 12 Tage in Anwesenheit von 0,4 μM SAM486A oder Medium (Kontrolle) kultiviert. Die FACS-Analyse der nekrotischen, apoptotischen und toten Zellen erfolgte nach Färbung mit Propidiumiodid und Annexin-gekoppeltem FITC.

Aus der Abb. 4.3 geht hervor, dass sich der Gehalt der apoptotischen (UR), nekrotischen (OR) und toten (OL) Zellen der mit SAM486A behandelten Probe kaum von dem der

Kontrollzellen unterscheidet. Eine Inhibition der Decarboxylase SAMDC durch den Wirkstoff SAM486A induziert in der getesteten Konzentration von 0,4 μM folglich keine Apoptose.

4.1.3 Einfluss von SAM486A auf den Zellzyklus

Als letzter Aspekt dieser Versuchsreihe war es wichtig zu überprüfen, ob der Zellzyklus durch die Substanz beeinträchtigt wird. Hier wurden PM1 Zellen verwendet, die sieben Tage in 0,4 μM SAM486A inkubiert wurden. Am Tag 3 nach Versuchsbeginn wurden die Zellen passagiert und in Medium mit frischer Substanz weiterkultiviert. Kontrollzellen wurden ausschließlich in Medium inkubiert.

Die Visualisierung des Zellzyklusphasenverlaufs wurde mit Hilfe eines *Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kits* oder einer Propidiumiodidfärbung (Kap. 3.2.7) mit anschließender FACS-Analyse durchgeführt.

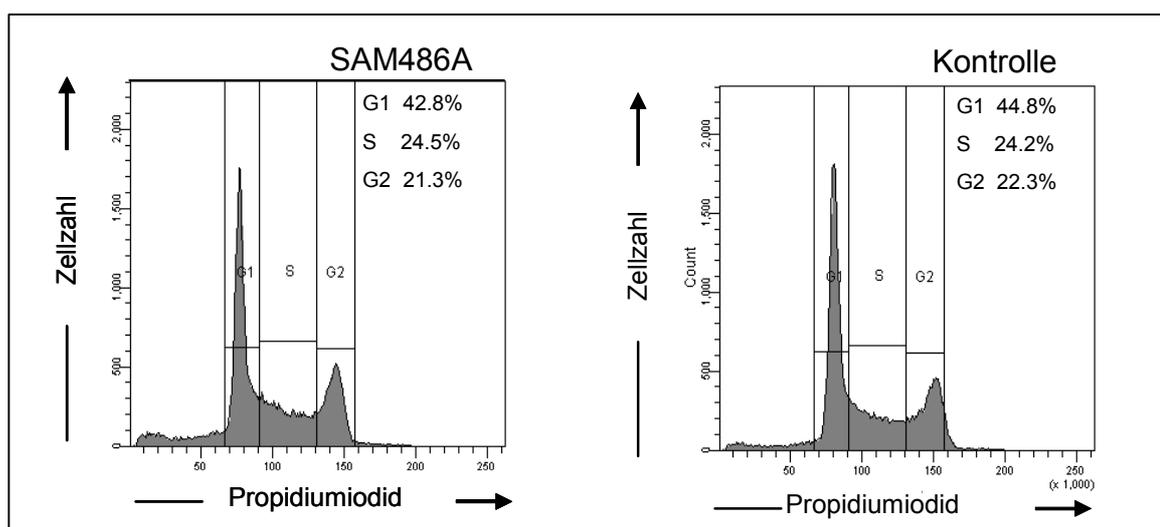


Abb. 4.4: Zellzyklusanalyse. PM1 Zellen wurden für sieben Tage in Anwesenheit von 0,4 μM SAM486A oder Medium allein (Kontrolle) kultiviert. Der Zellzyklusphasenverlauf wurde nach Propidiumiodidfärbung durch eine FACS-Analyse bestimmt.

Vergleicht man die Zellzyklusphasen der mit SAM486A behandelten und der unbehandelten Zellen in Abb. 4.4, so ist weder in der G1-, S- noch in der G2-Phase ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proben zu erkennen.

Schlussfolgerung

SAM486A zeigt bei einer Konzentration von 0,4 μM keinen negativen Einfluss auf den Stoffwechsel der in den Experimenten verwendeten eukaryotischen Zellen. In dieser

Konzentration induziert der Wirkstoff keine Apoptose, wirkt nicht toxisch und zeigt keinen Einfluss auf den Zellzyklus.

4.2 Inhibition der HIV-1-Replikation durch SAM486A

Sollte durch die Inhibition von SAMDC ein Mangel an aktivem eIF-5A entstehen, müsste die Replikation sowohl von M-tropen als auch von T-tropen Viren inhibiert werden. Diese Annahme wurde in den folgend beschriebenen Infektionsexperimenten untersucht.

4.2.1 Inhibition von M-tropen HI-Viren

M-trophe Viren sind relativ langsam replizierende humane Immundefizienzviren, welche hauptsächlich Makrophagen über den Korezeptor CCR5 infizieren können.

Hier wurden PM1 Zellen mit 2,5 ng (p24-Antigen) des M-tropen (R5) HIV-1-Stammes BaL [62], wie unter Kapitel 3.6.1 beschrieben, infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen in 0,1 μ M, 0,2 μ M und 0,4 μ M SAM486A kultiviert. Alle drei Tage erfolgte die Messung der Zellvitalität (alamarBlue-Assay) und die Entnahme von Zellkulturüberstand zur p24-Antigenbestimmung (Kap. 3.11.6). Gleichzeitig wurden die Zellen passagiert und jeweils mit frischem Medium mit bzw. ohne SAM486A in den oben genannten Konzentrationen weiterkultiviert.

Mit Hilfe der p24-Antigenmessung wurde die Inhibition (in % angegeben) der Virusreplikation innerhalb der SAM486A-behandelten Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle ermittelt. In Abb. 4.5 sind die Ergebnisse von Tag 6 und 9 nach Infektionsbeginn dargestellt.

Aus der Abb. 4.5 A geht hervor, dass SAM486A sehr gute antivirale Eigenschaften besitzt. Genauer betrachtet zeigen die Substanzkonzentrationen von 0,2 μ M und 0,4 μ M eine Inhibition der Virusreplikation von ≥ 98 %, verglichen mit der Viruslast der Kontrolle. Erst eine Konzentration von 0,1 μ M hemmt die Virusvermehrung (siehe Tag 9) nicht mehr signifikant.

Gleichzeitig bestätigt die Messung der Zellvitalität in Abb. 4.5 B, dass SAM486A in den aufgezeigten Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen hat.

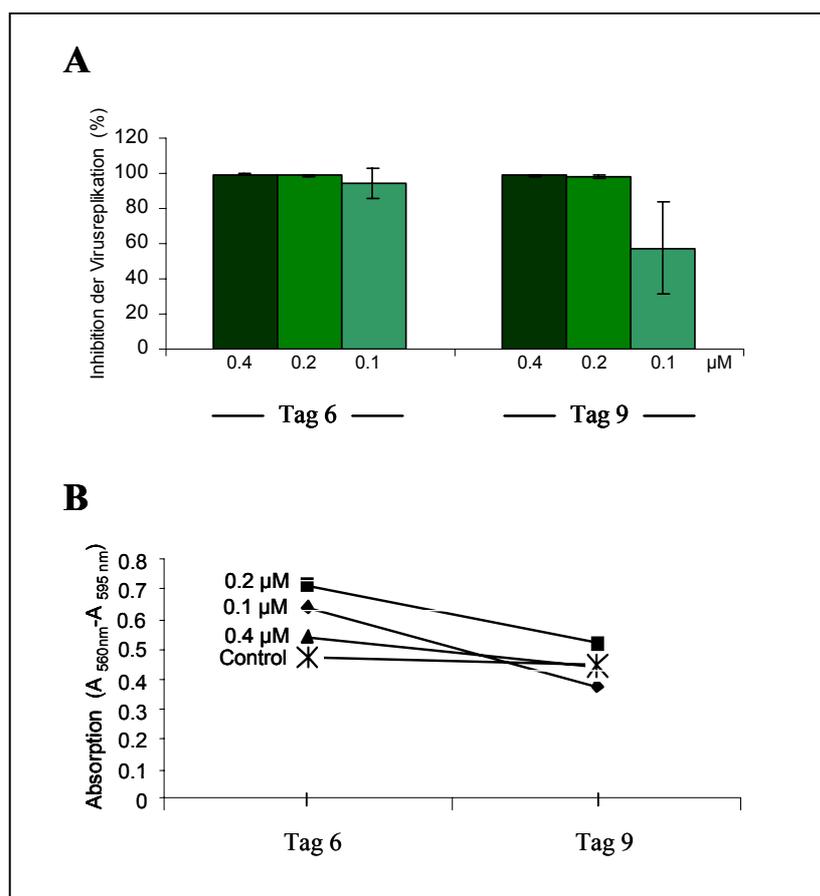


Abb. 4.5: Inhibition der HIV-1 BaL-Replikation durch SAM486A. HIV-1 BaL-infizierte PM1 Zellen wurden in den aufgezeigten SAM486A-Konzentration (0,1 µM, 0,2 µM und 0,4 µM) oder in Medium (Kontrolle) kultiviert. (A) Die prozentuale Inhibition in den Substanz-behandelten Zellen ist an den Tagen 6 und 9 nach der Infektion dargestellt. (B) Die Zellvitalität (alamarBlue-Assay) zu diesen Zeitpunkten zeigt die untere Grafik.

In diesem Experiment wurde parallel zur p24-Antigenmessung am Tag 6 eine Western Blot Analyse (Kap. 3.11.4) aus dem Lysat behandelter bzw. unbehandelter Zellen durchgeführt. Verwendet wurde hier ein Antikörper, welcher das p24^{Gag}-Protein und den unprozessierten p55^{Gag}-Vorläufer erkennt. Gag wird von der ungespleißten RNA translatiert und ist somit von der Rev-Transaktivierung abhängig. Das heißt, dass die *gag*-spezifische virale mRNA bei Hemmung von Rev nicht aus dem Zellkern transportiert wird und deshalb kein Gag-Protein an den zytoplasmatischen Ribosomen translatiert werden kann. Als Gel-Ladekontrolle fungierte hier α -Tubulin.

Aus Abb. 4.6 geht hervor, dass unter SAM486A (Spur 1) deutlich weniger p24^{Gag}- und p55^{Gag}- Protein vorhanden ist als in der Kontrollkultur (Spur 2). Dies bestärkt die Hypothese, dass es durch SAM486A zur Einschränkung der Rev-Aktivität kommt.

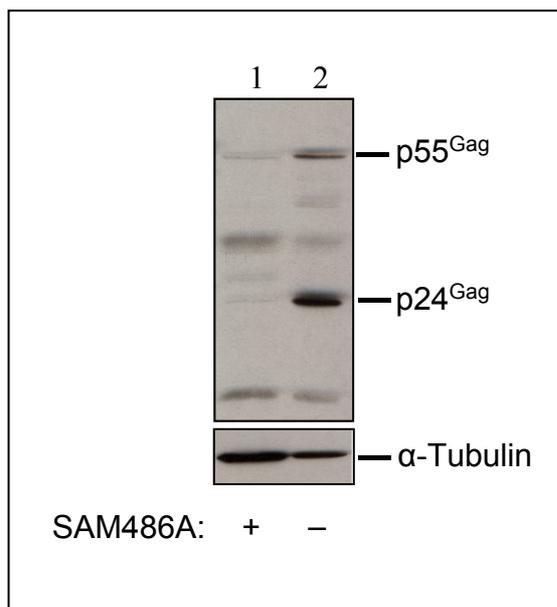


Abb. 4.6: Gag-spezifische Western Blot Analyse. Am Tag 6 nach Infektionsbeginn wurden die mit 0,4 μM SAM486A-behandelten (Spur 1) und die unbehandelten (Spur 2) Zellen lysiert und der p24^{Gag}- und p55^{Gag}-Gehalt im Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

4.2.2 Inhibition von T-tropen Viren

T-trophe (X4) HI-Viren sind im Gegensatz zu M-tropen HI-Viren schnell replizierend, sie bilden Synzytien und infizieren bevorzugt T-Lymphozyten über den Korezeptor CXCR4. Um zu untersuchen, ob SAM486A auch in der Lage ist, die Replikation des Laborstammes HIV-1 NL4-3 (T-troph) [1] zu inhibieren, wurden PM1 Zellen für fünf Tage mit dem Wirkstoff SAM486A präinkubiert. Nachdem die Zellkulturen auf eine gleiche Zellzahl eingestellt worden waren, wurden sie mit 9 ng HIV-1 NL4-3 infiziert (Kap. 3.6.1). An den Tagen 3, 6 und 9 wurden die Zellen passagiert, Überstand zur p24-Antigenbestimmung entnommen und die Vitalität der Zellen überprüft (almarBlue-Assay).

Vergleicht man in Abb. 4.7 A den gemessenen p24-Antigenwert am Tag 10 aus dem Überstand der Kontrolle (rechter, schwarzer Balken), mit dem p24-Antigenwert der mit 0,4 μM SAM486A inkubierten Kultur (linker Balken), so ist eine eindeutige Inhibition zu erkennen. In einer Konzentration von 0,2 μM ist SAM486A (mittlerer, grüner Balken) nicht in der Lage, die Virusreplikation vollständig zu inhibieren.

In Abb. 4.7 B ist die Vitalität der behandelten und infizierten Zellen dargestellt. Vergleicht man den p24-Antigengehalt mit der Vitalität, so verhalten sich diese invers zueinander. Dieses Ergebnis kommt dadurch zustande, dass die Zellkulturen mit hoher Viruslast (Kontrolle) wegen der starken Virusvermehrung schneller absterben, als die Zellkultur, in der die Virusvermehrung gehemmt ist (SAM486A-behandelte Zellen).

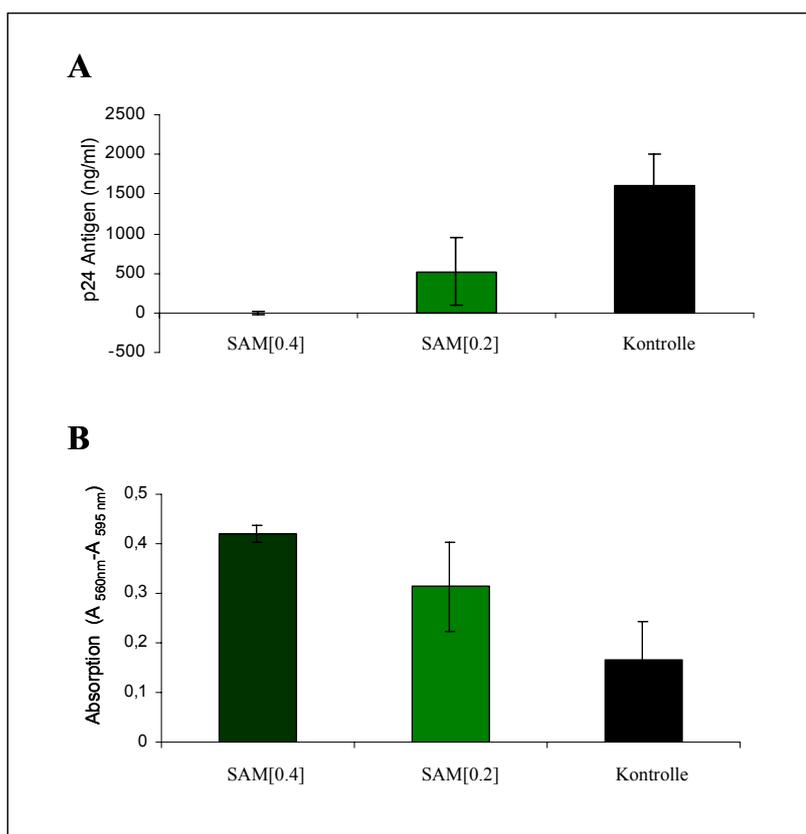


Abb. 4.7: Inhibition der HIV-1 NL4-3-Replikation durch SAM486A. HIV-1 NL4-3-infizierte PM1 Zellen wurden in den aufgezeigten SAM486A-Konzentration (0,2 μ M und 0,4 μ M) oder in Medium (Kontrolle) kultiviert. Dargestellt sind in (A) der p24-Antigengehalt (ng/ml) der Substanz-behandelten und unbehandelten Zellen am Tag 10 nach der Infektion und in (B) die Zellvitalität (alamarBlue-Assay) am Tag 10 nach Infektionsbeginn.

4.2.3 Neuinfektion und Integration

Um sicherzustellen, dass es durch die Behandlung mit SAM486A nicht zu einer Blockade der Neuinfektion bzw. Integration kommt, wurde die extrachromosomal zirkuläre virale DNA (Parameter für eine Neuinfektion) mittels PID-PCR [79] (Kap. 3.9.5.1) und die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom der Zelle mit Hilfe einer Alu-PCR (Kap. 3.9.5.2) kontrolliert. Hierzu wurden PM1 Zellen für sieben Tage in 0,4 μ M SAM486A bzw. Medium präinkubiert und gleiche Zellzahlen mit 4 ng HIV-1 BaL infiziert. Genomische DNA wurde mittels DNazol (Kap. 3.9.4) von uninfizierten (UN) und infizierten Zellen jeweils 30, 60, 90, 120 und 180 min nach Infektionsbeginn isoliert. Mittels PCR konnte nun die präintegrative virale DNA (PID) detektiert und im Agarosegel (Kap. 3.9.6) sichtbar gemacht werden. Als interne Kontrolle diente eine β -Globin-PCR mit gleichen Ausgangsmengen an genomischer DNA.

Aus Abb. 4.8 geht deutlich hervor, dass zum gleichen Zeitpunkt nach Infektionsbeginn virale präintegrative DNA (PID) sowohl in den mit Substanz-behandelten (SAM486A) als auch in den unbehandelten Zellen (Kontrolle) zu finden ist. Aus dieser Beobachtung folgt, dass

SAM486A weder die Neuinfektion von Zellen noch die reverse Transkription der viralen RNA hemmt.

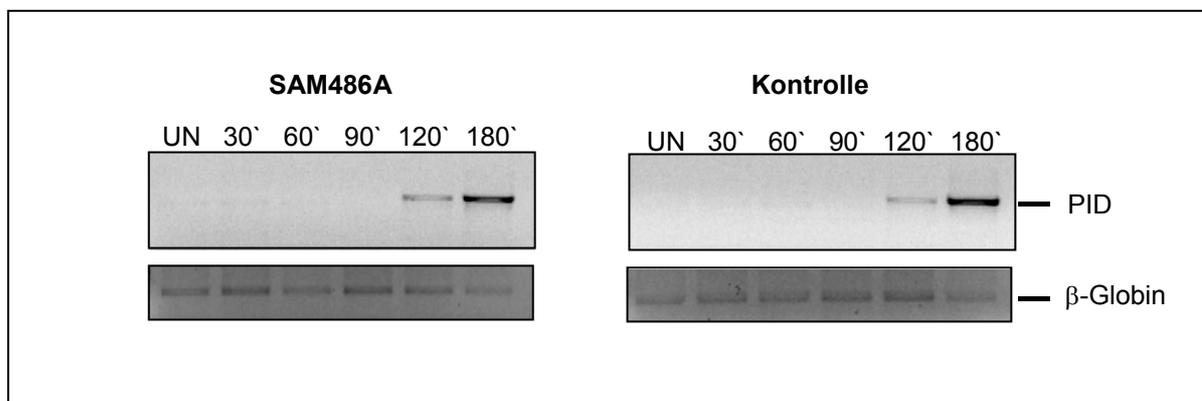


Abb. 4.8: Neuinfektion unter SAM486A. PM1 Zellen wurden für sieben Tage in Anwesenheit von 0,4 μ M SAM486A oder Medium kultiviert und anschließend mit HIV-1 BaL infiziert. Genomische DNA wurde von uninfizierten (UN) und von infizierten Zellen 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten nach der Infektion isoliert. Mittels PCR wurde die extrachromosomale 1-LTR-enthaltende zirkuläre präintegrative DNA (PID) detektiert.

Zudem wurde überprüft, ob es zu einer Integration des Provirus in das Wirtszellgenom kommt. Hierzu wurden die nach der Neuinfektionskinetik verbleibenden Zellen ausgesät und für sechs weitere Tage in Medium mit und ohne SAM486A (0,4 μ M) kultiviert. Nach drei Tagen wurde aus einem Teil der Zellen genomische DNA isoliert, wohingegen die restlichen Zellen bis Tag 6 weiter kultiviert wurden. Dadurch wurde zusätzlich die Inhibition der Virusreplikation überprüft. Mit der genomischen DNA von Tag 3 wurde eine Alu-PCR angefertigt.

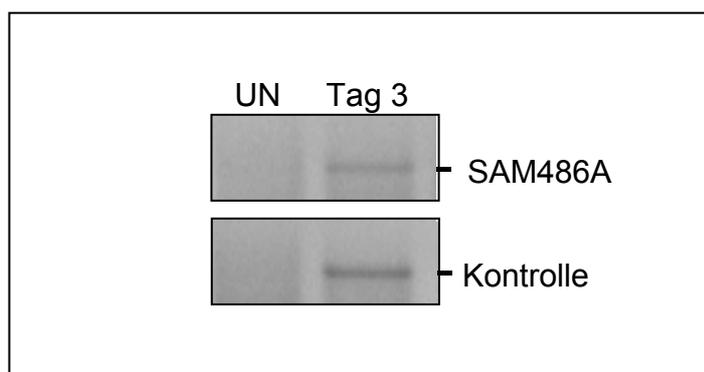


Abb. 4.9: Integration der proviralen DNA. Genomische DNA wurde von uninfizierten (UN) und von für drei Tage (Tag 3) infizierten Zellen isoliert und mit Primern, spezifisch für den HIV-1 BaL LTR und für die chromosomalen Alu-Sequenzen, mittels PCR amplifiziert.

Wie Abb. 4.9 zu entnehmen ist, integriert die virale DNA in SAM486A-behandelten Zellen in das Wirtszellgenom. Zusätzlich waren am Tag 6 in der SAM486A-behandelten Zellkultur nur

sehr geringe p24-Antigenmengen zu detektieren, wohingegen in den unbehandelten Kulturüberständen eine deutliche Viruslast nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.2.4 Inhibition von multiresistentem HIV-1 FE9

Durch das vermehrte Auftreten von HI-Viren mit multiplen Medikamenten-Resistenzen gehen oftmals wichtige Therapieoptionen verloren. Daher ist es dringend notwendig, neue, verbesserte antiretrovirale Wirkstoffe zu entwickeln, welche auch in der Lage sind, multiresistente HI-Viren in ihrer Vermehrung zu hemmen.

Im folgenden Experiment wurde daher untersucht, ob der Decarboxylase-Inhibitor SAM486A in der Lage ist, auch multiresistente HI-Viren zu inhibieren. Hierzu wurden das Protease- und das Reverse-Transkriptase-Gen eines Patientenisolats (FE9) in HIV-1 NL4-3 inseriert und auf diese Weise ein multiresistentes HI-Virus generiert (NRZ für Retroviren, Erlangen). Der Genotyp wurde mittels DNA-Sequenzierung untersucht und das antiretrovirale Medikamentenprofil (Antivirogramm) durch einen Phänotypischen Resistenztest [210] ermittelt.

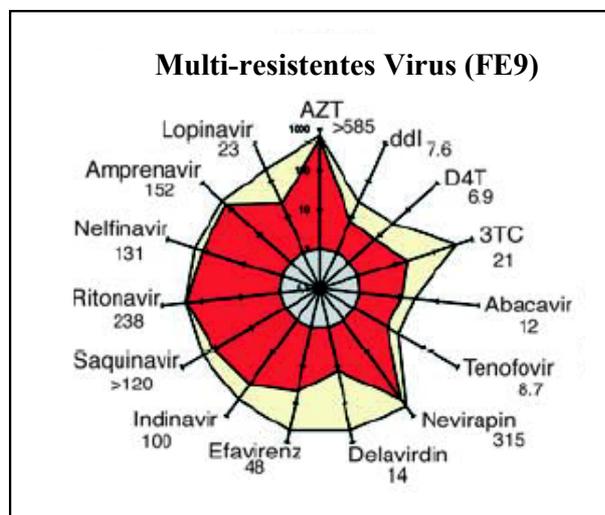


Abb. 4.10: Antivirogramm von FE9 [78].

Eine Darstellung des FE9-spezifischen Phänotyps ist in Abb. 4.10 gezeigt. Der zentrale, graue Bereich zeigt die Sensitivität eines Therapie-sensitiven, nicht-resistenten Kontrollvirus (HIV-1 NL4-3). Die rote Fläche zeigt das Resistenzmuster des FE9-Isolates. Die Werte bei den Abkürzungen der getesteten Medikamente (z.B. AZT >585) geben an, um welchen Faktor die Konzentration des jeweiligen Medikamentes in dieser Kultur gesteigert werden müsste,

um 50 % der FE9-Virusreplikation zu inhibieren. Der gelbe Bereich stellt die in diesem Test maximal erreichte Substanzresistenz dar [78].

In 0,4 μM SAM486A bzw. in Medium präinkubierte PM1 Zellen wurden einen Tag vor der Infektion mit Polybren versetzt. Durch das Polybren wird die Anlagerung der Viren an die Wirtszelle erleichtert. Die infizierten Zellen wurden über 18 Tage hinweg in Medium mit und ohne Wirksubstanz (0,4 μM) inkubiert. Auch hier wurde jeden dritten Tag Überstand zur p24-Antigenmessung entnommen, die Zellen passagiert und ein alamarBlue-Assay durchgeführt.

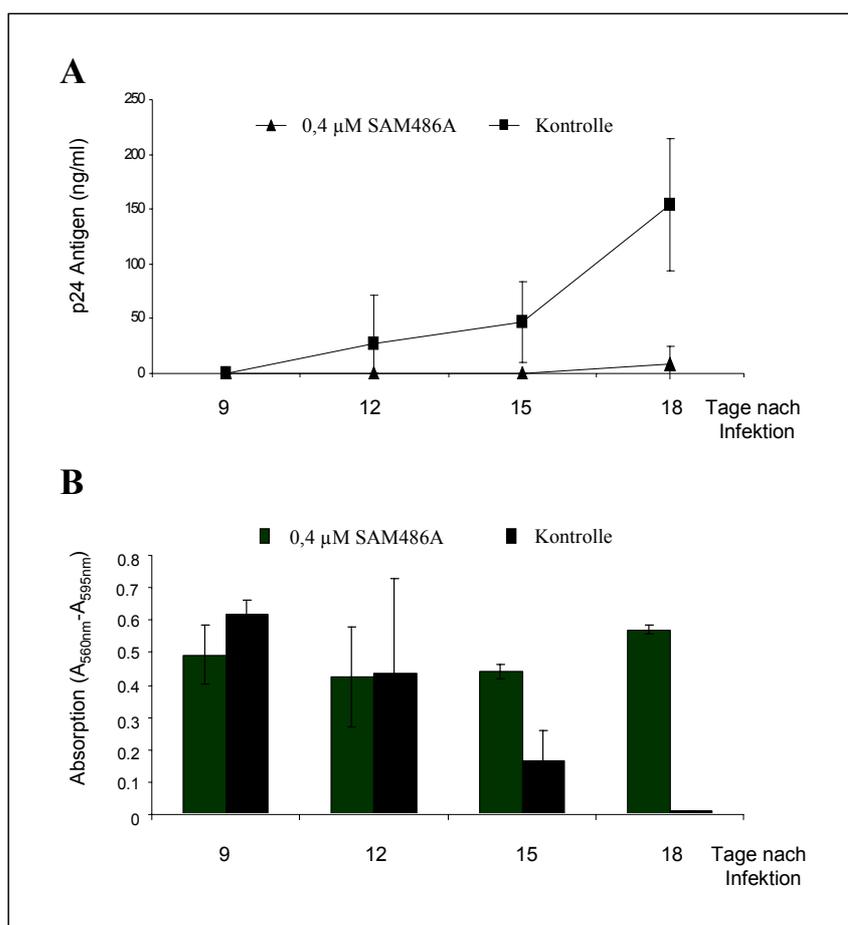


Abb. 4.11: Inhibition eines multiresistenten HI-Virus (FE9) durch SAM486A. Präinkubierte PM1 Zellen wurden mit dem multiresistenten FE9 Isolat infiziert und über 18 Tage in Anwesenheit von 0,4 μM SAM486A oder Medium (Kontrolle) allein kultiviert. Unter (A) ist der p24-Antigengehalt (ng/ml) im Überstand am Tag 9, 12, 15 und 18 nach Infektionsbeginn dargestellt. (B) Die Zellvitalität wurde parallel mittels alamarBlue-Assay kontrolliert.

Das Ergebnis in Abb. 4.11 A zeigt den p24-Antigengehalt (ng/ml) der Kulturüberstände. Es ist klar zu erkennen, dass die Viruslast in den Kontrollzellen kontinuierlich anstieg, wohingegen in den SAM486A-behandelten Zellen über 18 Tage hinweg nur sehr geringe p24-Antigenwerte zu messen waren.

Die FE9-infizierten Zellen zeigten eine mit den NL4-3-infizierten Zellen vergleichbare Vitalität (B). Allerdings kam es auch hier aufgrund der extremen Virusvermehrung ab dem

Tag 15 zum Absterben der unbehandelten und dadurch ungeschützten Zellen. Die mit SAM486A-behandelten Zellen dagegen waren bis zum Ende des Experiments konstant vital.

Schlussfolgerung

SAM486A ist in der Lage, die Replikation von M- und T-tropen HI-Viren deutlich zu hemmen, ohne eine Neuinfektion der Zellen bzw. die Integration der viralen DNA in das Wirtszellgenom zu beeinflussen. Besonders hervorzuheben ist die Beobachtung, dass die Substanz auch in der Lage ist, die Vermehrung eines Therapie-resistenten Virus (FE9) zu blockieren.

4.3 Potenzielle Resistenzbildung gegen SAM486A (Langzeitexperiment)

HI-Viren bilden durch hohe Mutationsraten (1:1000-1:10000 pro Base und Replikationszyklus [126]) überwiegend Resistenzen gegen Medikamente aus, die spezifisch gegen virale Proteine gerichtet sind. Da die Substanz SAM486A nicht gegen virale Proteine gerichtet ist, sondern ein zelluläres Protein blockiert, war theoretisch nicht mit einer zügigen Resistenzbildung zu rechnen. Dies sollte im folgenden Experiment überprüft werden.

Hierfür wurden mit HIV-1 BaL infizierte PM1 Zellen über 12 Wochen mit einer suboptimalen Konzentration von 0,1 μM SAM486A kultiviert. Eine Inkubation der infizierten Zellen in einer suboptimalen Konzentration von SAM486A war deshalb notwendig, damit das Virus replizieren und somit auch effizient mutieren konnte.

Nachdem PM1 Zellen mit 2,5 ng HIV-1 BaL infiziert worden waren, wurden das Kulturmedium mit 0,1 μM SAM486A versetzt und die infizierten Zellen über 12 Wochen hinweg alle 2-3 Tage passagiert, wobei das Kulturmedium immer den Wirkstoff (0,1 μM) enthielt. Einmal pro Woche wurde ein Aliquot zellfreien Kulturüberstandes bei -80°C eingefroren.

Nach Bestimmung des p24-Antigengehalts des filtrierten Virusüberstandes aus der 12. Woche wurden in 0,4 μM und 0,2 μM SAM486A präinkubierte bzw. unbehandelte Zellen mit 1 ng dieses virushaltigen Kulturüberstandes infiziert. Kultivierung der Zellen, Überstand-Entnahme zur Bestimmung der Viruslast und die alamarBlue-Messung wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

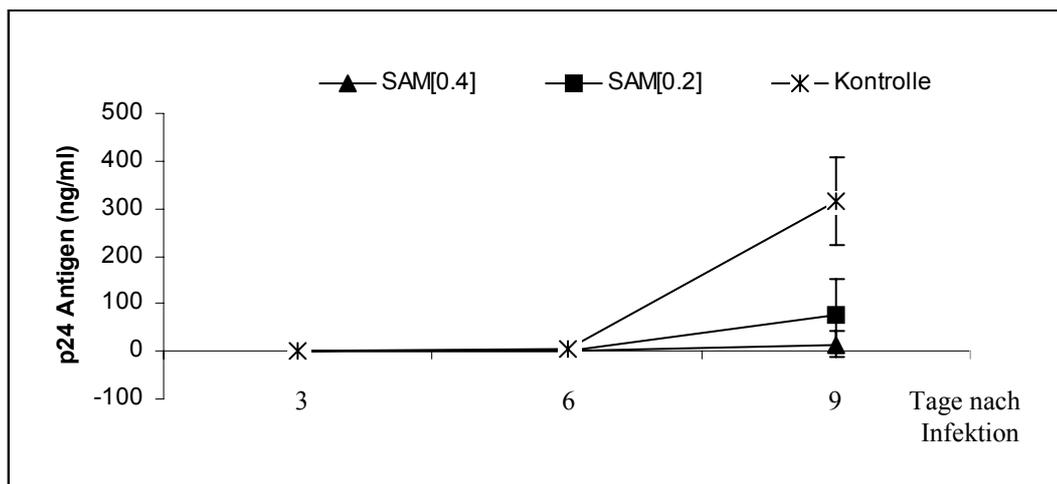


Abb. 4.12: Resistenzbildung unter SAM486A. PM1 Zellen wurden mit HIV-1 BaL infiziert und über 12 Wochen in einer suboptimalen SAM486A-Konzentration ($0,1 \mu\text{M}$) kultiviert. Der virusenthaltende Kulturüberstand der 12. Woche wurde verwendet, um PM1 Zellen neu zu infizieren. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in $0,2 \mu\text{M}$ (SAM[0.2]) und $0,4 \mu\text{M}$ (SAM[0,4]) Substanz oder Medium (Kontrolle) alleine. Die Grafik zeigt den p24-Antigengehalt an den Tagen 3, 6 und 9 nach Infektionsbeginn.

Wie aus dem obigen Schaubild (Abb. 4.12) hervorgeht, bildet das Virus nach einer 12-wöchigen Behandlung mit einer suboptimalen SAM486A-Konzentration keine spezifische Resistenz aus, d.h. die Viren lassen sich auch nach einer Kultivierung über 12 Wochen (in Gegenwart von $0,1 \mu\text{M}$ SAM486A) bei höherer Wirkstoffkonzentration ($0,2 \mu\text{M}$ und $0,4 \mu\text{M}$) deutlich hemmen. Dargestellt ist hier der p24-Antigengehalt (ng/ml) über einen Zeitraum von neun Tagen.

4.4 Inhibition der Hypusin-Modifizierung von eIF-5A

Die posttranslational stattfindende, hochspezifische Hypusin-Modifizierung von eIF-5A findet mittels zweier Enzyme (DHS und DHH) statt und wandelt das inaktive Vorläuferprotein in seine funktionell aktive Form um (Kap. 1.10). Im folgenden Teil der Arbeit sollte analysiert werden, welchen Einfluss die Inhibition der Decarboxylase SAMDC auf die Hypusin-Modifizierung von eIF-5A hat.

Hierzu wurden zunächst, wie unter Kapitel 3.4 beschrieben, mit $0,4 \mu\text{M}$ SAM486A präinkubierte und unbehandelte PM1 Zellen über Nacht zusammen mit $25 \mu\text{Ci}$ [$1,4\text{-}^{14}\text{C}$] Putrescin-Dihydrochlorid inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen lysiert und anschließend die Proteine nach ihrem Isoelektrischen Punkt und ihrer Größe in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt.

Betrachtet man den in der Einleitung ausführlich beschriebenen Polyaminstoffwechsel (Abb. 1.8), so ist Putrescin ein essenzieller Vorläufer von Spermidin, wobei die Spermidinsynthese durch das Enzym SAMDC katalysiert wird. Inhibiert die Substanz

SAM486A diese Decarboxylase (SAMDC), so sollte es letztendlich in der Zelle zu einer Minderung von Hypusin-modifiziertem, funktionellem eIF-5A kommen (Abb. 4.13).

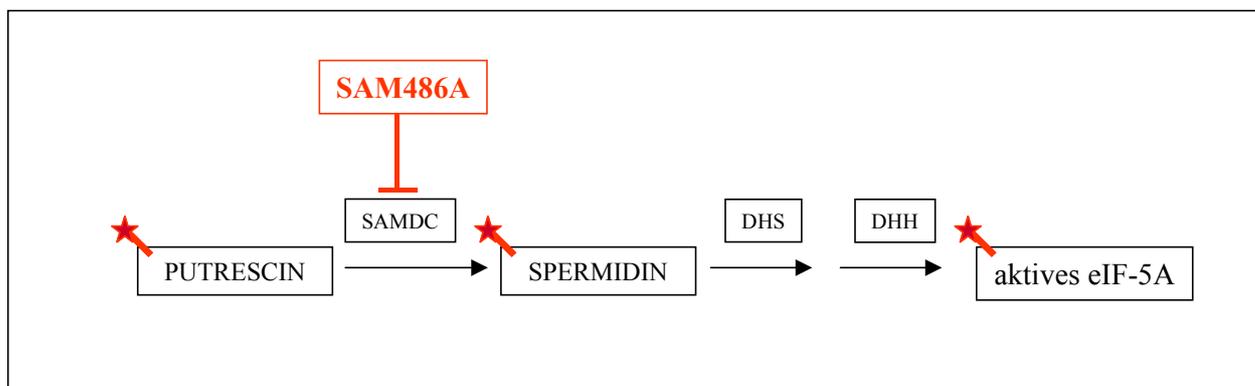


Abb. 4.13: Schematische Darstellung der radioaktiven Markierung von Hypusin-modifiziertem eIF-5A.

In Abb. 4.14 ist die Autoradiographie einer zweidimensionalen Gelelektrophorese zu sehen. Bei dem Vergleich der SAM486A-behandelten (SAM486A) mit den unbehandelten (Kontrolle) Zellen stellt man fest, dass es unter SAM486A fast zu einer vollständigen Inhibition der Hypusin-Modifizierung von eIF-5A kommt.

Die Autoradiographie der Kontrollzellen zeigt mehrere spezifische Banden, da neben der Hypusin-modifizierten Form noch weitere Isoformen [103] von eIF-5A, beispielsweise eine acetylierte Form, existieren.

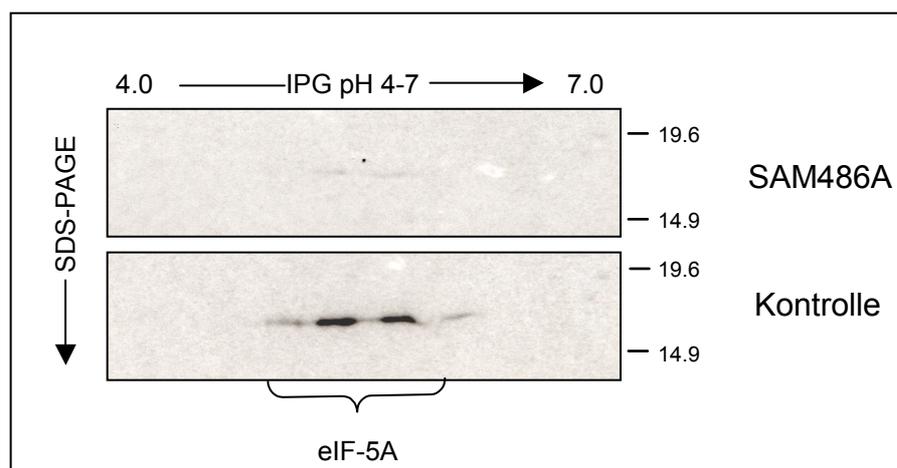


Abb. 4.14: Hypusin-Modifizierung von eIF-5A in SAM486A-behandelten Zellen (2D-Gelelektrophorese). Mit SAM486A oder Medium präinkubierte PM1 Zellen wurden über Nacht mit 25 μCi $[1,4\text{-}^{14}\text{C}]$ Putrescin-Dihydrochlorid inkubiert und die Lysate in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Im oberen Teil der Abbildung finden sich die SAM486A-behandelten und im unteren Teil die unbehandelten (Kontrolle) Zellen.

Dieses Ergebnis sollte mit Hilfe einer eIF-5A-spezifischen Immunpräzipitation bestätigt werden. Dazu wurden präinkubierte bzw. unbehandelte HeLaCD4-CAT Zellen für 12 h mit 25 μCi [1,4- ^{14}C] Putrescin-Dihydrochlorid markiert (Kap. 3.4). Anschließend wurden die Zellen lysiert und mit einem eIF-5A-spezifischen Antikörper präzipitiert (Kap. 3.11.5). Die Auftrennung der präzipitierten Proteine erfolgte aufgrund ihrer Größe in einem 13 % SDS-Gel und wurden anschließend autoradiographisch sichtbar gemacht (Kap. 3.11.2 und 3.11.3). In Abb. 4.15 wird das Ergebnis der zweidimensionalen Gelelektrophorese bestätigt. Auch hier ist unter SAM486A (Spur 1) deutlich weniger radioaktiv markiertes Hypusin-modifiziertes eIF-5A vorhanden. Die Kontrollkultur (Spur 2) hingegen zeigt deutlich ein spezifisches Signal. Als Ladekontrolle fungierte hier eine *Coomassie*-Färbung des SDS-Gels.

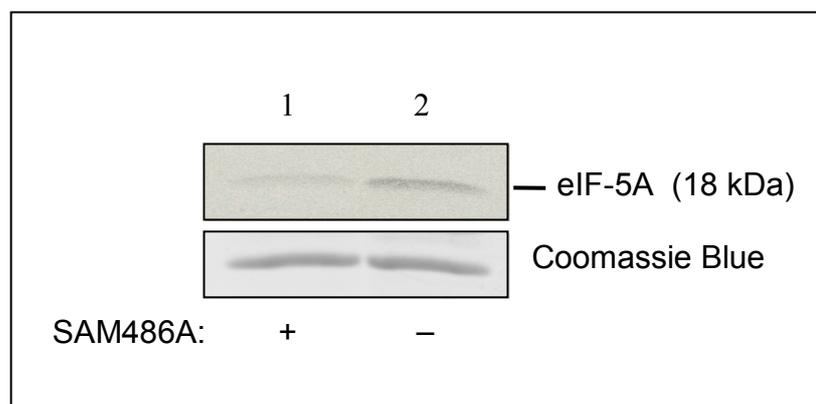


Abb. 4.15: Hypusin-Modifizierung von eIF-5A in SAM486A-behandelten Zellen (Immunpräzipitation). In 0,4 μM SAM486A (Spur 1) oder Medium (Spur 2) präinkubierte HeLaCD4-CAT Zellen wurden über Nacht mit 25 μCi [1,4- ^{14}C] Putrescin-Dihydrochlorid inkubiert und anschließend lysiert. Eine eIF-5A-spezifische Immunpräzipitation wurde mit gleichen Zellextraktmengen durchgeführt und in einem 13 % SDS-Gel aufgetrennt. Der obere Bildabschnitt zeigt die autoradiographische Darstellung von eIF-5A. Als Ladekontrolle wird die Coomassie Blue Färbung des SDS-Gels gezeigt.

Schlussfolgerung

Durch die Inhibition der S-Adenosylmethionin Decarboxylase (SAMDC) mit Hilfe des Wirkstoffes SAM486A wird die Hypusin-Modifizierung des eukaryotischen Initiationsfaktor 5A effizient blockiert.

4.5 Einfluss von SAM486A auf die Funktion viraler Proteine

4.5.1 Spezifische Inhibition des Rev-Kernexportweges durch spezifische SAMDC-Blockade

Die Replikation von HIV-1 ist abhängig von einer Anreicherung der einfach gespleißten und ungespleißten mRNA im Zytoplasma. Letztere dient entweder zur Translation der Strukturproteine oder als Genom von neu gebildeten Viren. Der Transport dieser RNAs vom Kern ins Zytoplasma wird durch den viralen Transaktivator Rev vermittelt [164].

Wie schon in der Einleitung detailliert beschrieben, ist das Hypusin-modifizierte eIF-5A ein essenzieller Kofaktor des regulatorischen HIV-1 Rev-Proteins [9,92]. Im folgenden Experiment sollte aus diesem Grund analysiert werden, ob durch die Inhibition der S-Adenosylmethionin Decarboxylase durch SAM486A die Rev-Aktivität gehemmt werden kann. Zu diesem Zweck wurde eine Reporteranalyse mit einem Luciferase-Konstrukt (pCMVgagLucRRE) durchgeführt, welches aufgrund des enthaltenen RRE Rev-abhängig über den CRM1/Exportin1 Exportweg aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert wird (Abb. 4.16).

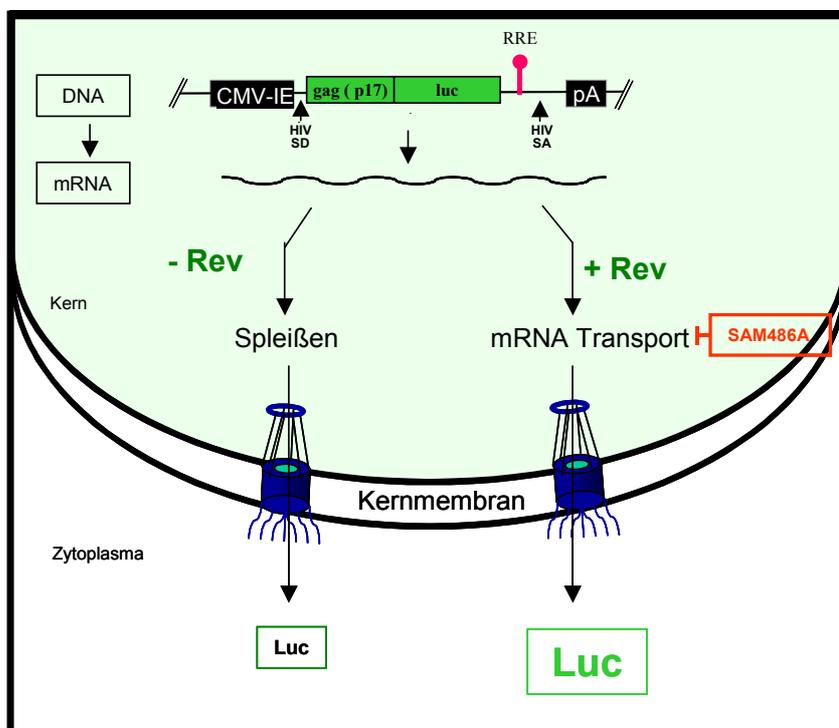


Abb. 4.16: Schematische Darstellung der Rev-spezifischen Reporteranalyse. Durch die Bindung von Rev an das *Rev response element* (RRE) wird der Kernexport der *luc*-enthaltenden mRNA über den CRM1/Exportin1-Exportweg vermittelt. Ohne Rev verbleibt die Reporter-mRNA im Zellkern und es kann kein Luc-Protein exprimiert werden. RRE: *Rev response element*; pA: Polyadenylierungs-Stelle; Luc: Luciferase (*firefly*); SA: Spleißakzeptor; SD: Spleißdonor; CMV-IE: *cytomegalovirus immediate early promotor*.

Hierzu wurden fünf Tage in 0,4 μM SAM486A präinkubierte oder unbehandelte HeLaCD4-CAT Zellen mittels Lipofectamin (Kap. 3.2.8) mit 0,6 μg pCMVgagLucRRE, 0,3 μg pcRev bzw. 0,3 μg pBC12/CMV (negative Kontrolle) und 0,3 μg pBC12/CMV/ β Gal (interne Kontrolle) transient transfiziert. Die Reporteranalyse erfolgte, wie unter Kapitel 3.3 beschrieben.

Wie die Ergebnisse in Abb. 4.17 zeigen, kommt es ohne Rev (-Rev) nur zu einer sehr schwachen Luciferaseexpression. Durch so genannte *silencer*-Elemente, *cis acting repressive sequence* (CRS) oder *instability sequences* (INS), im p17-Bereich der gag-Sequenz wird die mRNA bei Abwesenheit von Rev (-Rev) im Zellkern zurückgehalten [26,178,187]. Erst bei Anwesenheit des Rev-Transaktivators (+Rev) ist in den Kontrollzellen ein starkes Luciferasesignal messbar (linke Seite), da das Reporter-Transkript nun ins Zytoplasma transportiert und dort translatiert wird.

Innerhalb der SAM486A-behandelten Zellen ist trotz Anwesenheit des Rev-Transaktivators (+Rev) nur eine geringe Luciferaseexpression zu detektieren, was den Schluss zulässt, dass durch die Inhibition der Decarboxylase (SAMDC) die Transaktivierung von Rev blockiert ist.

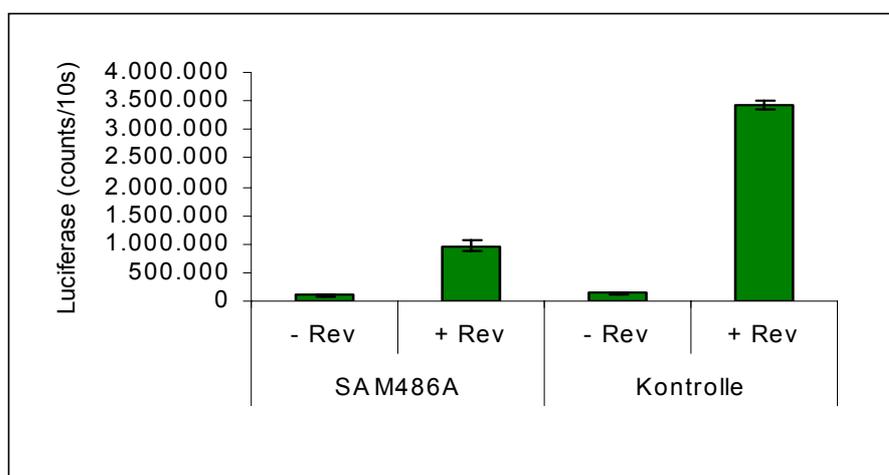


Abb. 4.17. Rev-Reporteranalyse. HeLaCD4-CAT Zellen wurden fünf Tage in 0,4 μM SAM486A oder Medium (Kontrolle) kultiviert und anschließend mit pCMVgagLucRRE, einem Rev exprimierenden Vektor (+Rev) oder einem korrespondierenden parentalen Kontrollplasmid (-Rev) und einem internen Kontrollvektor pBC12/CMV/ β Gal transfiziert. Die Rev-Transaktivierung wurde 48 Stunden nach der Transfektion durch einen Luciferaseassay ermittelt. Die Angleichung der Werte erfolgte durch Verrechnung der Luciferase- mit der β -Galactosidase-messung.

4.5.2 Einfluss von SAM486A auf die Tat-Transaktivierung

Da durch SAM486A die Aktivität des regulatorischen Rev-Proteins spezifisch inhibiert wird, sollte nun überprüft werden, ob die Substanz auch andere HIV-1-Transaktivatoren beeinflusst.

Hierzu wurde das Tat-Protein gewählt, welches ein auf den viralen LTR-Promotor wirkender Transkriptionsfaktor ist.

Es wurde wiederum eine Reporteranalyse durchgeführt. In dem Reporterkonstrukt (pBC12/HIV/CAT) wird das CAT-Gen durch die HIV-1-LTR-Sequenz reguliert. Bei einer Tat-Koexpression kommt es zu einer deutlichen Steigerung der CAT-Expression (Abb. 4.18).

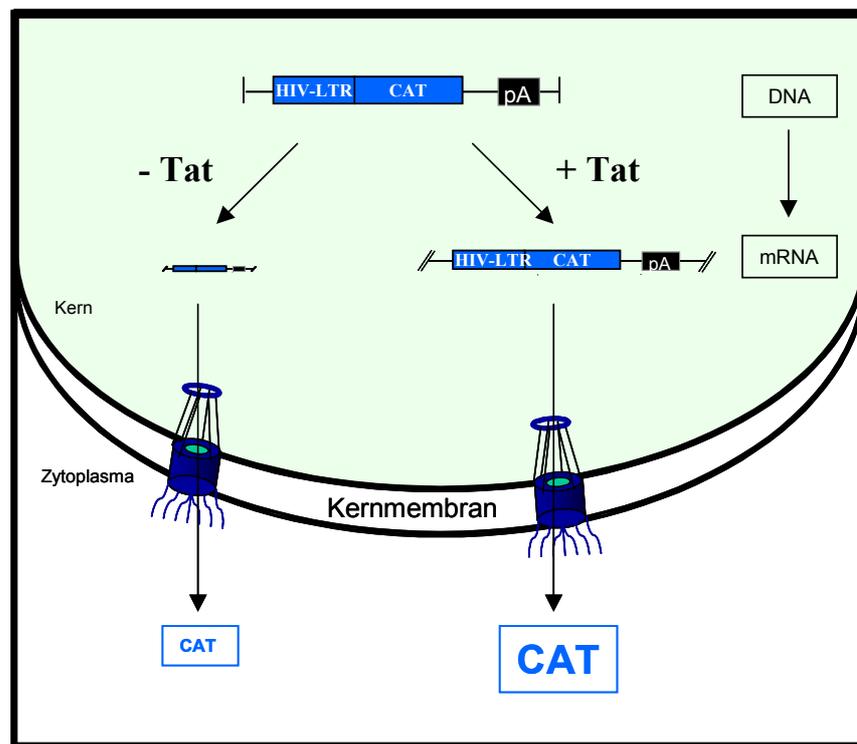


Abb. 4.18: Schematische Darstellung der Tat-Reporteranalyse. Bei Anwesenheit des Tat-Proteins (+Tat) wird die CAT-Expression um ein Vielfaches gesteigert. Ohne Tat (-Tat) findet eine sehr viel geringere Expression von CAT statt. CAT: Chloramphenicol-Acetyltransferase; pA: Polyadenylierungs-Stelle; LTR: *long terminal repeat*.

HeLaCD4-CAT Zellen wurden, wie oben beschrieben, ohne (Kontrolle) und mit $0,4 \mu\text{M}$ SAM486A fünf Tage präinkubiert und mit Hilfe von Lipofectamin, mit $1,0 \mu\text{g}$ pBC12/HIV/CAT, $0,5 \mu\text{g}$ pcTat bzw. $0,5 \mu\text{g}$ pBC12/CMV (negative Kontrolle) und $0,6 \mu\text{g}$ pBC12/CMV/ β Gal (interne Kontrolle) transient transfiziert. Die Reporteranalyse erfolgte, wie unter Kapitel 3.3 beschrieben.

Aus der untenstehenden Grafik (Abb. 4.19) geht hervor, dass es bei Abwesenheit des Tat-Transaktivators (-Tat) nur zu einer sehr geringen CAT-Expression kommt, da die DNA nur schwach transkribiert wird. Bei Anwesenheit des Tat-Proteins (+Tat) kommt es sowohl in den Kontrollzellen als auch in den SAM486A-behandelten Zellen zu einer deutlich gesteigerten CAT-Expression. Im Rahmen der Fehlerungenauigkeit unterscheiden sich die Ergebnisse

nicht voneinander, woraus sich der Schluss ziehen lässt, dass eine Inhibition von SAMDC eine Transaktivierung durch Tat nicht beeinflusst.

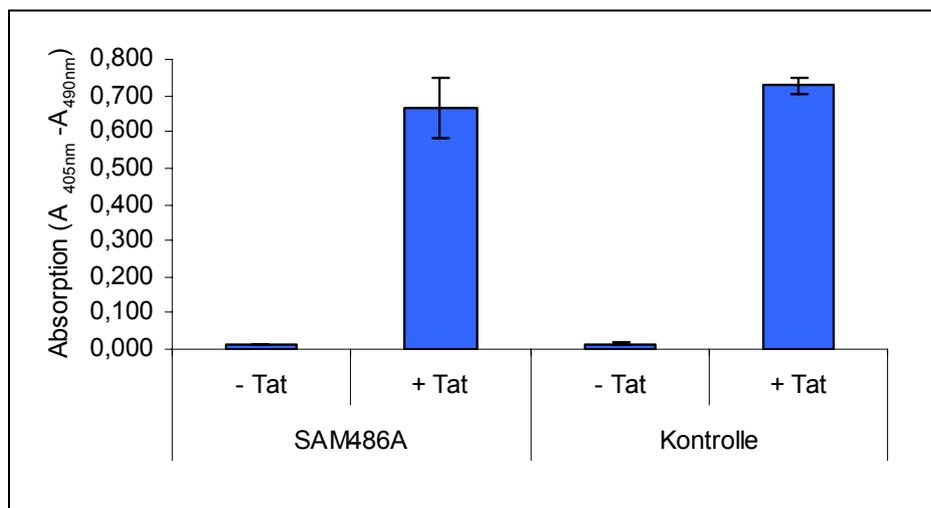


Abb. 4.19: Tat-Reportergenanalyse. HeLaCD4-CAT Zellen wurden fünf Tage in 0,4 μ M SAM486A oder Medium (Kontrolle) kultiviert und anschließend mit pBC12/HIV/CAT, einem Tat exprimierendem Vektor (+Tat) oder einem korrespondierenden parentalen Kontrollplasmid (-Tat) und einem internen Kontrollvektor pBC12/CMV/ β Gal transfiziert. Die Tat-Transaktivierung wurde 48 Stunden nach der Transfektion durch einen CAT-Assay ermittelt. Alle CAT-Werte wurden mit Hilfe der β -Galactosidasewerte auf identische Transfektionseffizienzen angeglichen.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse beider Reportergenanalysen zeigen eindeutig, dass SAM486A den Rev-abhängigen Transport viraler mRNAs vom Zellkern in das Zytoplasma spezifisch blockiert.

4.6 Einfluss von SAM486A auf verschiedene mRNA Kernexportwege

Rev ist essenziell für den durch CRM1/Exportin1 vermittelten Kernexport ungespleißter und einfach gespleißter viraler mRNAs in das Zytoplasma und hat Einfluss auf die Halbwertszeit und die Translation dieser Transkripte [164,197].

In einer aktuellen Studie wurde in Mauszellen gezeigt, dass der Kernexportweg der mRNAs das Schicksal der retroviralen RNA im Zytoplasma bestimmt [199]. Dieser Sachverhalt wurde durch die Verwendung subgenomischer HIV-1-Vektoren untersucht, welche sich nur durch ihre *cis*-aktiven RNA-Transportsignale unterscheiden. Beide Konstrukte enthalten die *gag*-, *pol*-, *vif*- und *vpr*-Gene (GPV) sowie die wichtigsten 5' Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen für *vif* und *vpr*. Das als GPV-RRE deklarierte Konstrukt enthält zusätzlich das *Rev response element*, an welches Rev binden kann und dadurch die entsprechende mRNA mit Hilfe des CRM1/Exportin1-Kernexportweges ins Zytoplasma

transportiert. Im Gegensatz dazu enthält das GPV-4xCTE Konstrukt vier Tandemkopien des konstitutiven Transportelements (*constitutive transport element*, CTE) aus dem Mason-Pfizer Affenvirus. An das CTE bindet der zelluläre Transportfaktor TAP/NXF1, der auch die meisten zellulären mRNAs vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Mit den Vektoren GPV-RRE und GPV-4xCTE lassen sich deshalb verschiedene Kernexportwege (CRM1/Exportin1 vs. TAP/NXF1) differenzieren.

Im nächsten Experiment sollte untersucht werden, ob durch SAM486A spezifisch die Gag-Expression des GPV-RRE Konstrukts, nicht aber die des GPV-4xCTE Konstrukts unterdrückt wird, was für eine spezifische Inhibition des CRM1/Exportin1-Kernexportwegs sprechen würde (Abb. 4.20).

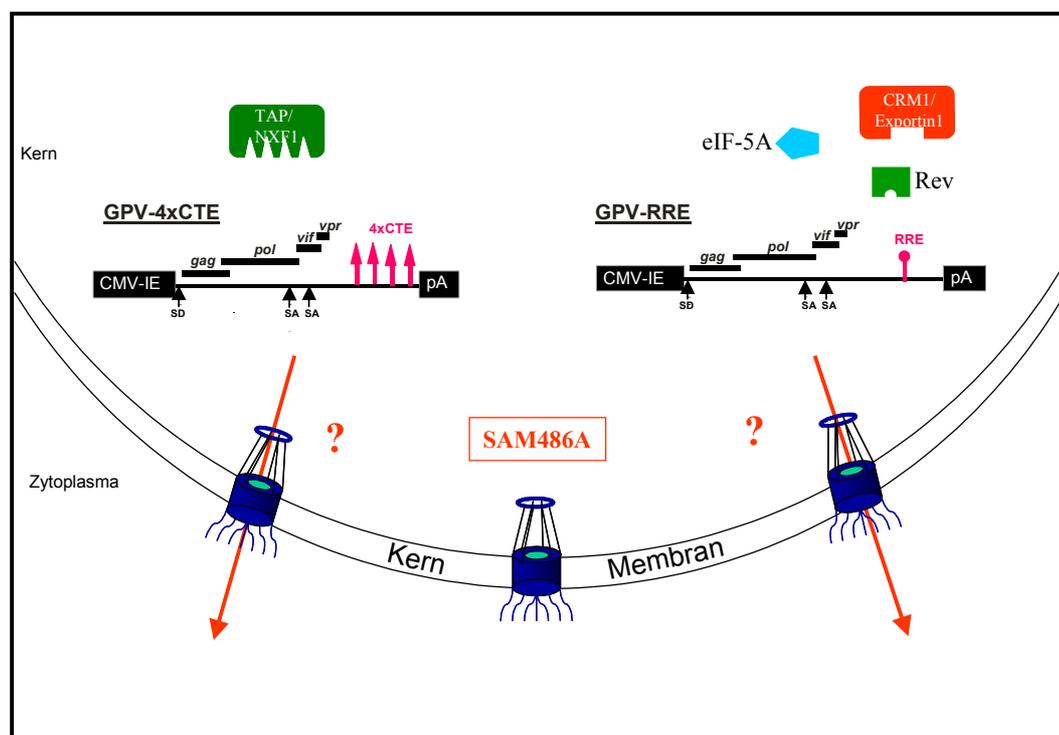


Abb. 4.20: Schematische Darstellung der durch die GPV-Konstrukte verwendeten Kernexportwege. Die mRNA des GPV-4xCTE-Konstrukts wird Rev-unabhängig über den TAP/NXF1-Exportweg transportiert. Die mRNA des GPV-RRE-Konstrukts wird bei Anwesenheit des Rev-Transaktivators CRM1/Exportin1-abhängig in das Zytoplasma transportiert. CMV-IE: *cytomegalovirus immediate early promotor*; pA: Polyadenylierungs-Stelle; SD: Spleißdonor; SA: Spleißakzeptor; CTE: konstitutives Transportelement (*constitutive transport element*); RRE: *Rev response element*; CRM1: *Chromosome region maintenance 1*; eIF-5A: eukaryotischer Initiationsfaktor 5A

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden HeLaCD4-CAT Zellen, wie unter Kapitel 4.5.1 beschrieben, präinkubiert und anschließend mit 0,5 µg GPV-RRE bzw. 0,5 µg GPV-4xCTE und mit 0,25 µg pcRev bzw. 0,25 µg pBC12/CMV (negative Kontrolle) transient transfiziert. Als interne Transfektionskontrolle diente pro Ansatz 0,25 µg pBC12/CMV/SEAP.

Nach 48 h wurden der p24-Antigen- und der SEAP-Gehalt (Kap. 3.3.5) im Kulturüberstand gemessen. Zusätzlich wurden die Zellen lysiert, um die Gag-Expression mittels Western Blot Analyse (Kap. 3.11.4) zu überprüfen.

Die Balken in Abb. 4.21 stellen den mit der SEAP-Kontrolle verrechneten p24-Antigengehalt dar. Im linken Teil der Grafik ist das Ergebnis der Zellen zu sehen, welche mit dem GPV-RRE Konstrukt und der negativen Kontrolle (GPV-RRE -Rev) transfiziert wurden. Hier wird aufgrund des fehlenden Rev-Transaktivators die RNA nicht ins Zytoplasma transportiert und kann somit nicht translatiert werden.

Die Balken in der Mitte stellen das Resultat der mit GPV-RRE und pcRev (GPV-RRE + Rev) transfizierten Zellen dar. Wie erwartet, sind in der SAM486A-behandelten transfizierten Zellkultur nur geringe Mengen an p24-Antigen nachweisbar, da die Rev-Transaktivierung inhibiert ist. Hingegen ist in der Kontrolle ein deutlicher Anstieg der p24-Menge zu beobachten, da hier die mRNA des Konstruktes GPV-RRE + Rev über den CRM1/Exportin1-Kernexportweg ins Zytoplasma transportiert und dort translatiert wird.

Auf der rechten Seite der Grafik sind die Ergebnisse der Transfektion mit dem GPV-4xCTE-Konstrukt dargestellt. Hier hat die Anwesenheit des SAMDC-Inhibitors keinen Einfluss auf die p24-Antigenexpression. SAM486A-behandelte und unbehandelte Proben (Kontrolle) ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen.

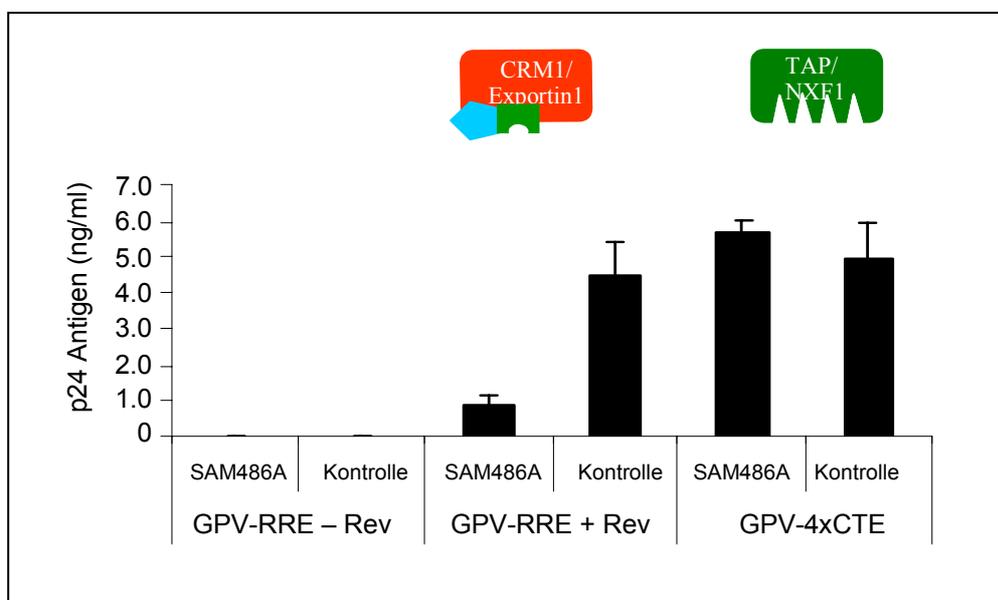


Abb. 4.21: Spezifische Inhibition des Rev-abhängigen Kernexportweges. HeLaCD4-CAT Zellen wurden fünf Tage in 0,4 μ M SAM486A oder Medium (Kontrolle) kultiviert und anschließend mit GPV-RRE und einem Rev-exprimierenden Plasmid (+Rev) oder einem korrespondierenden Kontrollplasmid (-Rev) und dem internen Kontrollplasmid pBC12/CMV/SEAP transfiziert. Ebenso wurde ein Teil der Zellen mit dem GPV-4xCTE Konstrukt sowie mit einem Kontrollplasmid (zum Äquilibrieren der DNA-Mengen der Transfektionen) als auch mit dem internen Kontrollplasmid (s.o.) transfiziert. Aus den Überständen wurde nach 48 Stunden der p24-Antigen- und der SEAP-Gehalt bestimmt.

Die in Abb. 4.21 gezeigten Ergebnisse konnten durch einen Western Blot bestätigt werden, für den ein spezifischer Antikörper zum Nachweis des p24^{Gag}-Proteins und dessen Vorläuferprotein p55^{Gag} benutzt wurde (Beschreibung siehe Kap. 4.2.1).

In Abb. 4.22 ist die Detektion der p55^{Gag}-Bande und der Tubulinladekontrolle gezeigt.

Auch hier ist in den mit GPV-RRE +Rev transfizierten SAM486A-behandelten Zellen (Spur 1) nur eine sehr schwache p55^{Gag}-spezifische Bande zu sehen, ganz im Gegensatz zum deutlich exprimierten p55^{Gag}-Protein in der unbehandelten Kontrollkultur (Spur 2). In direktem Kontrast hierzu steht das Ergebnis der mit GPV-4xCTE transfizierten Zellen, in denen kein signifikanter Unterschied in der p55^{Gag}-Expression zwischen behandelten (Spur 3) und unbehandelten Zellen (Spur 4) zu beobachten ist.

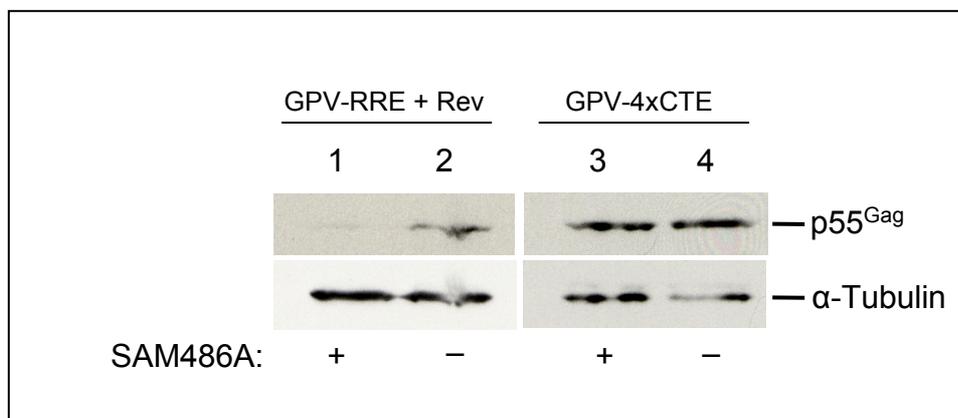


Abb. 4.22: Western Blot Analyse der GPV-Expression. Zusätzlich zur p24-Antigenanalyse (Abb. 4.21) wurde die p55^{Gag}- und die Tubulinexpression (Ladekontrolle) durch eine Western Blot Analyse überprüft.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann durch die oben gezeigten Ergebnisse bestätigt werden, dass der Wirkstoff SAM486A den CRM1/Exportin1-abhängigen, jedoch nicht den TAP/NXF1-abhängigen Exportweg der mRNAs vom Zellkern in das Zytoplasma blockiert.

5 Ergebnisse Teil II: Inhibition von HIV-1 durch RDP58

RDP58 (Decapeptid: $\text{H}_2\text{N-arg-nle-nle-nle-arg-nle-nle-nle-gly-tyr-CONH}_2$, Abb. 5.1) ist ein D-Isomer von RDP1258, das in der Literatur auch als Allotrap 1258 beschrieben ist. Es leitet sich von der schweren Kette des HLA Klasse I-Moleküls (HLA-B2702, Aminosäure 75 bis 84) ab [89,143]. Die Substanz wirkt inhibitorisch auf pro-inflammatorische Zytokine [37] und ist derzeit in der Austestung der klinischen Phase II für *Colitis ulcerosa* (chronische Dickdarmentzündung) [206] und *Morbus Crohn* (chronische Dick- und Dünndarmentzündung) [14].

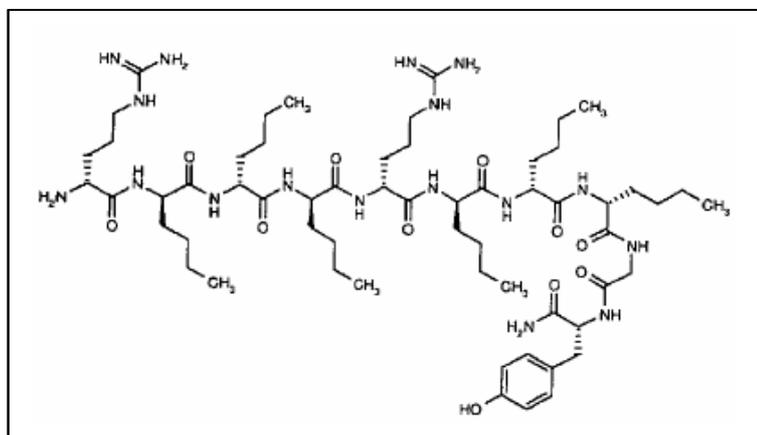


Abb. 5.1: Strukturformel des Decapeptids RDP58.

Aufgrund der Veröffentlichungen von Cohen *et al.* [29] und Iyer *et al.* [89] wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Idee entwickelt, dass RDP58 eventuell die Replikation von HIV-1 inhibieren könnte.

In der Studie von Cohen *et al.* wurde ursprünglich gezeigt, dass das Guanylhydrazon CNI-1493 die Expression von TNF- α (Tumornekrosefaktor α) hemmt, obwohl die zelluläre Gesamtmenge der TNF- α -mRNA durch CNI-1493 nicht negativ beeinflusst war. Cohen und Mitarbeiter interpretierten ihre Ergebnisse dahingehend, dass CNI-1493 die Translation der TNF- α -Transkripte verhindert [29].

Kürzlich wurde beschrieben, dass CNI-1493 auch die Hypusin-Modifizierung, und damit die Aktivierung des zellulären HIV-1 Rev Kofaktors eIF-5A hemmt [78,194]. Es wäre deshalb möglich, dass die von Cohen und Mitarbeitern beschriebene anti-TNF- α -Wirkung von CNI-1493 in Wirklichkeit darauf beruhte, dass durch CNI-1493 indirekt der Kernexport der

TNF- α mRNA inhibiert wird. Dies hätte zur Konsequenz, dass kein TNF- α exprimiert wird, obwohl TNF- α -spezifische Transkripte in der zellulären Gesamt-RNA nachweisbar sind.

Interessanterweise berichteten Iyer *et al.* [89], dass RDP58 in Bezug auf die TNF- α Expression in Monozyten einen ähnlichen Phänotyp zeigt wie CNI-1493: RDP58 verhindert die TNF- α -spezifische Translation, obwohl die entsprechenden Transkripte in der zellulären Gesamt-RNA nachweisbar sind. Es war deshalb denkbar, dass RDP58, vergleichbar mit CNI-1493, den von HIV-Rev benutzten zellulären CRM1/Exportin1-Kernexportweg hemmt und dadurch die HIV-Vermehrung inhibieren könnte.

In diesem Ergebnisteil (Teil II) der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob RDP58 eine antivirale Wirkung besitzt und ob es möglich ist, den Wirkmechanismus der Substanz näher einzugrenzen.

5.1 Einfluss von RDP58 auf den zellulären Stoffwechsel

RDP58 hat bereits die klinische Phase I im Test zur Behandlung von *Colitis ulcerosa* und *Morbus Crohn* durchlaufen und zeigte hier bei einer Dosis von 600 mg/Tag eine gute Verträglichkeit in männlichen Patienten [206]. Dies ließ erwarten, dass RDP58 keine signifikanten toxischen Effekte auf den zellulären Metabolismus hat. Trotzdem musste zu Beginn der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluss von RDP58 auf die hier eingesetzten zellulären Systeme untersucht werden.

5.1.1 Toxizität von RDP58 auf eukaryotische Zellen

Um herauszufinden, in welchen Konzentrationen RDP58 toxisch auf die Zellen wirkt und somit deren Vitalität beeinflusst, wurden PM1 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an RDP58 (3 $\mu\text{g/ml}$ bis 25 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Als Kontrolle diente DMSO (eingesetzt im gleichen Volumen der höchsten RDP58-Konzentration (25 $\mu\text{g/ml}$)), in dem das Peptid gelöst war. Über einen Zeitraum von 18 Tagen wurden die Zellen alle drei Tage passagiert und gleichzeitig die Vitalität der Zellen mittels eines alamarBlue-Assays (Kap. 3.2.5) kontrolliert.

Die Abb. 5.2 zeigt, dass RDP58 bis zu einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ keine toxische Wirkung auf die Vitalität der Zellen hatte. Erst eine Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ beeinträchtigte das Wachstum der PM1 Zellen von Tag 6 nach Versuchsbeginn an signifikant. Alle weiteren Experimente wurden aufgrund dieses Ergebnisses mit einer maximalen Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 durchgeführt.

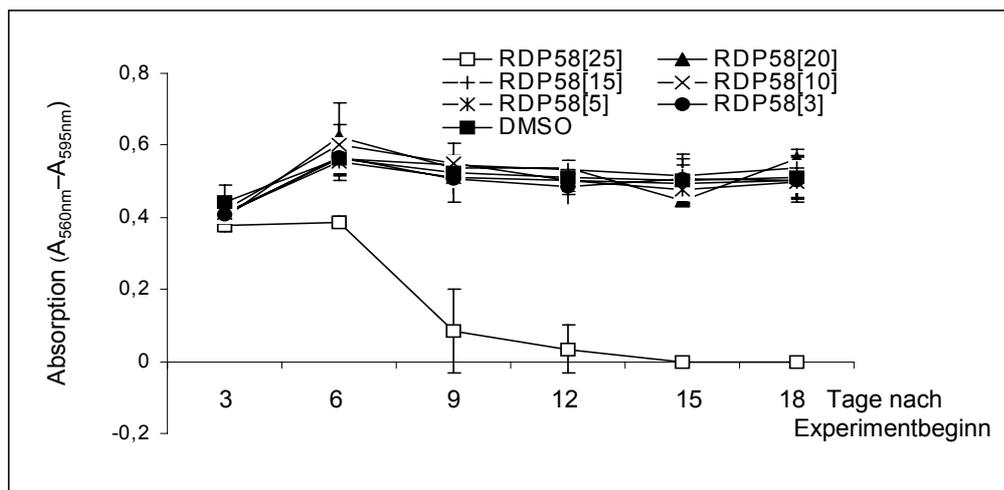


Abb. 5.2 Zellvitalitätstest (alamarBlue-Assay). PM1 Zellen wurden für 18 Tage in verschiedenen Konzentrationen von RDP58 (25, 20, 15, 10, 5, 3 $\mu\text{g/ml}$) und DMSO (Lösungsmittelkontrolle) kultiviert. Dargestellt ist die Absorption des Vitalitätstests an den Tagen 3, 6, 9, 12, 15 und 18.

5.1.2 Einfluss von RDP58 auf den Zellzyklus

Neben der Bestimmung der toxischen Dosis von RDP58 sollte ebenfalls untersucht werden, ob das Peptid den Zellzyklus beeinträchtigt. Hier wurden PM1 Zellen für 21 Tage in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 und in der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Jeden dritten Tag wurden die Zellen passagiert und in frischem Medium mit RDP58 oder DMSO weiter kultiviert.

Nach einer und nach drei Wochen erfolgte die Auswertung des Zellzyklusphasenverlaufs mittels eines *Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kits* (Kap. 3.2.7) und anschließender FACS-Analyse.

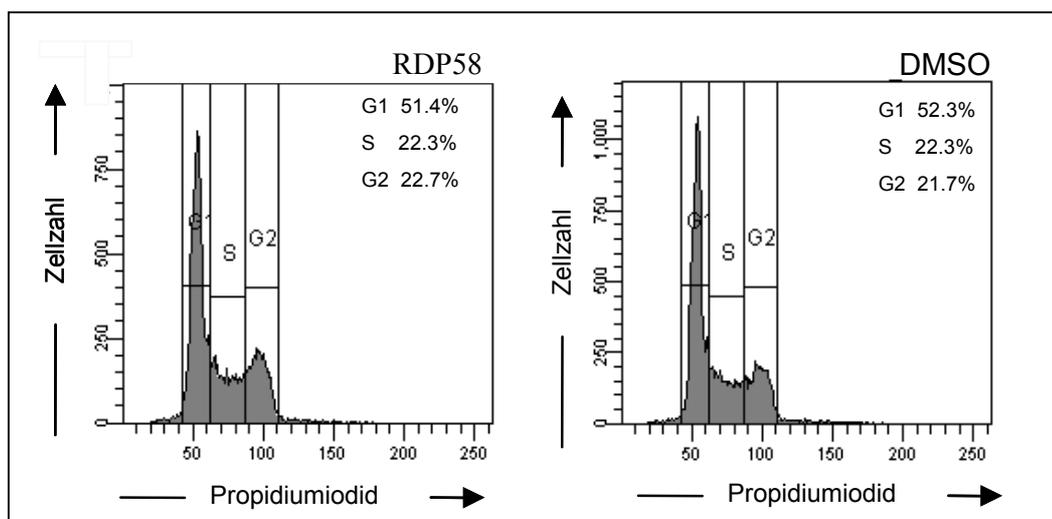


Abb. 5.3: Zellzyklusanalyse. PM1 Zellen wurden für 21 Tage in Anwesenheit von 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 oder DMSO (Kontrolle) kultiviert. Der Zellzyklusphasenverlauf wurde durch eine FACS-Analyse bestimmt.

Vergleicht man die einzelnen Zellzyklusphasen in Abb. 5.3, so erkennt man weder in der G1-, der S- noch in der G2-Phase signifikante Unterschiede zwischen den RDP58-behandelten Zellen (linke Abb.) und der DMSO-Kontrolle (rechte Abb.). Hieraus kann geschlossen werden, dass eine Behandlung der Zellen mit RDP58 (20 µg/ml) nicht zu einer Veränderung des Zellzyklus führt.

5.1.3 Einfluss von RDP58 auf die Apoptose von Zellen

Im letzten Experiment dieser Versuchsreihe sollte ausgeschlossen werden, dass RDP58 in Zellen Apoptose induziert. Hierzu wurden PBMCs aus gesundem Spenderblut isoliert (Kap. 3.2.4) und für sechs Tage in einer Konzentration von 20 µg/ml RDP58 oder in der DMSO-Lösungsmittelkontrolle kultiviert. Die PBMC-Kulturen erhielten am Tag 3 nach Versuchsbeginn IL-2 (10 U/ml) und frisches Medium mit RDP58 oder DMSO. Mit Hilfe eines Annexin V FITC *Kits* (Kap. 3.2.6) wurde am Tag 6 nach Substanzgabe der Anteil der nekrotischen, apoptotischen und toten Zellen bestimmt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).

Vergleicht man die Ergebnisse in Abb. 5.4, so findet man keinen signifikanten Unterschied zwischen den RDP58- (linke Abb.) und den DMSO-behandelten (rechte Abb.) PBMC-Kulturen. Der prozentuale Anteil der apoptotischen (FITC⁺/PI⁻; RDP58: 0,13 %, DMSO: 0,15 %), nekrotischen (FITC⁺/PI⁺; RDP58: 0,13 %, DMSO: 0,15 %) und toten (FITC⁻/PI⁺; RDP58: 31,9 %, DMSO: 30,37 %) Zellen ist in beiden Proben vergleichbar.

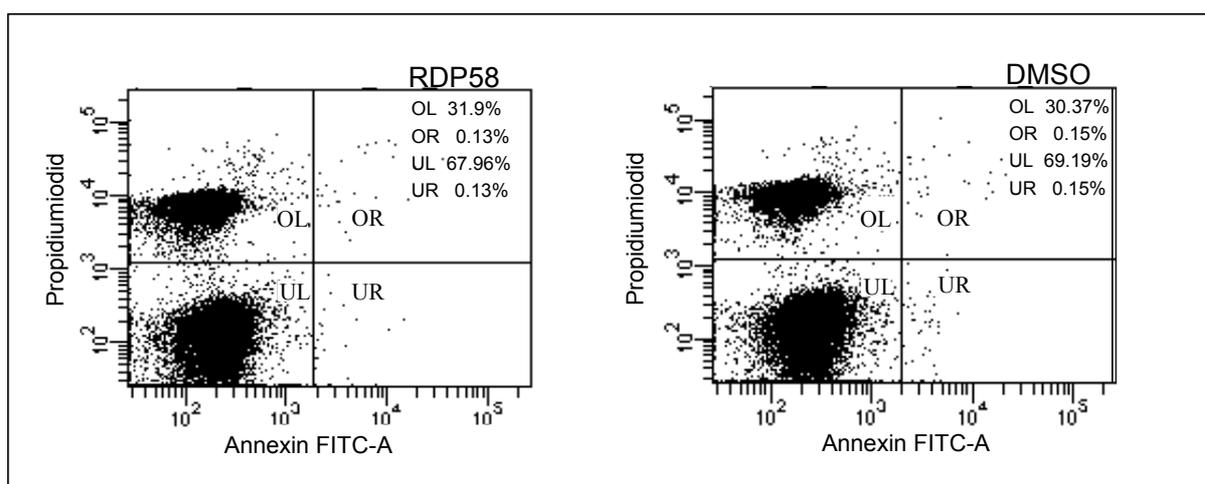


Abb. 5.4: Apoptose-Assay. PBMCs aus einem gesunden Spender wurden für sechs Tage in Anwesenheit von 20 µg/ml RDP58 oder DMSO (Kontrolle) kultiviert. Die FACS-Analyse der nekrotischen, apoptotischen und toten Zellen erfolgte nach Färbung mit Propidiumiodid und Annexin-gekoppeltem FITC.

Schlussfolgerung

RDP58 hat in einer Konzentration von 20 µg/ml keinen negativen Einfluss auf den Stoffwechsel der verwendeten Zellen. Es wirkt weder toxisch oder Apoptose-induzierend noch beeinflusst das Peptid den Zellzyklus.

5.2 Inhibition der HIV-1-Replikation durch RDP58

RDP58 wurde bisher noch nicht auf seine antiretrovirale Wirkung hin getestet. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die Substanz in der Lage ist, die Vermehrung von HIV-1-infizierten Zellen zu hemmen.

5.2.1 Inhibition von M-tropen HI-Viren

Hier wurde zunächst untersucht, ob RDP58 die Replikation des M-tropen (R5) HIV-1-Stammes BaL inhibieren kann.

Hierzu wurden PM1 Zellen, wie unter Kapitel 3.6.1 beschrieben, mit 2 ng BaL infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen in 3 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml und 20 µg/ml RDP58 oder DMSO kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert, Zellkulturüberstand zur p24-Antigenbestimmung entnommen und die Vitalität der Zellen mittels alamarBlue-Assay überprüft.

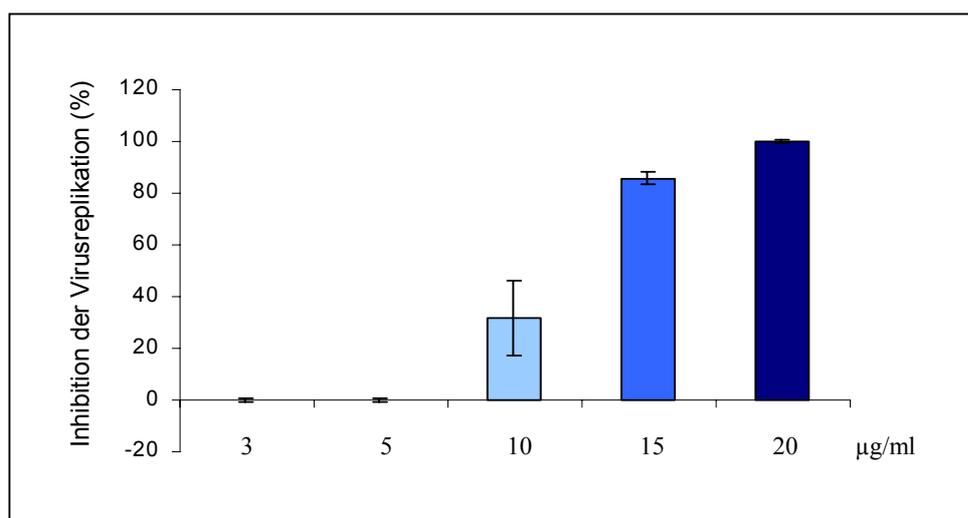


Abb. 5.5: Inhibition der Replikation von HIV-1 BaL durch RDP58. HIV-1 BaL-infizierte PM1 Zellen wurden in den aufgezeigten RDP58-Konzentration oder in DMSO (Kontrolle) kultiviert. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der Peptid-behandelten Zellen am Tag 7 nach der Infektion.

In Abb. 5.5 ist die mit Hilfe der p24-Antigenmessung ermittelte prozentuale Inhibition der Virusreplikation der RDP58-behandelten Zellen am Tag 7 nach der Infektion dargestellt. Hier ist eindeutig zu erkennen, dass das Peptid die Vermehrung des HI-Virus bereits ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ beeinträchtigt und bei einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ diese vollständig inhibiert.

Im folgenden Experiment sollte nun der Infektionsverlauf über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. PM1 Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit HIV-1 BaL infiziert und in Anwesenheit von 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 kultiviert. Alle drei Tage erfolgte die Entnahme des Zellkulturüberstandes zur p24-Antigenbestimmung, eine Vitalitätsbestimmung (alamarBlue-Assays) und das Passagieren der Zellen.

Abb. 5.6 A zeigt die prozentuale Inhibition der RDP58-behandelten Zellen. Hier ist zu erkennen, dass 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 über einen Zeitraum von 15 Tagen hinweg in der Lage ist, die Virusreplikation effizient zu hemmen. Zugleich hat diese Konzentration keinen Einfluss auf die Zellvitalität (Abb. 5.6 B). Die DMSO-behandelten Zellen beginnen aufgrund der starken Virusvermehrung nach dem Tag 12 abzusterben.

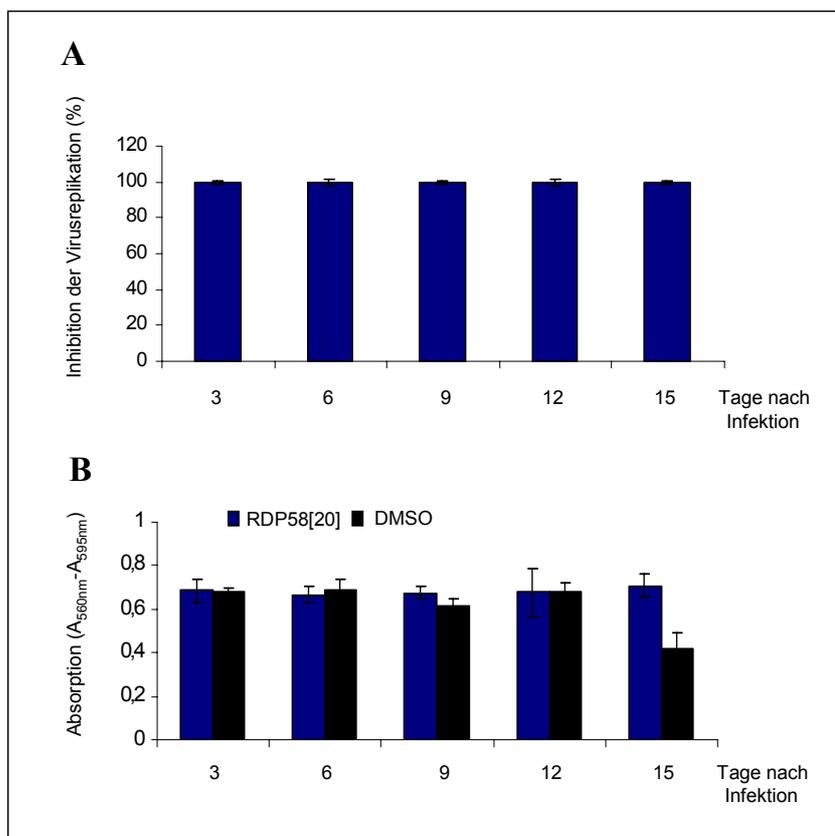


Abb. 5.6: Inhibition der Replikation von HIV-1 BaL über 15 Tage. HIV-1 BaL-infizierte PM1 Zellen wurden in 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 oder DMSO (Kontrolle) kultiviert. (A) Die prozentuale Inhibition in den Peptid-behandelten Zellen ist am Tag 3, 6, 9, 12 und 15 nach der Infektion dargestellt. (B) Die Zellvitalität (alamarBlue-Assay) an diesen Tagen zeigt die untere Grafik.

5.2.2 Spezifische Inhibition von HIV-1 durch RDP58

Um zu untersuchen, ob RDP58 die Virusvermehrung spezifisch hemmt, wurde ein von Iyer *et al.* [89] beschriebenes Kontrollpeptid (DR2P; RVNLPALRY) in einem weiteren Infektionsexperiment analysiert. Dieses Kontrollpeptid hatte früher auch bei der Inhibition von TNF- α keine Wirkung gezeigt [89].

Hierzu wurden PM1 Zellen, wie oben beschrieben, mit HIV-1 BaL infiziert und anschließend in 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58, 20 $\mu\text{g/ml}$ DR2P oder DMSO kultiviert. Wiederum wurden bis zum Tag 9 nach Infektionsbeginn jeden dritten Tag die Zellen passagiert und auf ihre Vitalität getestet, sowie p24-Antigen im Kulturüberstand bestimmt.

Abb. 5.7 zeigt die an den Tagen 3, 6 und 9 nach der Infektion gemessenen p24-Antigenwerte im jeweiligen Kulturüberstand der RDP58-, DR2P- und DMSO-behandelten Zellen. Daraus geht klar hervor, dass sich das Kontrollpeptid DR2P wie die DMSO Kontrolle verhält, d.h. keinen Einfluss auf die Replikation von HIV-1 hat, während das Virus in den RDP58-behandelten Zellen offensichtlich nicht replizieren kann. Dieses Ergebnis zeigt, dass RDP58 die Vermehrung von HIV-1 spezifisch inhibiert.

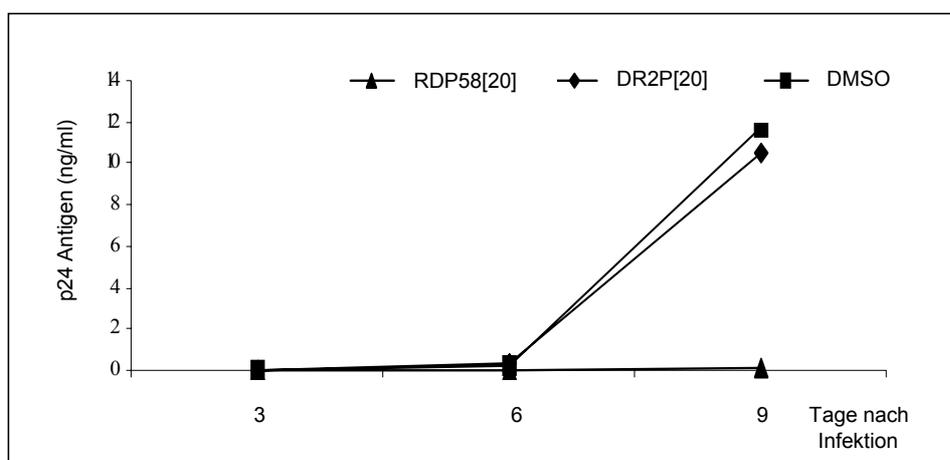


Abb. 5.7: Inhibition der Replikation von HIV-1 BaL durch das Kontrollpeptid DR2P. HIV-1 BaL-infizierte PM1 Zellen wurden in Anwesenheit von 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58, DR2P (Kontrollpeptid) oder DMSO (Kontrolle) kultiviert. Die Grafik zeigt den p24-Antigengehalt des zellfreien Kulturüberstand (ng/ml) an den Tagen 3, 6 und 9 nach der Infektion.

5.2.3 Inhibition von T-tropen HI-Viren

Wie im Teil I des Kapitels 4.2.2 beschrieben, vermehren sich T-trophe (X4) HI-Viren relativ schnell und effizient.

Um zu untersuchen, ob RDP58 in der Lage ist, die Replikation des T-tropen Laborstammes HIV-1 NL4-3 zu inhibieren, wurden PM1 Zellen mit 9 ng HIV-1 NL4-3 infiziert und

anschließend in Anwesenheit von 20 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml RDP58 oder DMSO kultiviert. Alle drei Tage wurden die Zellen passagiert, Überstand zur p24-Antigenbestimmung entnommen und die Vitalität der Zellen überprüft (alamarBlue-Assay).

Die Abb. 5.8 A zeigt die prozentuale Inhibition der Virusreplikation in den RDP58-behandelten Zellen gegenüber der DMSO-Kontrolle am Tag 6 nach der Infektion. Hier ist zu beobachten, dass RDP58 in den Konzentrationen von 20 µg/ml und 10 µg/ml die Virusreplikation zu annähernd 100 % inhibiert. Hingegen zeigt eine Konzentration von 5 µg/ml RDP58 keine signifikante Hemmung, was auch schon im Rahmen der Infektion mit HIV-1 BaL zu erkennen war.

In Abb. 5.8 B ist die Vitalität der Zellen dargestellt. Da die Viruslast am Tag 6 noch sehr gering war, waren auch die Zellen in der DMSO-Kontrolle vital.

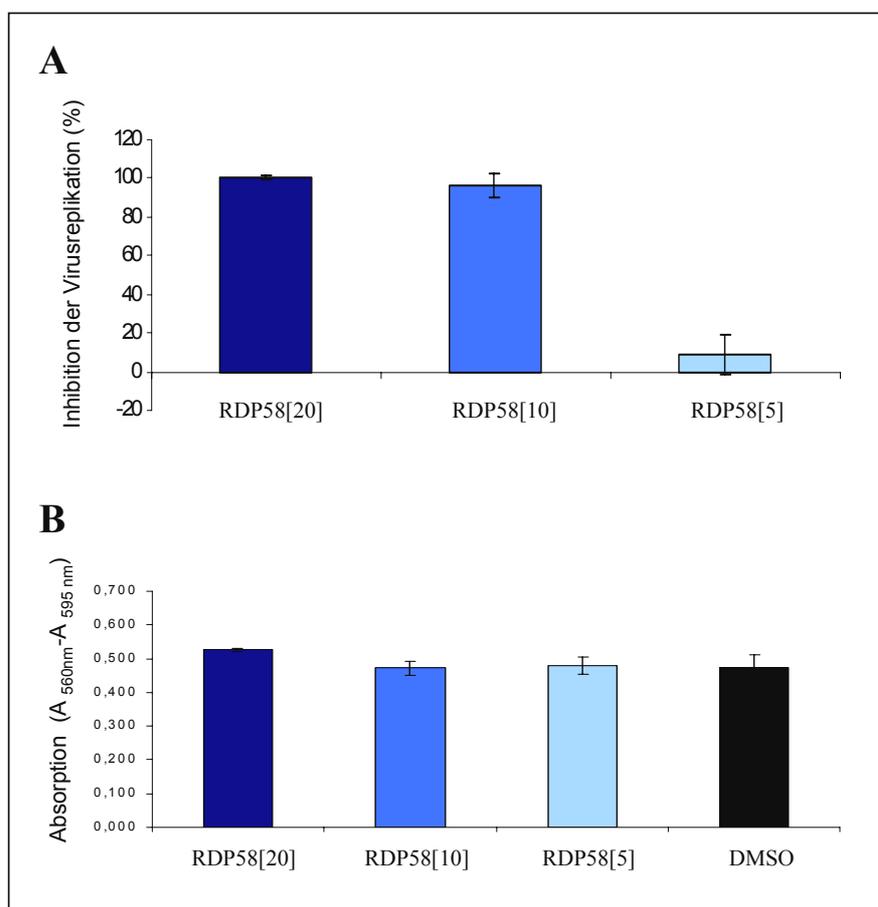


Abb. 5.8: Inhibition der Replikation von HIV-1 NL4-3 durch RDP58. HIV-1 NL4-3-infizierte PM1 Zellen wurden in den aufgezeigten RDP58-Konzentrationen (20 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml) oder in DMSO (Kontrolle) kultiviert. Dargestellt ist in (A) die prozentuale Inhibition der Peptid-behandelten Zellen am Tag 6 nach der Infektion und in (B) die Vitalität (alamarBlue-Assay) der Zellen am Tag 6.

5.2.4 Inhibition von multiresistentem HIV-1 FE9

Ob das RDP58-Peptid in der Lage ist, die Replikation von hochresistenten Viren zu inhibieren, sollte im folgenden Experiment getestet werden. Zur Infektion der Zellen wurde wiederum das unter Kapitel 4.2.4 beschriebene multiresistente FE9 Virus verwendet.

Einen Tag vor der Infektion wurden die PM1 Zellen mit Polybren versetzt und nach der Infektion mit FE9 über 15 Tage hinweg in Anwesenheit von 20 µg/ml RDP58 oder DMSO, wie oben beschrieben, weiter kultiviert.

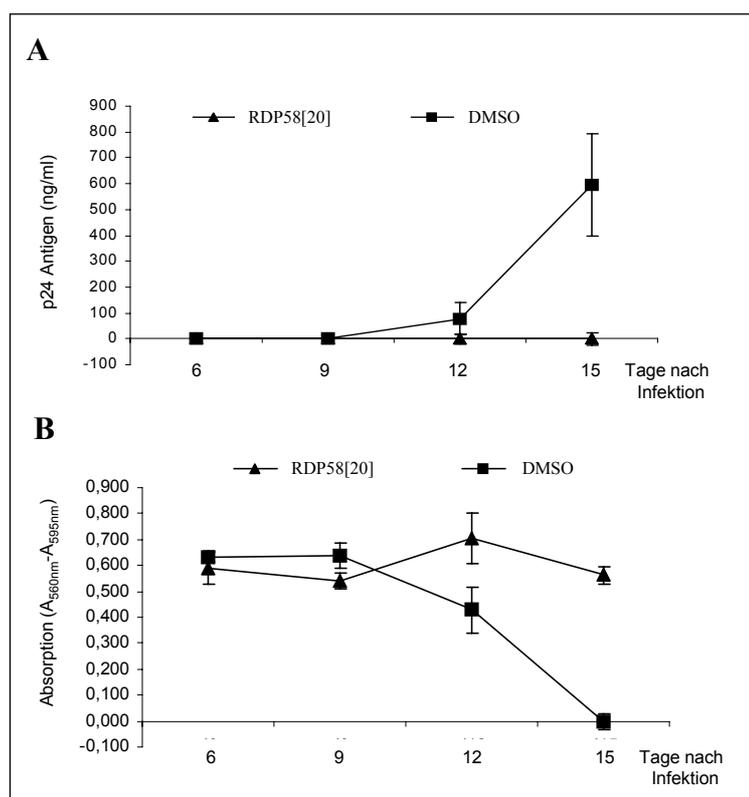


Abb. 5.9 Inhibition eines multiresistenten HI-Virus (FE9) durch RDP58. PM1 Zellen wurden mit dem multiresistenten FE9-Isolat infiziert und über 15 Tage in Anwesenheit von 20 µg/ml RDP58 oder DMSO (Kontrolle) kultiviert. Unter (A) ist der p24-Antigengehalt (ng/ml) im zellfreien Kulturüberstand an den Tagen 6, 9, 12 und 15 nach der Infektion dargestellt. Die Zellvitalität (B) wurde parallel mittels alamarBlue-Assay kontrolliert.

Das Ergebnis in Abb. 5.9 A zeigt den p24-Antigengehalt (ng/ml) im Kulturüberstand an den Tagen 6, 9, 12 und 15 nach der Infektion. Es ist zu erkennen, dass die FE9-Viruslast in den Kontrollzellen (DMSO) kontinuierlich ansteigt, wohingegen in den RDP58-behandelten Zellen selbst am Tag 15 nach der Infektion nur eine sehr geringe Menge an p24-Antigen messbar ist.

In Abb. 5.9 B ist das Ergebnis der Vitalitätsbestimmung (alamarBlue-Assay) dargestellt. Aufgrund der massiven Virusvermehrung sterben die DMSO-behandelten Zellen schon ab

dem neunten Tag nach Infektionsbeginn ab. Die RDP58-behandelten Zellen hingegen sind bis zum Experimentende vital.

5.2.5 Inhibition von HIV-1 in einer adhärennten Zelllinie

Das nächste Experiment sollte klären, ob RDP58 in der Lage ist, die Virusreplikation auch in einer anderen Zelllinie zu inhibieren. Hierzu wurden HeLaCD4-CAT Zellen verwendet. Diese stabile Zelllinie exprimiert CD4-Rezeptoren und CXCR4-Korezeptoren und ist folglich mit T-tropen (X4) Viren infizierbar.

HeLaCD4-CAT Zellen wurden einen Tag vor der Infektion in einer Zelldichte von $1,0 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung (\varnothing 3,5 cm) einer Zellkulturplatte ausgesät. Die Infektion erfolgte, wie unter Kapitel 3.6.2 beschrieben, mit 13 ng HIV-1 NL4-3 pro Vertiefung. Jeden dritten Tag wurde Kulturüberstand zur p24-Antigenbestimmung entnommen, die Zellen nach Trypsin-Behandlung passagiert und deren Vitalität mit Hilfe eines alamarBlue-Assays bestimmt.

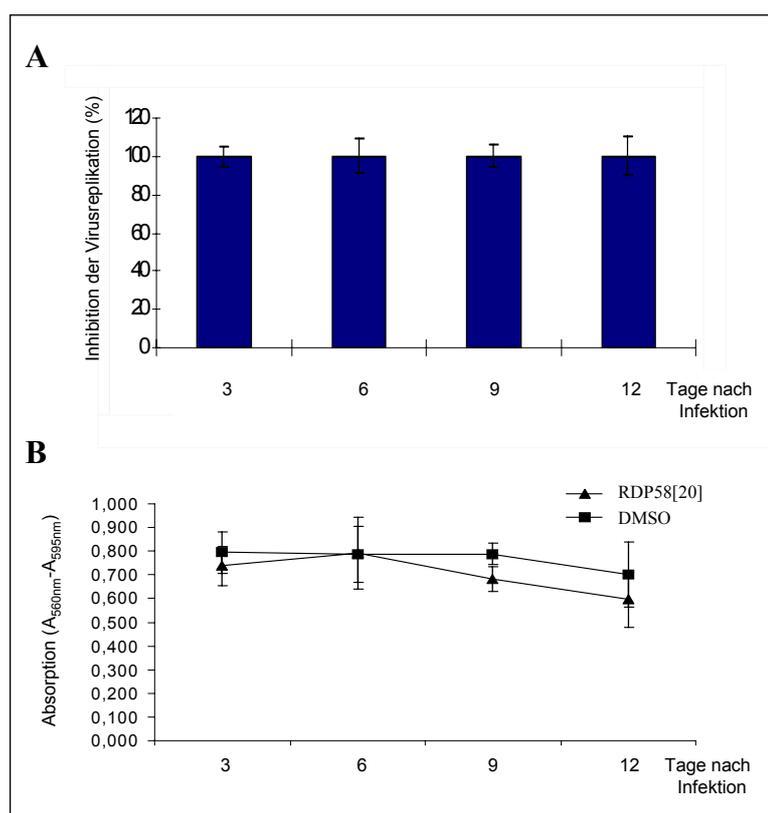


Abb. 5.10: Inhibition der Replikation von HIV-1 in HeLaCD4-CAT Zellen. HeLaCD4-CAT Zellen wurden mit HIV-1 NL4-3 infiziert und über 12 Tage in Gegenwart von 20 μ g/ml RDP58 oder DMSO (Kontrolle) kultiviert. Unter (A) ist die prozentuale Inhibition der Virusreplikation der RDP58-behandelten Zellen an den Tagen 3, 6, 9 und 12 nach Infektionsbeginn dargestellt. Die Zellvitalität (B) wurde parallel mittels alamarBlue-Assay kontrolliert.

Abb. 5.10 A zeigt die prozentuale Inhibition der Virusreplikation der RDP58-behandelten Zellen. Es ist eindeutig erkennbar, dass 20 µg/ml RDP58 die Replikation von HIV-1 auch in HeLaCD4-CAT Zellen über 12 Tage hinweg nahezu vollständig inhibierte. Die RDP58- oder DMSO-behandelten Zellen waren während dieses Zeitraumes ähnlich vital (Abb. 5.10 B), da die Virusmenge selbst in der DMSO-Kontrollkultur nach 12 Tagen noch relativ gering war. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass RDP58 in unterschiedlichen Zellsystemen die Virus-Vermehrung hemmen kann.

Schlussfolgerung

RDP58 ist in der Lage, die Replikation sowohl von M- und T-tropen HI-Viren als auch von multiresistenten Viren (FE9) spezifisch und effizient zu inhibieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Virusreplikation Zelltyp-unabhängig ist.

5.3 Hemmung der Virusreplikation bei Zugabe von RDP58 nach der Infektion

Aufgrund einer stetig ansteigenden Anzahl von Resistenzen gegen Medikamente der antiretroviralen Kombinationstherapie (HAART) ist die Suche nach neuartigen Wirkstoffen und daraus resultierenden Therapiestrategien dringend erforderlich. Im folgenden Experiment sollte deshalb untersucht werden, ob RDP58 auch nach einer bereits etablierten HIV-Infektion noch in der Lage ist, die Vermehrung der Viren zu hemmen.

Um diese Frage zu analysieren, wurden PM1 Zellen mit 2,5 ng BaL infiziert und anschließend zunächst in Medium ohne Peptid kultiviert. Erst an den Tagen 3 oder 6 nach der Infektion wurden die Zellkulturen mit 20 µg/ml RDP58 oder DMSO versetzt und jeden dritten Tag, wie zuvor beschrieben, behandelt.

Die Abb. 5.11 zeigt den p24-Antigengehalt im zellfreien Kulturüberstand an den Tagen 3, 6 und 9 nach Infektionsbeginn. Die linke Grafik (A) zeigt den zeitlichen Verlauf der p24-Antigenmessung über neun Tage hinweg, bei RDP58- oder DMSO-Zugabe am dritten Tag nach der Infektion. Der Kurvenverlauf bestätigt, dass RDP58 die Virusvermehrung auch drei Tage nach der Infektion noch effizient hemmte. Hingegen vermehrte sich das Virus innerhalb der DMSO-behandelten Zellen ungehindert.

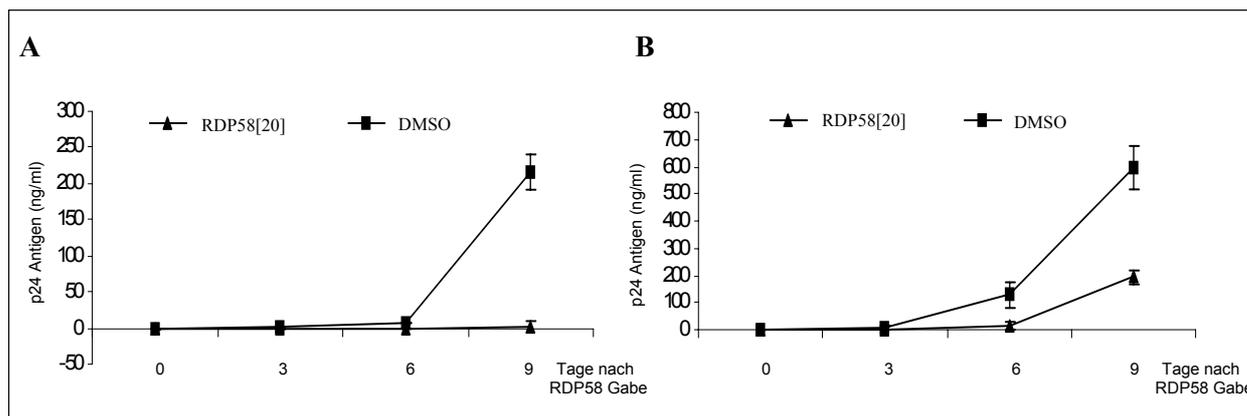


Abb. 5.11: Zugabe von RDP58 nach einer bereits etablierten Infektion. Zu stabil infizierten PM1 Zellen wurde drei (A) oder sechs (B) Tage nach der Infektion 20 µg/ml RDP58 bzw. DMSO zugegeben und diese für weitere neun Tage kultiviert. In (A) entspricht Tag 0 dem dritten Tag nach der Infektion, wohingegen in (B) Tag 0 dem sechsten Tag nach der Infektion entspricht. Dargestellt ist der p24-Antigengehalt (ng/ml).

Verabreichte man RDP58 oder DMSO erst sechs Tage (Grafik B) nach einer Infektion (entspricht Tag 0 in der Grafik), so inhibierte RDP58 nicht mehr so ausgeprägt, wie bei einer früheren Verabreichung (Grafik A). Betrachtet man in Grafik B den Tag 9 nach RDP58-Zugabe (entspricht Tag 15 nach Infektionsbeginn), so inhibierte RDP58 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle die Virusreplikation dennoch deutlich.

Diese Experimente bestätigen, dass RDP58 auch eine etablierte Infektion hemmen kann.

5.4 Kinetik zur Überprüfung einer nachhaltigen Wirkung von RDP58

Mit dem folgenden *drug-wash-out* Experiment wurde überprüft, wie lange die Wirkung des Peptids nach seinem Entfernen aus dem Kulturmedium anhält.

PM1 Zellen wurden mit 2,5 ng BaL infiziert und in Anwesenheit von 20 µg/ml RDP58 kultiviert. Neun Tage nach der Infektion wurde die Kultur 1:1 passagiert. Ein Teil davon wurde gewaschen und anschließend in Medium mit DMSO kultiviert, während der andere Teil weiterhin in Medium mit 20 µg/ml RDP58 kultiviert wurde. Das Kulturmedium wurde an den Tagen 3, 6 und 9 vor dem Waschschrift (*wash-out*) und an den Tagen 3, 6, 9 und 12 nach diesem erneuert. Die Vitalität der Zellen wurde an den genannten Tagen überprüft und der p24-Antigengehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Abb. 5.12 zeigt, dass das Peptid bis Tag 9 nach der Infektion einen sehr guten antiviralen Effekt aufwies, da kaum p24-Antigen nachweisbar war. Nach dem Waschschrift begann das Virus in der DMSO-Kultur ab dem dritten Tag wieder zu replizieren und vermehrte sich bis zum Ende des Experiments kontinuierlich. In der Zellkultur, die ständig in Gegenwart von RDP58 inkubiert wurden, konnte erst ab dem 18. Tag nach der Infektion (entspricht Tag 9 nach Passagierung) geringe Mengen an p24-Antigen nachgewiesen werden.

Aus den Ergebnissen dieses Experiments können zwei Schlüsse gezogen werden: Einerseits wurde gezeigt, dass Peptid-behandelte Zellen durch HIV-1 infiziert werden können, die sich anschließende Virusvermehrung allerdings gehemmt ist. Entfernt man den Wirkstoff aus der infizierten Kultur, so kann das Virus wieder replizieren. Andererseits erhält man darüber Aufschluss, wie lange RDP58 in der Zelle wirksam ist. Abb. 5.12 zeigt eindeutig, dass nach etwa 3 Tagen die Wirkung von RDP58 in der zuvor damit behandelten Kultur nachlässt und das Virus sich dann wieder vermehrt (DMSO).

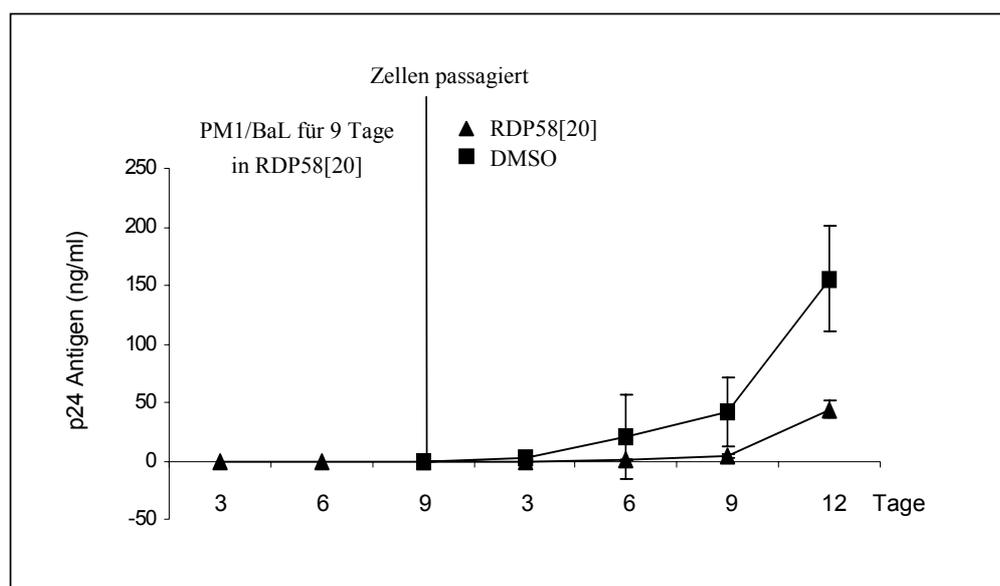


Abb. 5.12: Kinetik der RDP58-Wirkung. PM1 Zellen wurden mit HIV-1 BaL infiziert und für neun Tage in Anwesenheit von 20 µg/ml RDP58 kultiviert. An Tag 9 wurde die Zellkultur geteilt (1:1 passagiert) und die eine Hälfte weiterhin in RDP58 inkubiert, während die andere Hälfte mit PBS gewaschen und in Medium mit DMSO weiter kultiviert wurde. Das Kulturmedium wurde an den Tagen 3, 6 und 9 vor dem Entfernen des Peptids und an den Tagen 3, 6, 9 und 12 nach dem Passagieren der Zellen gewechselt. Dargestellt sind die p24-Antigenwerte (ng/ml), die gleichzeitig im zellfreien Kulturüberstand bestimmt wurden.

5.5 Potenzielle Resistenzbildung gegen RDP58 (Langzeitexperiment)

HIV-1 bildet aufgrund einer sehr hohen Mutationsrate (Kap. 4.3) überwiegend Resistenzen gegen Medikamente aus, die gegen virale Proteine gerichtet sind und in der Kombinationstherapie eingesetzt werden. Im folgenden Experiment wurde deshalb überprüft, ob es in den Zellen durch eine längere Wirkstoffexposition zur Ausbildung von Wirkstoff-resistenten Viren kommt.

Hierzu wurden mit HIV-1 BaL infizierte PM1 Zellen über 12 Wochen in einer suboptimalen Inhibitorkonzentration (2 µg/ml RDP58) kultiviert, welche aufgrund einer nicht vollständigen Hemmung der Virusreplikation theoretisch die Bildung von Resistenzen zuließ.

Die infizierten Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert, wobei das Kulturmedium stets die Substanz (2 µg/ml) enthielt. Einmal pro Woche wurde ein Aliquot zellfreien Kulturüberstandes entnommen und die Replikation der Viren mittels p24-Antigenbestimmung kontrolliert. Nach Bestimmung des p24-Antigengehalts des filtrierten Überstandes der 12. Woche wurden PM1 Zellen mit 1 ng dieses virushaltigen Kulturüberstandes infiziert. Die Kultivierung der Zellen in Medium mit 20 µg/ml RDP58 oder mit DMSO, die Bestimmung der Viruslast und die Messung der Vitalität wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt.

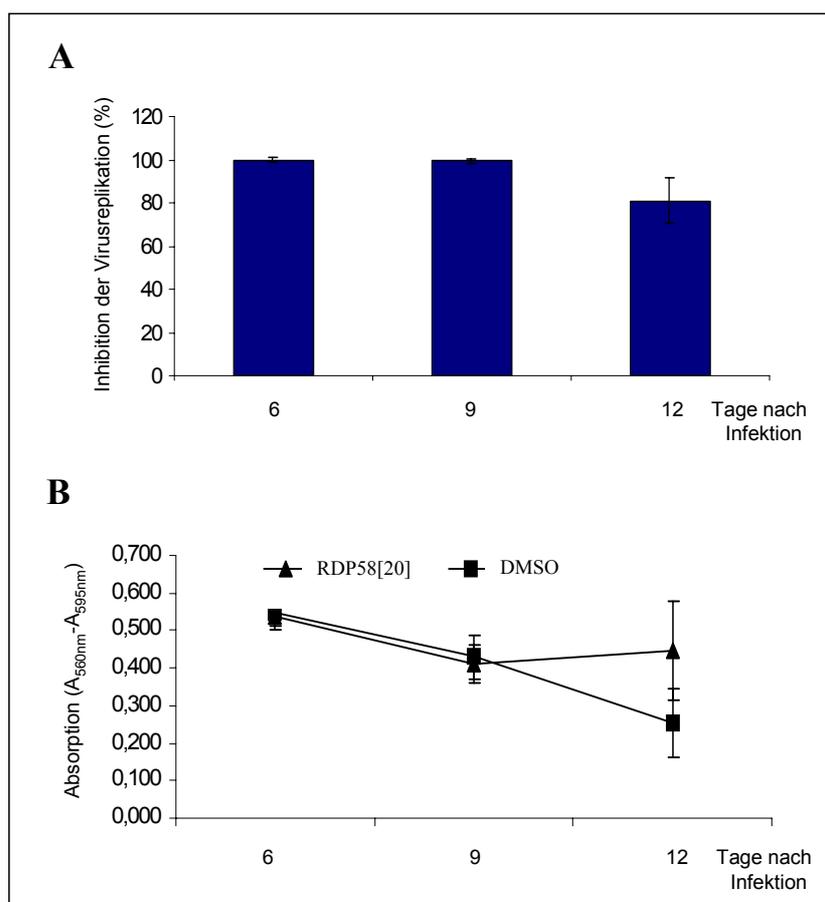


Abb. 5.13: Resistenzbildung in Gegenwart von RDP58. PM1 Zellen wurden mit BaL infiziert und über 12 Wochen in einer suboptimalen RDP58 Konzentration von 2 µg/ml kultiviert. Der virushaltige, zellfreie Kulturüberstand aus Woche 12 wurde verwendet, um PM1 Zellen neu zu infizieren. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dann in Medium mit 20 µg/ml RDP58 oder mit DMSO. In (A) ist die prozentuale Inhibition der Virusreplikation in den RDP58-behandelten Zellen an den Tagen 6, 9 und 12 nach der Infektion dargestellt. Grafik (B) zeigt die Zellvitalität (alarmarBlue-Assay) der RDP58- (RDP58[20]) und DMSO-behandelten Zellen an diesen Tagen.

In Abb. 5.13 A ist zu sehen, dass die Replikation des über 12 Wochen in einer suboptimalen RDP58-Konzentration kultivierten Virus weiterhin durch 20 µg/ml RDP58 gehemmt wird. Hieraus ist ersichtlich, dass HIV-1 BaL nach mehrwöchiger Substanzexposition keine erkennbaren Resistenzen gegen das Peptid ausgebildet hat.

Das Ergebnis des alamarBlue-Assays (B) zeigt wieder, dass die DMSO-behandelten Zellen aufgrund der hohen Viruslast ab Tag 9 absterben, wobei die RDP58-behandelten Zellen am Experimentende noch vital sind.

Schlussfolgerung:

RDP58 ist in der Lage, auch nach einer erfolgten Infektion die Virusvermehrung einzudämmen. Hierbei spielt der Zeitpunkt der Verabreichung eine wichtige Rolle. Je früher die Substanz zu der infizierten Kultur hinzu gegeben wird, desto besser kann die Virusreplikation inhibiert werden.

Das Peptid zeigt in der Zellkultur eine Nachhaltigkeit der antiviralen Wirkung von etwa drei Tagen, d.h. entfernt man RDP58 aus der Kultur, so beginnt das Virus nach etwa drei Tagen wieder zu replizieren. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass RDP58 weder die Infektion an sich noch die Integration der proviralen DNA hemmt.

Interessanterweise war auch nach einer mehrwöchigen Exposition der Zellen mit einer suboptimalen Substanzkonzentration keine Resistenzbildung nachweisbar.

5.6 Funktionsstudien

Der bisherige Teil dieser Arbeit bestätigt eine antivirale Wirkung des RDP58-Peptids. In den nun folgenden Experimenten sollte die Wirkungsweise des Peptids näher untersucht werden. In den nächsten Kapiteln wurde deshalb systematisch der HIV-Replikationszyklus unter dem Einfluss des Wirkstoffs untersucht.

5.6.1 Einfluss von RDP58 auf die Rezeptorexpression

In diesem Experiment sollte geklärt werden, ob das Peptid die Expression bzw. die Oberflächenpräsentation der zur Infektion notwendigen CD4-Rezeptoren und/oder des Korezeptors (CXCR4) beeinflusst.

Für diese Studie wurden PM1 Zellen für eine Woche in 20 µg/ml RDP58 oder DMSO präinkubiert. Nach der Präinkubation erfolgte eine Detektion der Rezeptoren durch fluoreszenzgekoppelte CD4- und CXCR4-Antikörper. Die Visualisierung der Oberflächenrezeptoren erfolgte mittels FACS-Analyse.

	CD4-Rezeptor	CXCR4-Corezeptor
RDP58[20]	89,6 %	89,3 %
DMSO	93,7 %	90,6 %

Tab. 5.1: Präsentation der HIV-1-spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

Die tabellarisch (Tab. 5.1) dargestellte FACS-Auswertung zeigt den prozentualen Anteil der HIV-1-spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche von RDP58- und DMSO-behandelten Zellen. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass RDP58 weder die Expression noch die Oberflächenpräsentation der CD4- bzw. CXCR4-Rezeptoren beeinflusst. Anhand dieser Ergebnisse kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das Peptid bestimmte Bindungsstellen der Rezeptoren blockiert.

5.6.2 Neuinfektion von Zellen und Integration des Provirus unter RDP58

Anhand der nächsten Experimente sollte überprüft werden, ob das Virus in Anwesenheit des Peptids mit der Zellmembran fusioniert, sein RNA- in ein DNA-Genom revers transkribiert und die provirale DNA in das Wirtsgenom integriert.

Wie unter Kapitel 4.2.3 beschrieben, kann eine Neuinfektion mit anschließender reverser Transkription mittels einer PID-PCR nachgewiesen werden. Der Nachweis des bereits integrierten proviralen Genoms erfolgt mit Hilfe einer Alu-PCR.

Hierzu wurden PM1 Zellen für vier Tage in 20 µg/ml RDP58 oder DMSO kultiviert und anschließend gleiche Zellmengen mit 40 ng HIV-1 NL4-3 infiziert. Genomische DNA wurde mittels DNAzol (Kap. 3.9.4) von uninfizierten (UN) und von infizierten Zellen jeweils 30, 60, 90 und 120 min nach Infektionsbeginn isoliert.

Eine Isolierung der genomischen DNA mittels DNAzol ist unbedingt erforderlich, da RDP58 dadurch vollständig aus der Probe entfernt wird. Schon bei Anwesenheit von geringen Mengen an Peptid in einer Polymerasekettenreaktion wird der Ablauf dieser gravierend gestört (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe der PID-PCR konnte nun die extrachromosomale zirkuläre virale DNA detektiert und im Agarosegel (Kap. 3.9.6) sichtbar gemacht werden. Als interne Kontrolle diente eine β-Globin-PCR mit gleichen Ausgangsmengen an genomischer DNA.

Abb. 5.14 zeigt eindeutig, dass zum gleichen Zeitpunkt nach der Infektion extrachromosomale zirkuläre virale DNA (PID) sowohl in den Substanz- (RDP58) als auch in

den DMSO-behandelten Zellen nachgewiesen wurde. Folglich inhibiert RDP58 weder die Neuinfektion von Zellen noch die reverse Transkription der viralen RNA.

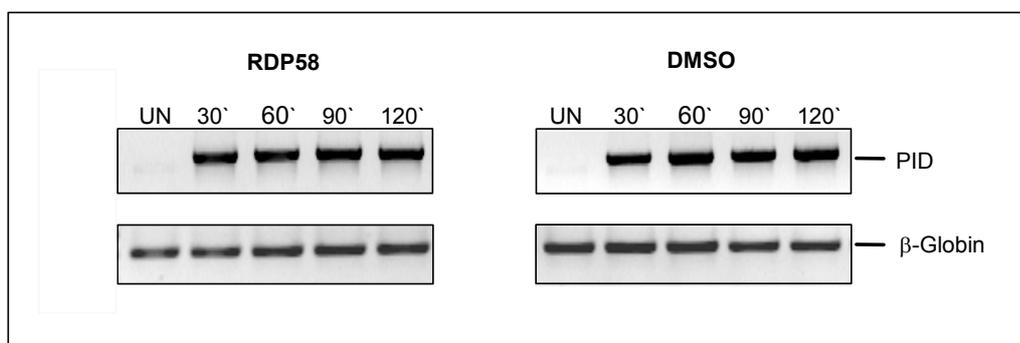


Abb. 5.14: Neuinfektion in Anwesenheit von RDP58. PM1 Zellen wurden für vier Tage in Anwesenheit von 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 oder DMSO kultiviert und anschließend mit HIV-1 NL4-3 infiziert. Genomische DNA wurde von uninfizierten (UN) und von infizierten Zellen 30, 60, 90 und 120 Minuten nach der Infektion isoliert. Mittels PCR wurde die extrachromosomale 1-LTR enthaltende zirkuläre präintegrative virale DNA (PID) detektiert.

Im Rahmen dieses Experiments sollte außerdem überprüft werden, ob sich die virale DNA als Provirus in das Wirtsgenom integriert. Hierzu wurden die infizierten Zellen für sechs weitere Tage in Medium mit 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 oder DMSO kultiviert. Am dritten Tag nach der Infektion erfolgte die Extraktion der genomischen DNA mit anschließender Alu-PCR Analyse. Als interne Kontrolle wurde eine β -Globin-PCR mit den gleichen Mengen an genomischer DNA angefertigt. Zusätzlich wurde am Tag 6 die inhibitorische Wirkung von RDP58 durch eine p24-Antigenanalyse kontrolliert.

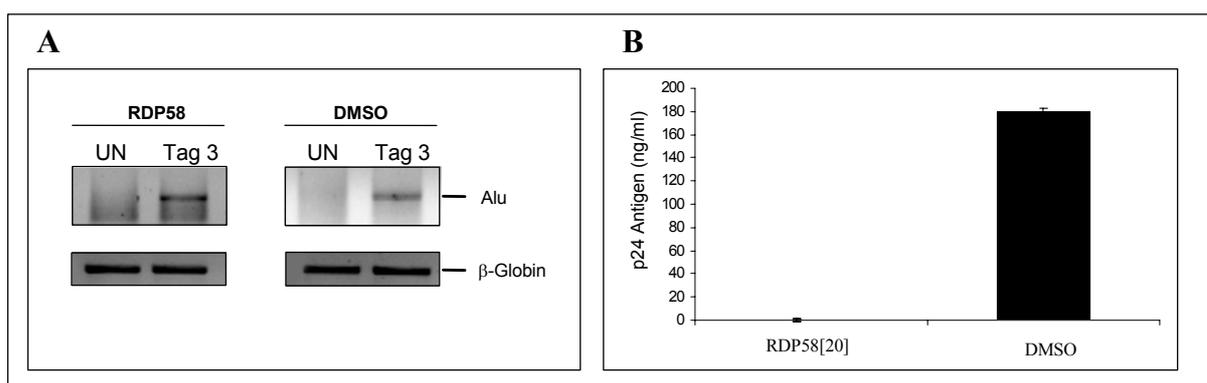


Abb. 5.15: Integration der proviralen DNA in Anwesenheit von RDP58. (A) Genomische DNA wurde von uninfizierten (UN) und von für drei Tage (Tag 3) infizierten Zellen isoliert und mit Primern amplifiziert, die spezifisch für den LTR-Bereich von HIV-1 NL4-3 und die chromosomalen Alu-Sequenzen sind. (B) Die Grafik zeigt den p24-Antigengehalt (ng/ml) an Tag 6 nach der Infektion.

In Abb. 5.15 A ist das Ergebnis der Alu-PCR zu sehen. Hier wird bestätigt, dass es trotz RDP58-Behandlung (linke Seite) zu einer Integration der viralen DNA in das Wirtszellgenom kommt.

Die Grafik unter B zeigt den p24-Antigengehalt des Überstandes am Tag 6 nach der Infektion. Während in der DMSO-Kontrollkultur deutlich Virus nachweisbar ist, konnte in der RDP58-behandelten Kultur kein p24-Antigen gemessen werden.

5.6.3 Zellfusionsanalyse in Anwesenheit von RDP58

Die Zellfusionsanalyse (Kap. 3.7) wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Pöhlmann (Erlangen) durchgeführt. Sie gibt darüber Aufschluss, ob das RDP58-Peptid die Rezeptor-vermittelte Fusion von HIV-1 beeinflusst und zusätzlich, ob das Tat-Protein unter RDP58 in der Lage ist, die Transkription zu ermöglichen.

Hier wurden 293T Zellen mit einem HIV-1 Env-exprimierenden Plasmid (NL4-3-env bzw. Yu-2-env) oder einem pcDNA3-Kontrollplasmid (Kontrolle) und einem Tat-exprimierenden Plasmid des Affen-Immundefizienzvirus (Simian Immundefizienzvirus, SIV) transient transfiziert. 24 Stunden nach dieser Transfektion exprimierten die 293T Zellen Tat und Env (YU2/M-troph; NL4-3/T-troph). Als Negativkontrolle dienten 293T Zellen, die ausschließlich mit dem parentalen Vektor pcDNA3 und dem Tat-exprimierenden Vektor transfiziert waren.

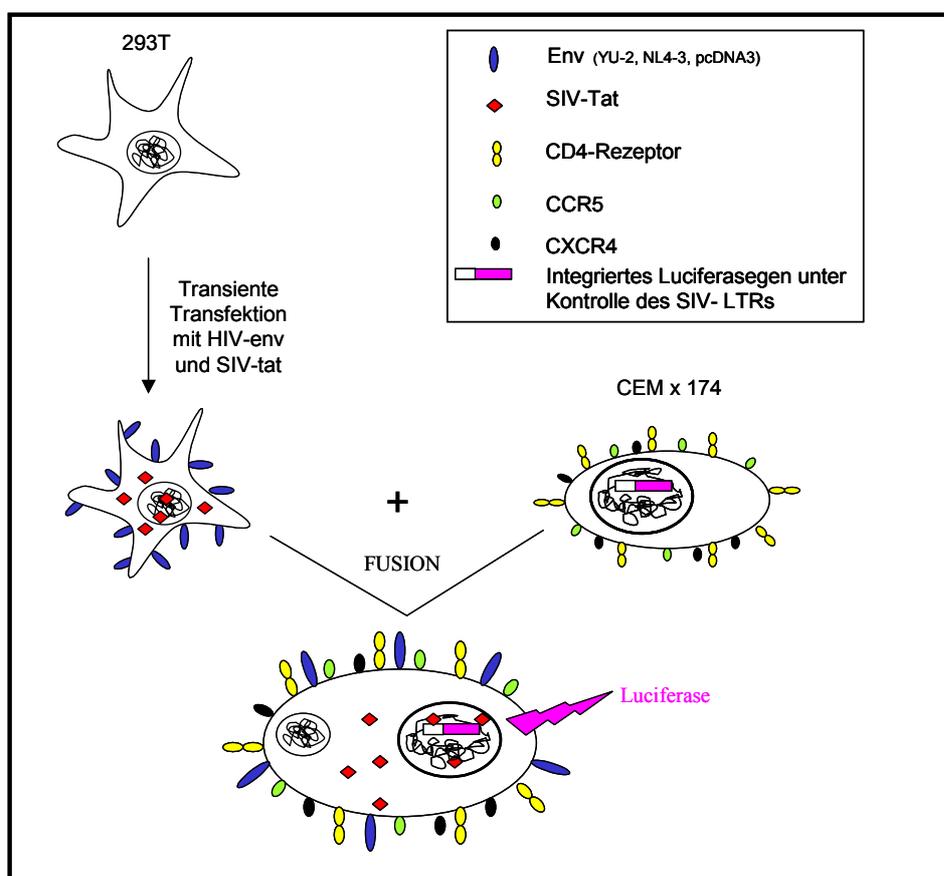


Abb. 5.16: Schematische Darstellung der Zellfusionsanalyse.

Die Env-exprimierenden 293T Zellen sollten nun in der Lage sein mit CEMx174 Zellen zu fusionieren, welche die Oberflächenrezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5 besitzen. Zusätzlich enthalten die CEMx174 Zellen ein stabil ins Genom integriertes Luciferasegen, dessen Transkription durch ein SIV-LTR kontrolliert wird (Abb. 5.16). Kommt es nun zur Fusion der transfizierten 293T mit den CEMx174 Zellen, so gelangt Tat aus den 293T in den Kern der CEMx174 Zellen und führt dort durch Bindung an ein im LTR lokalisiertes Strukturelement zur Expression der Luciferase.

Es wurden 293T Zellen transient transfiziert (Kap. 3.2.10) und am darauf folgenden Tag für eine Stunde mit 20 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml RDP58- oder DMSO-behandelt. Vor der Zugabe der CEMx174- zu den 293T-Zellen wurden auch diese mit den gleichen RDP58/DMSO-Konzentrationen für eine Stunde inkubiert. Die Kultivierung erfolgte, wie im Methodenteil (Kap. 3.7) beschrieben, und nach 72 Stunden wurde die Luciferaseaktivität (Kap. 3.3.3) bestimmt.

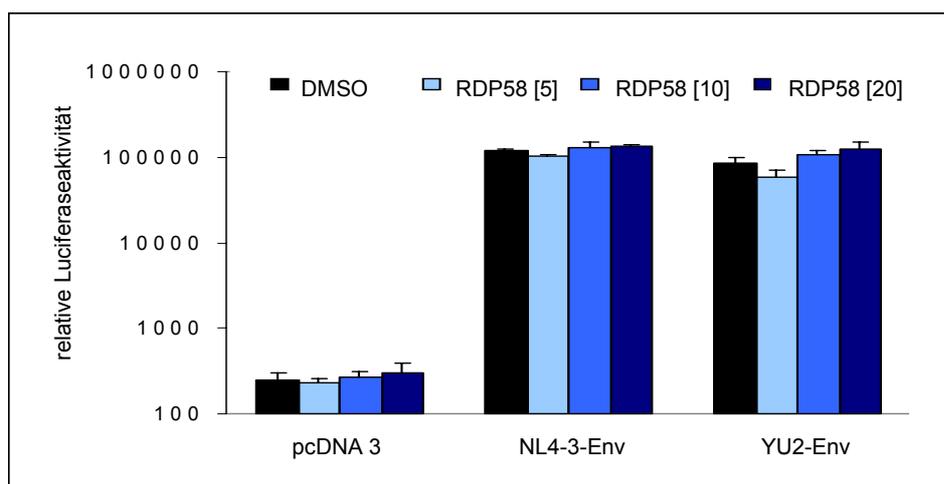


Abb. 5.17: Zellfusionsanalyse in Anwesenheit von RDP58. 293T Zellen wurden mit Env- und SIV-Tat-exprimierenden Plasmiden transient transfiziert, als Kontrolle fungierte pcDNA3. Vor Beginn der Ko-Kultivierung mit CEMx174 Zellen erfolgte eine einstündige Präinkubation der Zellen mit 20 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml RDP58 oder DMSO. Die Env-vermittelte Zellfusion und die Tat-abhängige Luciferaseexpression wurden nach 72 h analysiert.

Abb. 5.17 zeigt die relative Luciferaseaktivität 72 Stunden nach der Zellfusion. Innerhalb der pcDNA3-transfizierten Zellen kam es, wie erwartet, aufgrund eines fehlenden Hüllproteins zu keiner Fusion und folglich auch zu keiner Luciferaseexpression. Die 293T Zellen, welche das Env-Protein (NL4-3-Env, YU2-Env) exprimierten, konnten trotz Anwesenheit des Peptids (RDP58[20], [10], [5]) mit den CEMx174 Zellen fusionieren, und es kam im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) zu nahezu identischen Luciferaseaktivitäten. Die Ergebnisse zeigen, dass der Wirkstoff weder die Rezeptor-vermittelte Fusion noch die Tat-vermittelte Transkription blockiert.

5.6.4 Zell-Pseudotypen-Fusion unter RDP58

Um das oben dargestellte Ergebnis auch im viralen Kontext zu untersuchen, wurde eine Zell-Virus-Fusionsanalyse (Kap. 3.8) durchgeführt.

Dazu wurden VSV-G-, NL4-3-Env- und YU2-Env pseudotypisierte Viren zur Infektion von CEMx174 Zellen verwendet. Kommt es zu einer erfolgreichen Infektion der Zellen, so wird Tat gebildet und folglich Luciferase exprimiert.

Um dies zu untersuchen, mussten einerseits die pseudotypisierten Viren und andererseits die Zielzellen mit dem Peptid vorbehandelt werden.

Die Viren wurden für 1 h mit 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ und 5 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 bzw. mit dem RDP58-Lösungsmittel DMSO präinkubiert und anschließend mit CEMx174 Zellen versetzt. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte 72 Stunden später.

Die Präinkubation der CEMx174 Zellen erfolgte für 1 h mit den oben genannten RDP58-Konzentrationen oder mit DMSO. Anschließend wurden die Zellen mit den pseudotypisierten Viren infiziert. Die Kultivierung und Luciferasemessung erfolgte wie zuvor beschrieben.

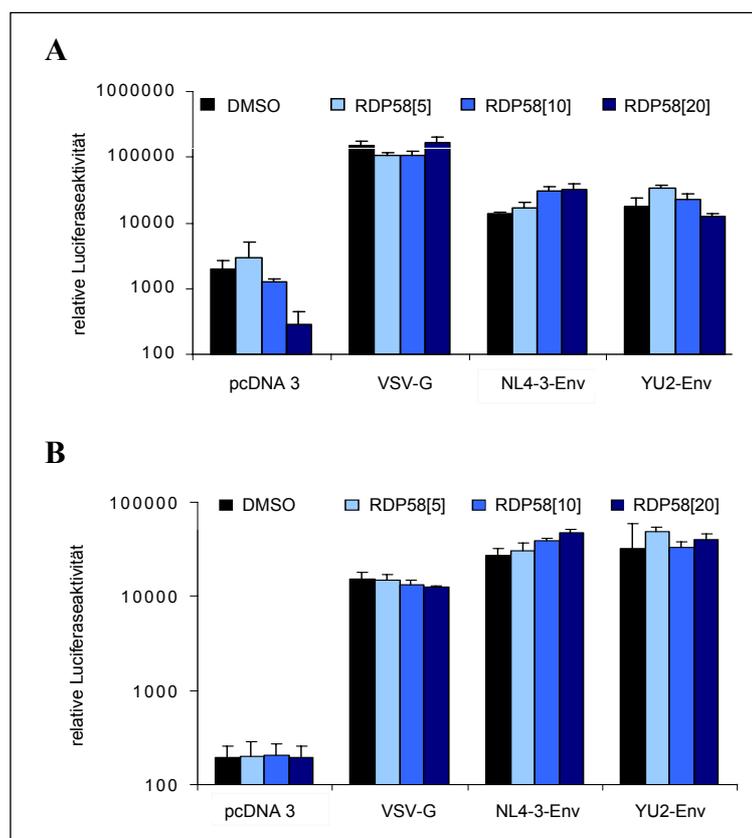


Abb. 5.18: Zell-Virus-Fusion in Anwesenheit von RDP58. Vor der Zell-Virus-Fusion wurden entweder die Viren (A) oder die Zellen (B) mit 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ und 5 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 oder DMSO präinkubiert. Die Analyse der Luciferaseaktivität erfolgte 72 h nach der Infektion.

Grafik (A) der Abb. 5.18 zeigt die relative Luciferaseaktivität nach RDP58- oder DMSO-Behandlung der Viren, wohingegen Grafik (B) das Ergebnis nach Behandlung der Zellen darstellt. Weder in Darstellung (A) noch in (B) ist im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ein signifikanter Unterschied der Luciferaseaktivität in den RDP58-behandelten Proben zu verzeichnen.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der Zellfusionsanalyse und der Zell-Pseudotypen-Fusion, dass RDP58 keinen negativen Einfluss auf die Oberflächenpräsentation der HIV-spezifischen Rezeptoren, die Virus-Zellfusion, die reverse Transkription, die Integration und die Tat-abhängige Transkription ausübt.

5.6.5 Einfluss von RDP58 auf HIV-1-Transaktivatoren

In den beiden folgenden Kapiteln sollte mit Hilfe der Reporter-genanalyse untersucht werden, ob RDP58 einen Einfluss auf die viralen Transaktivatoren Tat und Rev besitzt.

5.6.5.1 Einfluss von RDP58 auf die Tat-Transaktivierung

Nach den in Kapitel 5.6.3 und 5.6.4 durchgeführten Analysen der Tat-Transaktivierung erfolgte hier zusätzlich eine Reporter-genanalyse (Abb. 4.18) zur Kontrolle der Tat-Funktion in Anwesenheit von RDP58.

Hierzu wurden HeLaCD4-CAT Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamin (Kap. 3.2.8) mit 1,0 µg pBC12/HIV/CAT, 0,5 µg pcTat oder 0,5 µg pBC12/CMV (negative Kontrolle) und 0,6 µg pBC12/CMV/βGal (interne Kontrolle) transient transfiziert. Nach Entfernen des Transfektionsmediums wurden die Zellen in Anwesenheit von 20 µg/ml RDP58 oder DMSO für weitere 48 h kultiviert. Die Analyse der Reporter-genexpression erfolgte, wie unter Kapitel 3.3 beschrieben.

Abb. 5.19 zeigt, dass es bei Abwesenheit des Tat-Transaktivators (-Tat) nur zu einer sehr geringen CAT-Expression kam, da die Prozessivität der Transkription blockiert war [46]. Durch den Zusatz des Tat-exprimierenden Plasmids (+Tat) kam es sowohl in den Kontroll- als auch in den Peptid-behandelten Zellen zu einer deutlichen Steigerung der CAT-Expression. Das Ergebnis bestätigt die bisherigen Beobachtungen, dass RDP58 die Tat-vermittelte Transkription nicht beeinflusst.

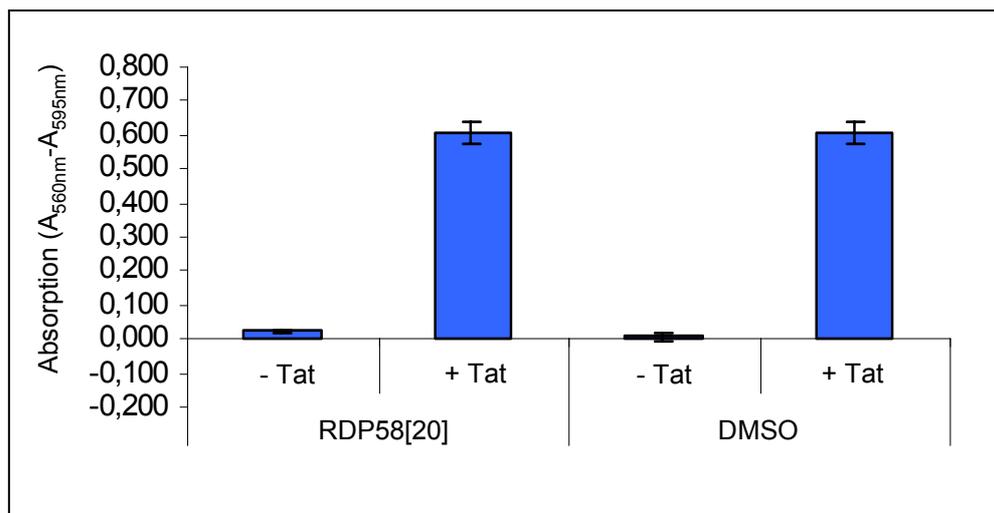


Abb. 5.19: Tat-Reportergenanalyse. HeLaCD4-CAT Zellen wurden mit pBC12/HIV/CAT, einem Tat exprimierenden Vektor (+Tat) oder einem korrespondierenden parentalen Kontrollplasmid (-Tat) und mit einem internen Kontrollvektor pBC12/CMV/ β Gal transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in Medium mit 20 μ g/ml RDP58 oder DMSO kultiviert und die Tat-Transaktivierung 48 Stunden nach der Transfektion durch einen CAT-Assay ermittelt. Alle gemessenen CAT-Werte wurden mit Hilfe der ermittelten β -Galactosidasewerte auf identische Transfektionseffizienzen angeglichen.

5.6.5.2 Einfluss von RDP58 auf die Rev-Transaktivierung

Wie auch schon unter Kapitel 4.5.1 beschrieben, vermittelt der essenzielle Rev-Transaktivator den Transport der ungespleißten und einfach gespleißten viralen mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma.

Im nächsten Experiment sollte mittels einer Reportergenanalyse (Abb. 4.16) überprüft werden, ob das RDP58-Peptid einen Einfluss auf die Rev-Transaktivierung ausübt. HeLaCD4-CAT Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamin mit 0,6 μ g pCMVgagLucRRE, 0,3 μ g pcRev bzw. 0,3 μ g pBC12/CMV (negative Kontrolle) und 0,3 μ g pBC12/CMV/ β Gal (interne Kontrolle) transient transfiziert und nach Entfernen des Transfektionsmediums für 48 h in Gegenwart von 20 μ g/ml RDP58 oder DMSO kultiviert. Die Reportergenanalyse erfolgte, wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben.

Abb. 5.20 zeigt die ermittelte Luciferaseaktivität unter Berücksichtigung der interne Kontrolle. Bei Abwesenheit von Rev (-Rev) verblieb die Reporter-gen-mRNA hauptsächlich im Zellkern und es kam zu keiner signifikanten Luciferaseaktivität [164]. Bei Anwesenheit des Rev-Transaktivators (+Rev) wurde die Reporter-mRNA Rev-abhängig in das Zytoplasma transportiert. Es wurde sowohl in den RDP58-behandelten Zellen als auch in den Kontrollzellen (DMSO) eine vergleichbare Luciferaseaktivität gemessen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Peptid keinen Einfluss auf den Rev-vermittelten Kernexport ausübt.

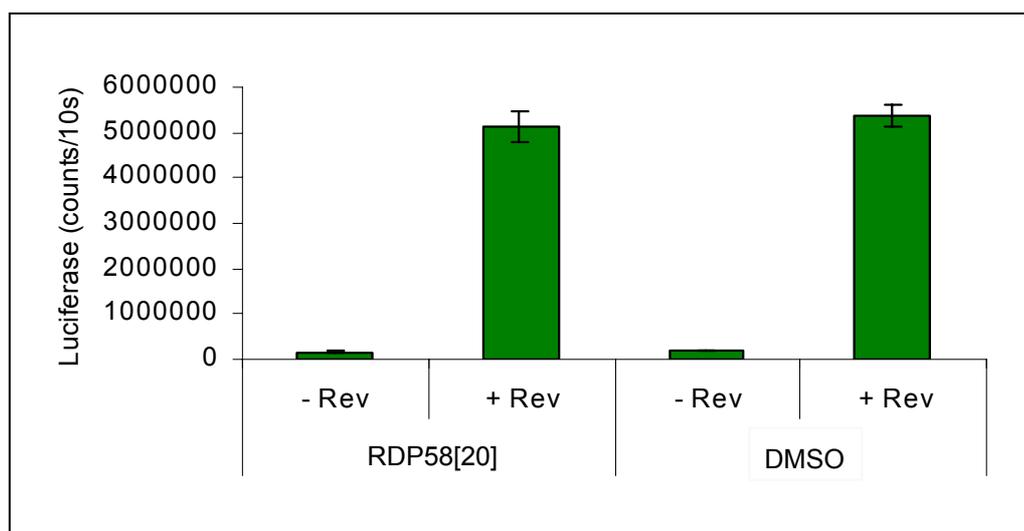


Abb. 5.20: Rev-Reportergenanalyse. HeLaCD4-CAT Zellen wurden mit pCMVgagLucRRE, einem Rev exprimierenden Vektor (+Rev), oder mit einem korrespondierenden parentalen Kontrollplasmid (-Rev) und mit einem internen Kontrollvektor pBC12/CMV/ β Gal transient transfiziert. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von 20 μ g/ml RDP58 oder DMSO. Die Rev-Transaktivierung wurde 48 Stunden nach der Transfektion durch einen Luciferaseassay ermittelt. Die Angleichung der Werte erfolgte durch eine Verrechnung der Luciferase- mit der β -Galactosidase-messung.

5.6.6 Transkription und Lokalisation der viralen mRNAs in RDP58-behandelten Zellen

Die nach Transkription und Spleißen vorliegenden viralen mRNAs werden in drei Klassen gemäß ihrer Länge (Kilobasenpaare, Kb) eingeteilt. Die 2 Kb-Klasse ist mehrfach gespleißt und kodiert für die Proteine Tat, Nef und Rev. Einfach gespleißte mRNAs (4 Kb-Klasse) kodieren für die Proteine Env, Vif, Vpr und Vpu, während von den ungespleißten mRNAs (9 Kb-Klasse) die Gag- und Pol-Proteine translatiert werden. Die mRNAs der 4 Kb- und 9 Kb-Klasse enthalten das *Rev response element* (RRE), welches durch *env*-spezifische Sequenzen gebildet wird [73,124,164]. Die entsprechenden Transkripte unterliegen dadurch der Rev-Regulation, während mRNAs der 2 Kb-Klasse Rev-unabhängig exprimiert werden.

Um mögliche Einflüsse des Peptids auf die Transkription und Lokalisation der viralen mRNAs zu untersuchen, wurden PM1 Zellen mit 9 ng HIV-1 NL4-3 infiziert. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von 20 μ g/ml RDP58 oder DMSO. Am Tag 3 wurden die Zellen passagiert und mit frischer Substanz versetzt. Der Versuch wurde am Tag 6 nach der Infektion beendet und es erfolgte die Entnahme des Kulturüberstandes zur p24-Antigenbestimmung, die Vitalitätsmessung (alamarBlue-Assay) und die Isolierung der Gesamt- und zytoplasmatischen RNA (Kap. 3.10.2). Nach Einstellen der RNAs auf die gleiche

Menge (15 μ g) konnten diese nach der unter Kapitel 3.10.4 beschriebenen Methode analysiert werden.

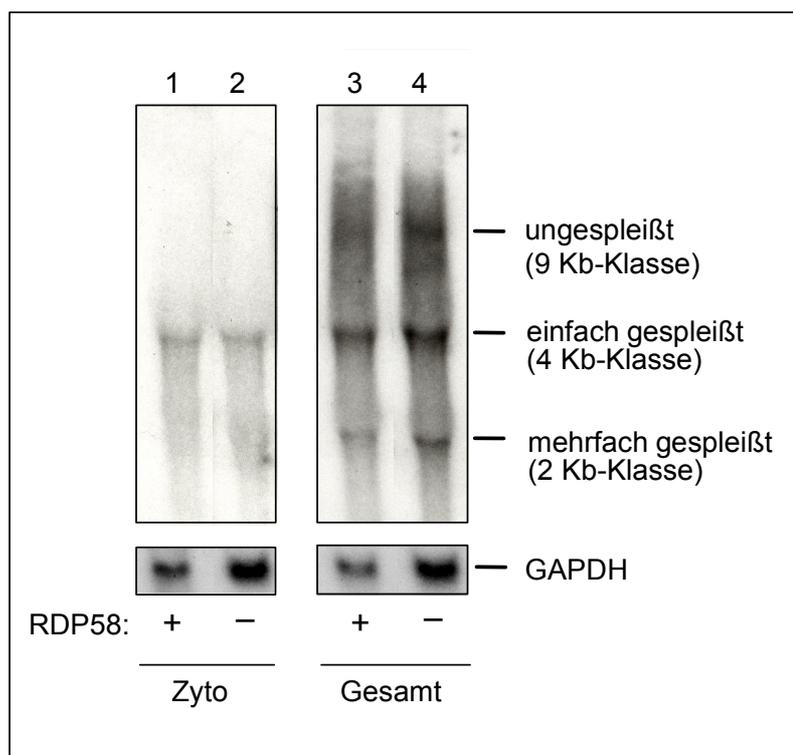


Abb. 5.21: Transkription und Lokalisation der viralen mRNAs. PM1 Zellen wurden für sechs Tage mit HIV-1 NL4-3 infiziert, in Anwesenheit von 20 μ g/ml RDP58 (Spur 1 und 3) oder DMSO (Spur 2 und 4) kultiviert, und anschließend wurden die fraktionierte mRNAs mittels eines Northern Blots analysiert. Die Abbildung zeigt auf der linken Seite die zytoplasmatische (Zyto) und auf der rechten die Gesamt-RNA (Gesamt).

Abb. 5.21 zeigt das Ergebnis der Northern Blot Analyse. Auf der linken Seite ist die Detektion der zytoplasmatischen mRNA (Zyto) abgebildet. Hier ist deutlich die einfach gespleißte (4 Kb) und nur marginal die mehrfach gespleißte (2 Kb) virale mRNA zu erkennen. Die ungespleißte (9 Kb) mRNA war möglicherweise aufgrund einer zu geringen Menge in dieser Fraktion nicht detektierbar. Vergleicht man nun die einfach gespleißte RNA der RDP58-behandelten (Spur 1) mit der der DMSO-behandelten (Spur 2) Zellen, so ist kein signifikanter Unterschied in der Intensität zu beobachten. Dies bestätigt das Ergebnis der Rev-Reporteranalyse, in der RDP58 keinen Einfluss auf den Rev-abhängigen Kernexport der RRE-enthaltenden mRNAs in das Zytoplasma zeigte.

Auf der rechten Seite ist die Gesamt-RNA (Gesamt) abgebildet. Hier sind alle drei mRNA-Typen deutlich zu erkennen. Vergleicht man unter Berücksichtigung der GAPDH-Kontrolle die Intensität der mRNAs der RDP58- (Spur 3) mit den DMSO-behandelten (Spur 4) Zellen, so ist auch hier kein eindeutiger Unterschied der mRNA-Expression zu detektieren.

Zugleich bestätigte die p24-Antigenbestimmung die Inhibition der Replikation in den RDP58-behandelten Zellen (0,44 ng/ml) gegenüber der DMSO-Kontrolle (1,78 ng/ml).

Aus diesem Experiment kann daher geschlossen werden, dass durch die Inkubation infizierter Zellen mit RDP58 weder die Transkription, die RNA-Stabilität, das Spleißen noch der Transport der mRNAs in das Zytoplasma beeinflusst wird.

5.6.7 Einfluss von RDP58 auf die Translation viraler mRNA

Iyer *et al.* beschrieben in einer früheren Veröffentlichung [89], dass Allograp 1258 (RDP58) die Translation der TNF- α -mRNA hemmt. Aus diesem Grund sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, welchen Einfluss RDP58 auf die Translation viraler mRNAs ausübt. Dazu wurden Western Blot Analysen zum Nachweis der Env- und der Gag-Proteine durchgeführt.

5.6.7.1 Einfluss von RDP58 auf die Env-Expression

In die Hülle von HI-Viren sind die viralen Glykoproteine gp120 und gp41 eingelagert. Beide Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein (160 kD) gebildet. Die Spaltung in die beiden funktionellen Proteine erfolgt während der Virusmorphogenese durch eine zelluläre Protease [134].

Um zu überprüfen, ob RDP58 die Translation der viralen env-mRNA beeinflusst, wurden PM1 Zellen mit 17 ng HIV-1 NL4-3 infiziert und für acht Tage in Anwesenheit von 20 μ g/ml RDP58 oder DMSO, wie oben beschrieben, kultiviert. Am Tag 8 wurde Gesamtzellextrakt isoliert und dieselben Proteinmengen durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der immunologische Nachweis des gp120^{Env}-Proteins erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (Kap. 2.9.1). Als Ladekontrolle diente das im Zellextrakt enthaltene α -Tubulin-Protein.

Aus Abb. 5.22 geht hervor, dass acht Tage nach der Infektion in den Peptid-behandelten Zellen (Spur 1) kein gp120^{Env}-Protein detektiert werden konnte. Hingegen war in der DMSO-Kontrolle (Spur 2) das gp120^{Env}-Protein klar nachweisbar.

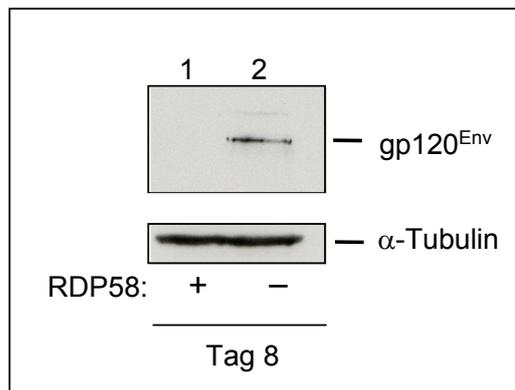


Abb. 5.22 Env-spezifische Western Blot Analyse. Am Tag 8 nach der Infektion wurden die RDP58- (Spur 1) und die DMSO-behandelten (Spur 2) Zellen lysiert und gp120^{Env} im Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle diente α-Tubulin.

5.6.7.2 Einfluss von RDP58 auf die Gag-Expression

Zu den gruppenspezifischen Antigenen (Gag-Proteine) zählen das Matrix- (p17), das Kapsid- (p24), das Nukleokapsid- (p7) und das Link-Protein (p6). Synthetisiert werden die Gag-Proteine aus einem 55 kD großen Vorläuferprotein, das durch die virale Protease im Verlauf der Virusmorphogenese in die einzelnen Komponenten gespalten wird [134].

Im folgenden Experiment sollte die Wirkung von RDP58 im Hinblick auf die Translation der gag-enthaltenden mRNA und die Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins untersucht werden. Hierzu erfolgte die Infektion von PM1 Zellen mit 11 ng HIV-1 NL4-3 mit anschließender Kultivierung in Gegenwart von 20 µg/ml RDP58 oder DMSO. An den Tagen 2, 3, 4, 5 und 8 nach der Infektion wurde ein Anteil der Zellen für eine Western Blot Analyse lysiert und die restlichen Zellen in Medium mit Substanz oder mit DMSO weiterkultiviert. Zusätzlich erfolgte am Tag 8 nach der Infektion die Messung der Zellvitalität und die Bestimmung der p24-Antigenmenge im Kulturüberstand.

Gleiche Mengen an Protein wurden in einem SDS-Gel separiert und das p24^{Gag}- und p55^{Gag}-Protein mit dem unter Kapitel 4.2.1 beschriebenen Antikörper detektiert.

Abb. 5.23 zeigt die Analyse der Gag-Proteine an den Tagen 3, 4, 5 und 8 nach der Infektion. Das Ergebnis der Western Blot Analyse zeigte, dass ab dem dritten Tag nach der Infektion unter RDP58 (Spur 1, 4, 6, 8) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Spur 2, 5, 7, 9) die p24^{Gag}- und p55^{Gag}-Expression kontinuierlich abnahm. Dies spiegelt auch die Ergebnisse der Infektionsstudien wieder, in denen in Gegenwart von RDP58 der p24-Antigengehalt im Kulturüberstand kontinuierlich gering war.

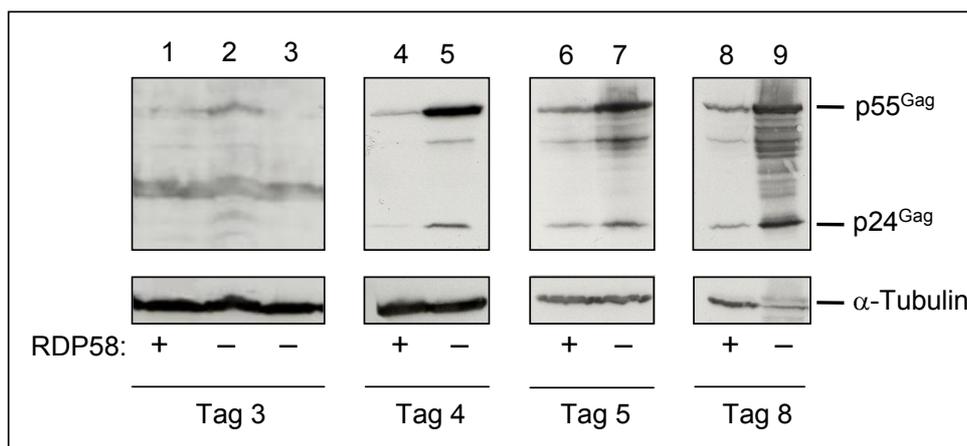


Abb. 5.23 Gag-spezifische Western Blot Analyse. Gesamtextrakt von infizierten PM1 Zellen wurde an den Tagen 3, 4, 5 und 8 nach der Infektion im Western Blot analysiert. Die Abbildung zeigt den p24^{Gag}- und p55^{Gag}-Gehalt der infizierten RDP58- (Spur 1, 4, 6 und 8) und DMSO-behandelten (Spur 2, 5, 7 und 9) sowie von uninfizierten (Spur 3) Zellen zu diesen Zeitpunkten. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

5.6.7.3 Verminderte intrazelluläre Proteinspiegel

Der Replikationszyklus eines HI-Virus von der Infektion bis zur Bildung eines neuen Viruspartikels beträgt etwa 24 Stunden. Da mit Western Blot Analysen jedoch erst drei Tage nach der Infektion Gag-Proteine detektierbar sind, wäre es denkbar, dass reduzierte Gag-Mengen (detektiert ab Tag 3) durch eine Ausverdünnung der infizierten Zellen in der Kultur zustande kam. Das würde bedeuten, dass bei einem Block des viralen Replikationszyklus nach der Translation weniger Viren aus den initial infizierten Zellen freigesetzt werden und dadurch weniger neue Zellen infiziert werden können. Würde dieser Prozess mehrere Tage andauern, so würden immer weniger Zellen neu infiziert und damit immer weniger Viruspartikel neu gebildet werden. Aufgrund dieses „Ausverdünnungs-Effekts“ würde man nach wenigen Tagen innerhalb der RDP58-behandelten Kultur eine geringere Konzentration an viralen Proteinen nachweisen. In diesem Falle würde es sich nicht um eine direkte Inhibition der Translation handeln, sondern um eine Hemmung des viralen Lebenszyklus zu einem späteren Zeitpunkt, beispielsweise auf der Ebene der Virus-Morphogenese und/oder Freisetzung viraler Partikel.

Um dies zu untersuchen, müsste die Anzahl der infizierten RDP58- und DMSO-behandelten Zellen möglichst identisch sein und zusätzlich eine Neuinfektion verhindert werden (*single round of virus replication*). Hierzu wurden $2,5 \times 10^5$ HeLaCD4-CAT bzw. 293T Zellen mit $0,25 \mu\text{g}$ pNL_{LucR}E⁻ (exprimiert kein Env, Kap. 2.5.2.4) und $0,5 \mu\text{g}$ pBC12/CMV/SEAP transient transfiziert (Kap. 3.2.9, 3.2.10). Aufgrund der transienten Transfektion der Zellkulturen mit Plasmid-Vektoren, und der Tatsache, dass keine Env-Proteine exprimiert

werden, ist sichergestellt, dass keine Neuinfektion stattfinden kann. In den transfizierten Zellen kommt es jedoch trotzdem zur Integration der proviralen DNA und zur Synthese viraler Proteine.

Nach der Transfektion erfolgte die Kultivierung der Zellen für 48 Stunden in Anwesenheit von 20 µg/ml RDP58 oder DMSO. Danach wurde aus dem zellfreien Kulturüberstand der p24-Antigen- und SEAP-Gehalt bestimmt. Die Kontrolle der Gag-Expression erfolgte mittels Western Blot Analyse (Kap. 5.6.7.2).

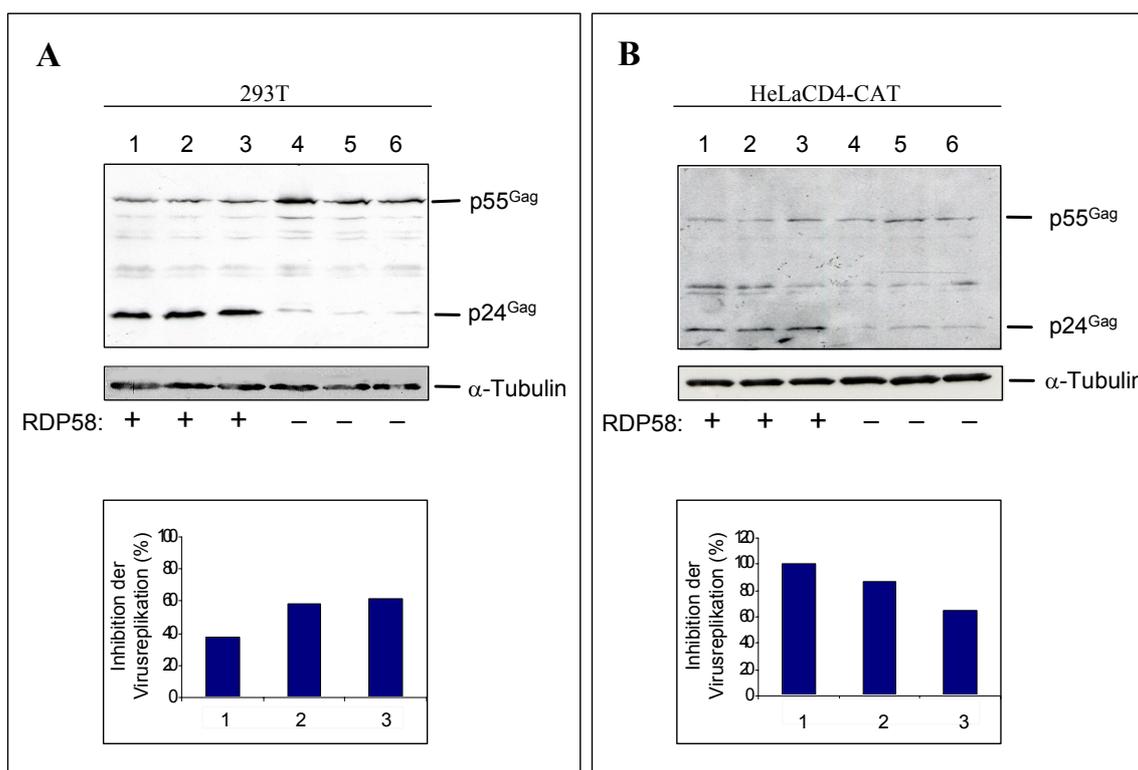


Abb. 5.24: Transiente Transfektion mit replikationsdefizientem NL4-3 und anschließender Western Blot Analyse. 293T (A) oder HeLaCD4-CAT (B) Zellen wurden mit pNL_{LucRE} und einem internen Kontrollvektor pBC12/CMV/SEAP transient transfiziert. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Western Blot Analyse der Gag-Proteine 48 Stunden nach der Transfektion innerhalb der RDP58-Triplicate (Spur 1-3) und der DMSO-behandelten Zellen (Spur 4-6). Der untere Teil stellt die prozentuale Inhibition der RDP58-behandelten Zellen (Balken 1-3) nach Verrechnung mit den Werten der SEAP-Kontrolle dar.

In Abb. 5.24 A ist das Ergebnis der 293T- und unter B das der HeLaCD4-CAT Zellen zu sehen. In der oberen Bildhälfte ist die Western Blot Analyse und in der unteren die prozentuale Inhibition der Virusreplikation (nach Verrechnung mit den Werten der SEAP-Kontrolle) in den RDP58-behandelten Zellen dargestellt.

Vergleicht man das erhaltene Signal der Gag-Proteine (obere Hälfte) der RDP58- (Spur 1-3) mit dem der DMSO-Zell-Lysate (Spur 4-6), so ist keine Inhibition der Proteintranslation zu erkennen. Es scheint, dass es in beiden Zelllinien in Anwesenheit des Peptids zu einer

verstärkten Prozessierung des p55-Vorläufers zum p24-Kapsidprotein kam. Berücksichtigt man auch die prozentuale Inhibition des p24-Antigengehalts im Kulturüberstand (untere Hälfte), so findet man in den RDP58-behandelten Kulturen (Balken 1-3) eine deutlich geringere Viruslast als im Kulturüberstand der DMSO-Kontrolle.

Da die Methode der Transfektion einen Teil des viralen Replikationszyklus nicht berücksichtigt, sollte das erhaltene Ergebnis (Abb. 5.24) nochmals durch ein Infektionsexperiment überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden HeLa Zellen mit 100 ng VSV-G-pseudotypisiertem NL4-3 infiziert (Kap. 3.6.2). Nach der Infektion wurde die gleiche Anzahl an Zellen auf einer Zellkulturplatte ausgesät und je drei Vertiefungen (\varnothing 3,5 cm) in Medium mit 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 oder DMSO kultiviert. Durch die Integration des Provirus in das Genom der Wirtszelle werden kontinuierlich neue Viren produziert und sezerniert. Diese Viren können jedoch aufgrund fehlender HIV-1-spezifischer Rezeptoren auf der Oberfläche der HeLa Zellen diese nicht neu infizieren, wodurch das Phänomen einer potenziellen Ausverdünnung nicht mehr zum Tragen kommen sollte.

Vier Tage nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und der Kulturüberstand zur p24-Antigenbestimmung verwendet. Die Analyse des Zellextraktes im Western Blot erfolgte, wie oben beschrieben.

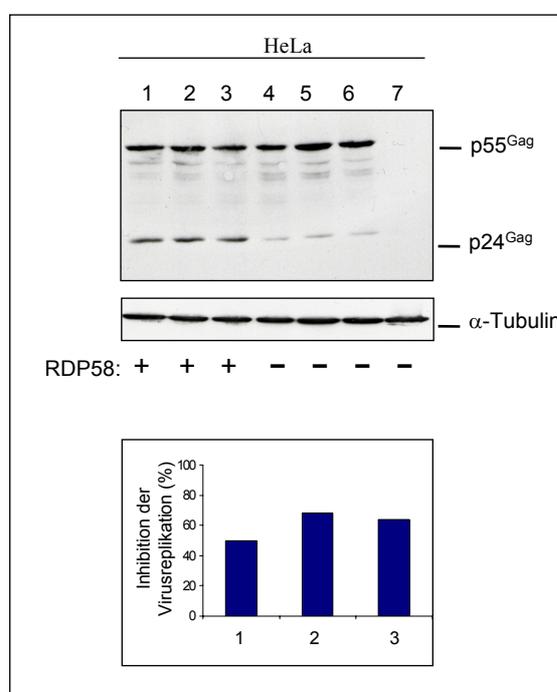


Abb. 5.25: Infektion von HeLa Zellen mit VSV-G-pseudotypisiertem Virus. HeLa Zellen wurden mit VSV-G-pseudotypisiertem NL4-3 infiziert und für vier Tage in Gegenwart von 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 (Spur 1-3) oder DMSO (Spur 4-6) kultiviert. Das Gesamtzell-Lysat wurde auf seinen p24^{Gag}- und p55^{Gag}-Gehalt mittels Western Blot Analyse (oberer Teil) untersucht und der p24-Antigengehalt (unterer Teil, dargestellt ist die prozentuale Inhibition der RDP58-behandelten Zellen) im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Zusätzlich wurde im Western Blot noch der Gesamtzellextrakt von uninfizierten HeLa Zellen (Spur 7) aufgetragen.

Im oberen Teil der Abb. 5.25 ist das Ergebnis der Western Blot Analyse gezeigt. Auch hier fand man innerhalb der RDP58-behandelten Zellen (Spur 1-3) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Spur 4-6) eindeutig mehr p24^{Gag}, während im Überstand der RDP58-behandelten Kulturen eine deutliche Inhibition des p24-Antigenwertes (untere Grafik, Balken 1-3) zu beobachten war. Zusätzlich wurde die Anzahl der viralen Genomäquivalente pro Milliliter Kulturüberstand (Viruslast) bestimmt. Die RDP58-Kultur wies hier $1,4 \times 10^6$ und die DMSO-Kontrolle $8,2 \times 10^6$ Genomkopien pro Milliliter Kulturüberstand auf, was einer prozentualen Inhibition von 83 % entspricht.

Schlussfolgerung

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die geringere Menge an nachweisbaren viralen Proteinen in Anwesenheit von RDP58 (Abb. 5.23) zu einem späteren Zeitpunkt (z.B am vierten Tag nach Infektionsbeginn) höchstwahrscheinlich durch eine Ausverdünnung der Viruspartikel zustande kam. Dies bedeutet, dass RDP58 seine Wirkung erst nach der Translation der viralen mRNA entfaltet und eventuell zu einer verstärkten Prozessierung des p55^{Gag}-Vorläuferproteins zum p24^{Gag}-Kapsid führt, wodurch möglicherweise weniger Viruspartikel aus der Zelle sezerniert werden.

5.6.8 Die Lokalisation von RDP58 in der Zelle

RDP58 ist ein synthetisches Peptid. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass es seine antivirale Wirkung innerhalb der infizierten Zelle entfaltet. Es sollte deshalb eine eventuelle subzelluläre Lokalisation von RDP58 untersucht werden. Auch wäre es denkbar, dass das Peptid nicht in die Zelle aufgenommen wird, sondern an der Zelloberfläche eine rezeptorvermittelte Signalkaskade auslöst und dadurch indirekt seine antivirale Wirkung vermittelt. Bei einer Aufnahme in die Zelle könnte man zudem aufgrund der Lokalisation eventuell einen Hinweis auf den Wirkmechanismus des Peptids erhalten.

Zur Visualisierung von RDP58 wurde das Peptid an den Fluoreszenzmarker 5,6 Carboxyfluorescein (CFSC) gekoppelt, dessen Emission bei 514 nm und dessen Absorption bei 492 nm liegt. Folglich fluoresziert der Peptid-CFSC-Komplex nach entsprechender Anregung grün.

5.6.8.1 Lokalisationskinetik von RDP58-CFSC

Um die Lokalisation des Peptids in einer Zelle über einen Zeitraum von 96 Stunden zu verfolgen, wurden $2,5 \times 10^5$, $2,0 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^5$ HeLaCD4-CAT Zellen pro Vertiefung (\varnothing 3,5 cm) einer Zellkulturplatte (mit Deckgläschen) ausgesät, wobei die hohen Zellzahlen zur Entnahme der frühen und die geringeren Zellzahlen zur Entnahme der späten Zeitwerte dienten. Ab dem darauf folgenden Tag erfolgte die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von 2 $\mu\text{g/ml}$ RDP58-CFSC. Diese Konzentration wurde durch Vorversuche empirisch ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden 24, 48 und 96 Stunden nach RDP58-CFSC-Zusatz mit Paraformaldehyd fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend auf Objektträgern immobilisiert (Kap. 3.12.1). Die mit RDP58-CFSC behandelten Zellen wurden dann mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning-Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

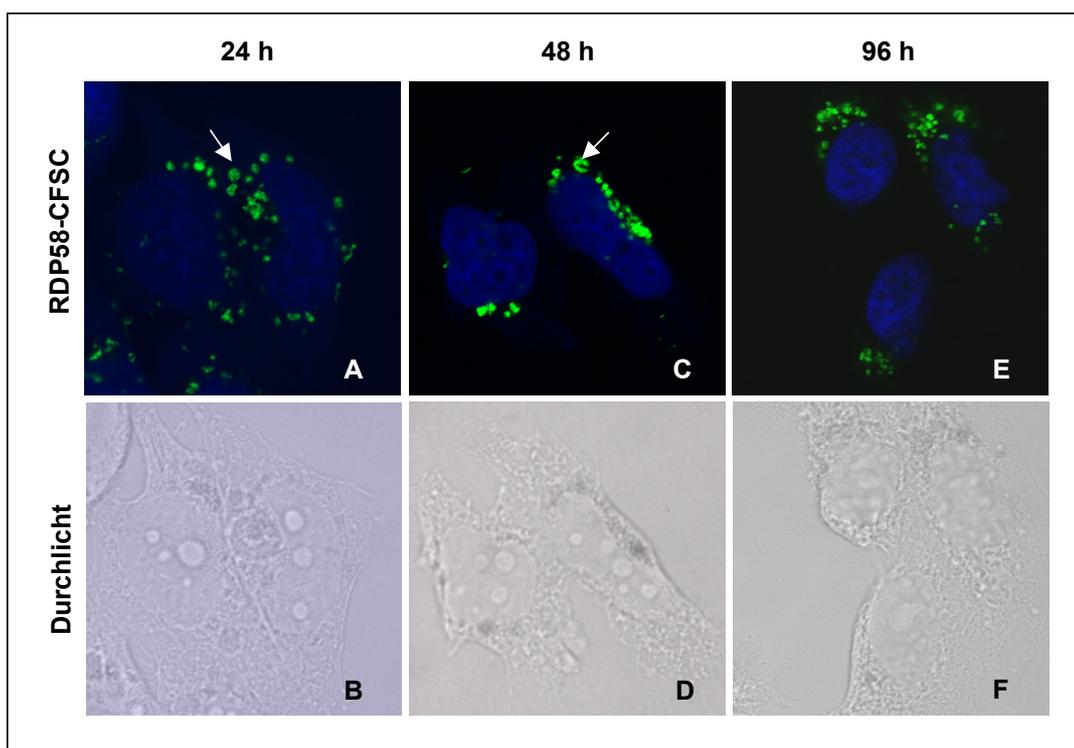


Abb. 5.26: Lokalisationskinetik von RDP58-CFSC. HeLaCD4-CAT Zellen wurden in Anwesenheit von 2 $\mu\text{g/ml}$ RDP58-CFSC kultiviert. Die Analyse der Lokalisation erfolgte 24, 48 und 96 Stunden (Bildfelder A, C und E) nach RDP58-CFSC-Zugabe mittels konfokaler Laser Scanning-Fluoreszenzmikroskopie. Die Kerne sind durch DRAQ5-Färbung (blau: Bildfelder A, C und E) sichtbar gemacht. Die Aufnahmen in der unteren Reihe zeigen die jeweils dazugehörige Durchlichtaufnahme (Bildfelder B, D und F).

Wie Abb. 5.26 zu entnehmen ist, lokalisierte das Peptid (grün) in unmittelbarer Nähe des Zellkerns (blau) im Zytoplasma. RDP58-CFSC verteilte sich punktuell, wobei teilweise auch ringförmige Strukturen (Pfeil) zu erkennen waren. Diese Art der Verteilung könnte auf eine

zelluläre Kolokalisation von RDP58 mit Endosomen, Lysosomen oder Phagosomen hinweisen.

Um auszuschließen, dass diese Lokalisation durch den an das Peptid gekoppelten Fluoreszenzmarker verursacht wird, wurde zusätzlich ein CFSC gekoppeltes Kontrollpeptid analysiert. Das Kontrollpeptid war diffus über die gesamte Zelle verteilt und zeigte nur eine sehr schwache, kaum erkennbare Färbung (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Lokalisation von RDP58 nicht durch den gekoppelten Fluoreszenzmarker verursacht wird.

5.6.8.2 Kolokalisation von RDP58 mit dem Endoplasmatischen Retikulum

Aufgrund der Vermutung, dass RDP58 einen Einfluss auf die Translation [89] oder eventuell auf die post-translationale Modifikation bestimmter Proteine haben könnte, wurde zunächst eine Kolokalisation mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) überprüft. Hierzu wurde ein Calnexin-spezifisch detektierender Antikörper verwendet. Calnexin ist ein transmembranes Chaperon, das in der Membran des ER lokalisiert. Dort immobilisiert es partiell gefaltete Immunglobuline (z.B. MHC I) bis zu ihrer vollständigen Prozessierung [154].

Nachdem 2×10^5 HeLaCD4-CAT Zellen, wie oben beschrieben, ausgesät worden waren, wurden diese am darauf folgenden Tag für weitere 24 Stunden in 2 $\mu\text{g/ml}$ RDP58-CSFC oder DMSO kultiviert. Die Fixierung und Markierung mit einem Calnexin-spezifischen (Kap. 2.9.1) primären Antikörper (1. Ak) und einem an Cy3-gekoppelten (Kap. 2.9.2) sekundären Antikörper (2. Ak) erfolgte, wie unter Kap. 3.12.1 beschrieben. Zusätzlich wurde die im Zellkern enthaltene DNA mittels DRAQ5 nachgewiesen. Die Zellen wurden wiederum im konfokalen Laser Scanning-Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Abb. 5.27 zeigt eindeutig, dass das RDP58-Peptid nicht mit dem ER kolokalisierte (Bildfeld C). Während das Peptid außerhalb der Zelle und in Kernnähe zu sehen ist, verteilte sich Calnexin ringförmig um den Zellkern oder punktförmig über den ganzen zytoplasmatischen Bereich. Das Bild der Kofärbung (Bildfeld C) hebt teilweise vesikuläre Strukturen hervor, in denen das Peptid akkumuliert war (Pfeil).

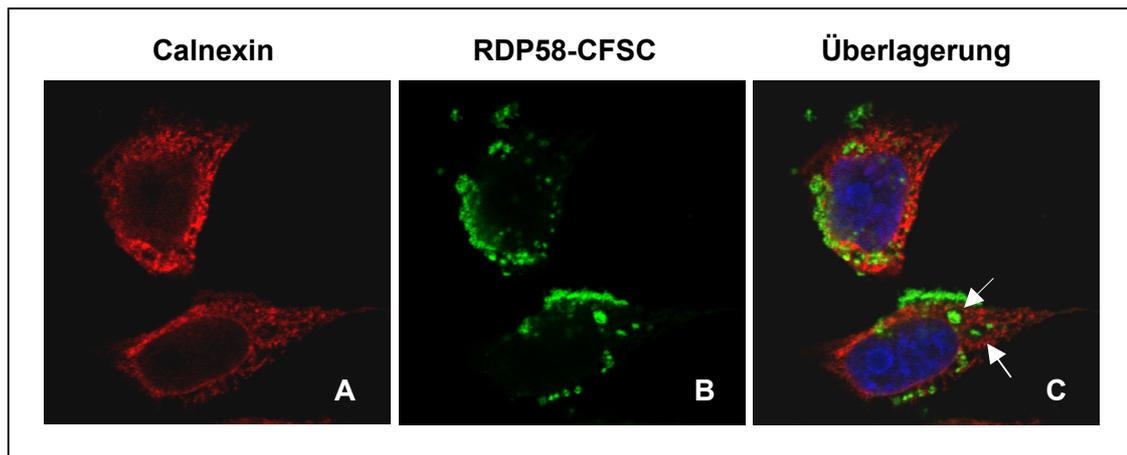


Abb. 5.27: Kolokalisation von RDP58-CFSC mit dem Endoplasmatischen Retikulum. HeLaCD4-CAT Zellen wurden für 24 Stunden in Anwesenheit von 2 µg/ml RDP58-CFSC (Bildfeld B) kultiviert. Nach Fixierung der Deckgläser wurden die Zellen mit einem gegen Calnexin (Bildfeld A) gerichteten primären Antikörper und einem Cy3-gekoppeltem sekundären Antikörper (rot) gefärbt. Die Kerne sind durch DRAQ5-Färbung (blau, Bildfeld C) sichtbar gemacht.

5.6.8.3 Kolokalisation von RDP58 mit Lysosomen und Endosomen

Durch die Endocytose bilden sich so genannte Endosomen, wobei man zwischen frühen und späten Endosomen und den sich danach bildenden Lysosomen unterscheidet. Die späten Endosomen und Lysosomen besitzen hydrolytische Enzyme (z.B. die Aspartat-Protease Cathepsin D) in pH-saurem Milieu. Zum Schutz der Innenseite der lysosomalen Vesikelmembran enthält diese bestimmte Glykoproteine wie beispielsweise LAMP-1 (*lysosome associated membrane protein*).

Da RDP58-CFSC anscheinend in Vesikeln nahe dem Zellkern lokalisiert, sollte nun untersucht werden, ob es sich hierbei um Endosomen bzw. Lysosomen handelt. Die Kultivierung, Fixierung und Färbung mit einem spezifisch gegen Cathepsin D oder LAMP-1 gerichteten primären Antikörper (Kap. 2.9.1) und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte, wie zuvor beschrieben.

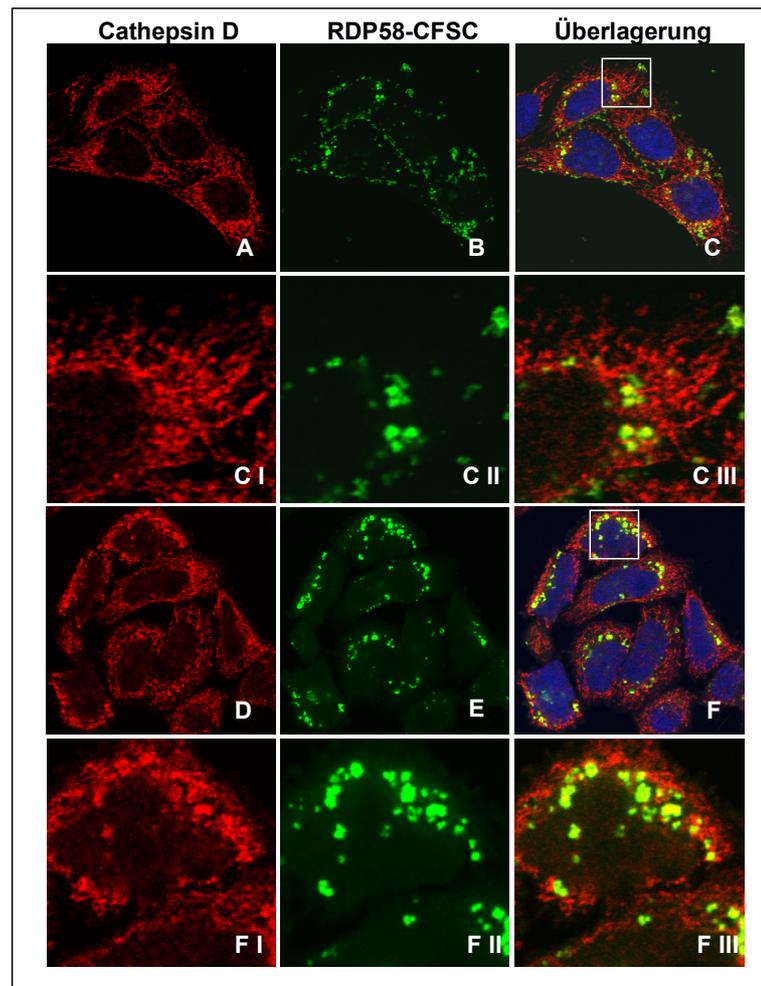


Abb. 5.28: Kolokalisation von RDP58-CFSC mit Cathepsin D. HeLaCD4-CAT Zellen wurden für 24 Stunden in Anwesenheit von 2 µg/ml RDP58-CSFC kultiviert. Nach der Fixierung der Deckgläser wurden die Zellen mit einem gegen Cathepsin D gerichteten primären Antikörper und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper (rot) markiert. Zusätzlich wurde der Kern durch DRAQ5-Färbung (blau) sichtbar gemacht. Die Bildfelder C I-C III bzw. F I-F III stellen den markierten Teilausschnitt (weißes Rechteck) aus Bildfeld C bzw. F vergrößert dar.

In Abb. 5.28 ist eine Kofärbung von RDP58-CFSC und Cathepsin D dargestellt. In der Vergrößerung einzelner Ausschnitte (weißes Rechteck) ist klar zu erkennen, dass RDP58-CFSC nahezu komplett mit Cathepsin D kolokalisierte. Die Asparat-Protease war neben dieser Kolokalisation aber auch im gesamten zytoplasmatischen Bereich verteilt. RDP58-CFSC hingegen zeigte das typische zellkernnahe Verteilungsmuster. Hieraus könnte abgeleitet werden, dass das RDP58 in endosomalen-lysosomalen Vesikeln lokalisiert.

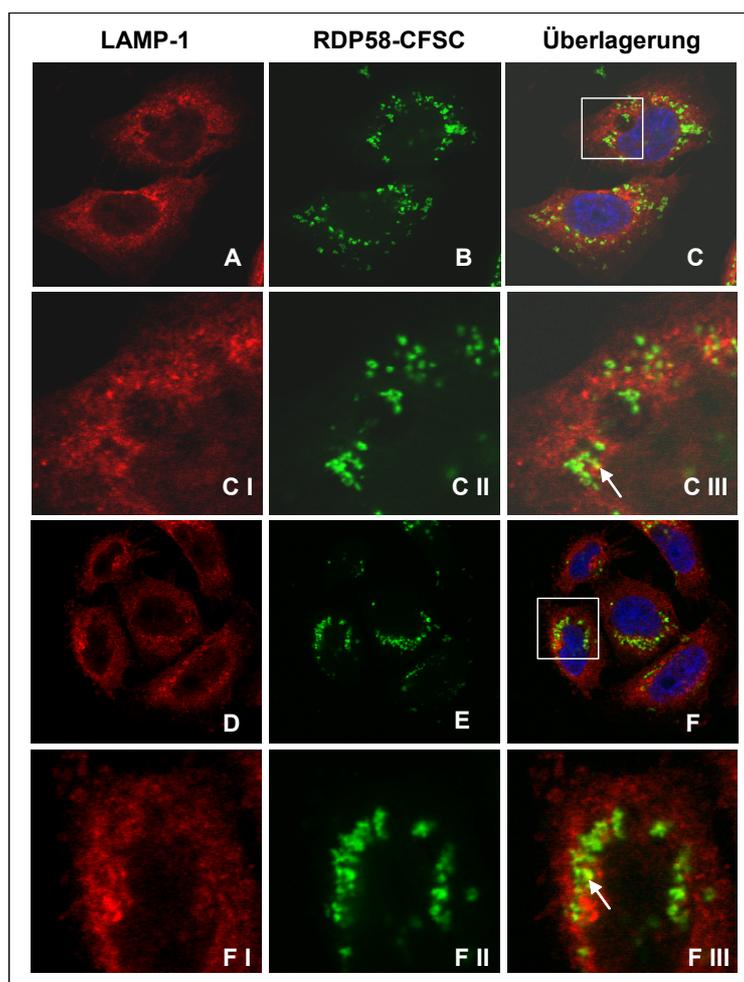


Abb. 5.29: Kolokalisation von RDP58-CFSC mit LAMP-1. HeLaCD4-CAT Zellen wurden für 24 Stunden in 2 µg/ml RDP58-CSFC kultiviert. Nach Fixierung der Deckgläser wurden die Zellen mit einem gegen LAMP-1 gerichteten primärer Antikörper und einem Cy3-gekoppelten sekundärer Antikörper (rot) gefärbt. Zusätzlich wurde der Kern durch DRAQ5-Färbung (blau) sichtbar gemacht. Die Bildfelder C I-C III bzw. F I-F III stellen den markierten Teilausschnitt (weißes Rechteck) aus Bildfelder C bzw. F vergrößert dar.

Abb. 5.29 zeigt die Kofärbung von LAMP-1 (rot) mit dem CFSC-gekoppelten Peptid (grün). Bei einer Überlagerung der Bilderfelder ist keine eindeutige Kolokalisation wie innerhalb der Cathepsin D-Färbung zu beobachten, dennoch findet man einige partiell überlappende Bereiche (Pfeile). Neben dieser partiellen Kolokalisation war LAMP-1 jedoch über den gesamten zytoplasmatischen Bereich verteilt, wohingegen das Peptid punktförmig in Zellkernnähe zu erkennen war. Hieraus wird offensichtlich, dass das RDP58-Peptid nicht in allen endosomalen-lysosomalen Vesikeln der Zelle lokalisiert.

5.6.8.4 Lokalisation von HIV-1 in einer mit RDP58-behandelten Zellen

Um mögliche Einflüsse von RDP58 auf die Verteilung viraler Kapsidproteine in der Zelle zu untersuchen, wurden auf einer Kulturplatte $1,0 \times 10^5$ HeLaCD4-CAT Zellen pro Deckgläschen enthaltender Vertiefung (\varnothing 3,5 cm) ausgesät und mit 2,8 ng HIV-1 NL4-3

infiziert (Kap. 3.6.2). Nach der Infektion erfolgte die Kultivierung in Gegenwart von DMSO oder einem Gemisch aus 18 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 und 2 $\mu\text{g/ml}$ RDP58-CSFC. Durch das RDP58-Gemisch wird eine Inhibition der Virusreplikation gewährleistet. Drei Tage nach der Infektion wurden die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert, mit einem gegen das p24-Kapsidprotein gerichteten Erstantikörper (Kap. 2.9.1) und einem an TexasRed gekoppelten Zweitantikörper (Kap. 2.9.2) gefärbt und konfokal analysiert.

Die Abb. 5.30 zeigt, dass RDP58 die Lokalisierung von HIV-1, präziser der p24^{Gag}/p55^{Gag} Proteine, nicht beeinflusste. Die Viruspartikel waren hier, wie auch in der DMSO-Kontrolle, im gesamten zytoplasmatischen Bereich der Syncytien verteilt. Dies bestätigt die Western Blot Analysen, in denen die Translation der viralen mRNA nicht durch RDP58 gehemmt war.

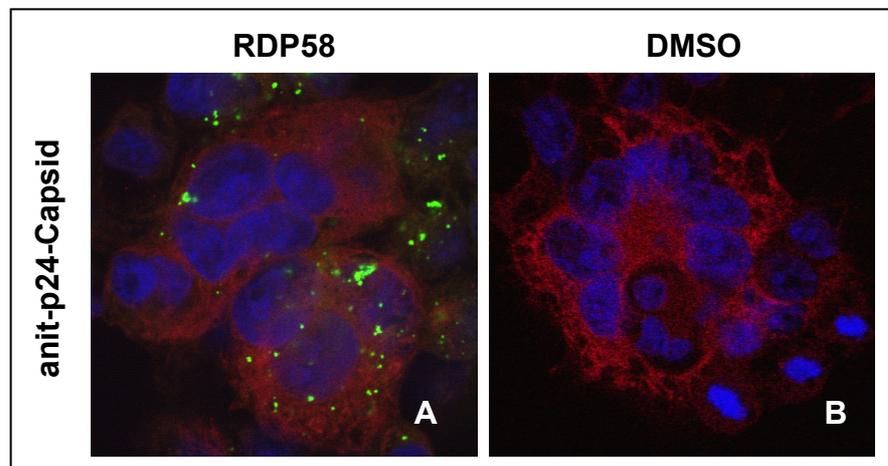


Abb. 5.30 Lokalisation des p24-Kapsidproteins (HIV-1). HeLaCD4-CAT Zellen wurden mit HIV-1 NL4-3 infiziert und anschließend für drei Tage in Medium mit einem Gemisch aus 18 $\mu\text{g/ml}$ RDP58 und 2 $\mu\text{g/ml}$ RDP58-CFSC (Bildfeld A) oder mit DMSO (Bildfeld B) kultiviert. Nach Fixierung der Deckgläser wurden die Zellen mit einem gegen das p24-Kapsidprotein gerichteten primären Antikörper und einem TexasRed gekoppelten sekundären Antikörper (rot) gefärbt. Zusätzlich wurde der Kern durch DRAQ5-Färbung (blau) visualisiert.

Diskussion

Im Jahr 1996 wurde zur Behandlung HIV-1-infizierter Patienten eine neue, viel versprechende Kombinationstherapie (*highly active antiretroviral therapy*; HAART) eingeführt. Durch diese Therapie konnte in vielen HIV-Patienten innerhalb von acht Wochen der Virustiter im Blutplasma auf eine mit den derzeitigen diagnostischen Verfahren undetektierbare Menge reduziert werden [190], was besonders in den Industrieländern zu einer verbesserten Morbidität und sinkender Mortalität der Erkrankten führte [146]. Diese Kombinationstherapie besteht aus verschiedenen Inhibitoren, die gegen die virale Protease, Reverse Transkriptase und das gp41-Protein gerichtet sind [20,45]. Ein großer Nachteil einer Langzeit-Therapie ist allerdings das zunehmende Auftreten gravierender Nebenwirkungen, wie beispielsweise mitochondriale Toxizität, Lipodystrophie, Diabetes Mellitus und Osteoporose [20,45,81,209]. Da Retroviren außerdem eine relativ hohe Mutationsrate aufweisen (fehlende *proof-reading* Aktivität der viralen Reversen Transkriptase), und alle derzeit eingesetzten Medikamente virale Funktionen hemmen, treten insbesondere in den letzten Jahren gehäuft multiresistente Viren auf, die mit den derzeit verfügbaren Medikamenten nicht behandelbar sind [116].

Es ist deshalb von großer medizinischer Dringlichkeit, neue antiretrovirale Inhibitoren zu entwickeln, die weniger Nebenwirkungen als die derzeitigen Wirkstoffe aufweisen und gegen die das Virus selbst bei einer längeren Exposition keine Resistenzen ausbildet. In der vorliegenden Arbeit wurden die zwei experimentellen Wirkstoffe SAM486A und RDP58 bezüglich ihrer Fähigkeit, die Replikation von HIV-1 zu inhibieren, detailliert charakterisiert.

6 Diskussion der SAM486A-Ergebnisse

6.1 Antivirale Wirkung von SAM486A

Little *et al.* berichteten 2002, dass die Anzahl von Neuinfektionen mit Therapie-resistenten HI-Viren in Nordamerika in den letzten Jahren rapide anstieg [116]. Die Entstehung resistenter Viren ist häufig Ursache einer inkonsequenten Medikamenteneinnahme durch die Patienten. Einerseits erfordert eine effektive Minderung der Viruslast eine äußerst präzise und individuell zu bestimmende Einstellung des Wirkstofflevels [190,195], andererseits kommt es bei der Kombinationstherapie häufig zu starken Nebenwirkungen oder zu Interaktionen mit anderen Medikamenten, die eine strenge Befolgung des Therapie-Schemas durch die

Patienten erschweren [195,214]. Die Gefahr einer Entstehung viraler Resistenzen kann jedoch langfristig nur eingedämmt werden, wenn die Viruslast durch die antiviralen Medikamente deutlich, im Regelfall auf weniger als 50 Kopien/ml Plasma, gesenkt werden [130].

In der vorliegenden Arbeit zeigte SAM486A einen deutlich ausgeprägten antiviralen Effekt, und zwar nicht nur bei langsam replizierenden M-tropen Viren (HIV-1 BaL, Abb. 4.5) und schnell replizierenden T-tropen Isolaten (HIV-1 NL4-3, Abb. 4.7), sondern insbesondere auch gegen ein multiresistentes Virus (FE9, Abb. 4.11). Das FE9 Virus ist durch eine Vielzahl an Resistenzen gegenüber der gesamten Produktpalette an Reversen Transkriptase- und Proteaseinhibitoren charakterisiert [78]. Interessanterweise war SAM486A in einer relativ niedrigen Konzentration (0,4 μM) über den gesamten Versuchszeitraum von 18 Tagen hinweg in der Lage, die FE9-Replikation in Zellkultur effizient zu inhibieren (Abb. 4.11). Gleichzeitig konnte ausgeschlossen werden, dass die Inhibition der Virusreplikation auf einer Blockade der Neuinfektion (Abb. 4.8) oder der Integration der proviralen DNA ins Wirtsgenom (Abb. 4.9) beruhte.

Gerade dieses Ergebnis ist in Hinsicht auf eine neue Therapieoption von großer Bedeutung. Bei Versagen anderer Medikamente aufgrund von Resistenzbildung könnte SAM486A als Wirkstoff mit neuartiger Funktionsweise zur Eindämmung der Viruslast im Rahmen von so genannten *Salvage*-Therapien verwendet werden.

Natürlich sind dazu weitere präklinische als auch klinische Analysen von SAM486A notwendig. Hier wäre beispielsweise wichtig zu untersuchen, ob die Substanz auch im Patienten die HIV-1-infizierten Zielzellen erreicht, bzw. ob ausreichende und andauernde Wirkstoffspiegel erzielt werden können. Dass SAM486A diese Anforderung erfüllen könnte, wird durch eine klinische Phase II Studie nahe gelegt. In dieser erfolgreichen Studie wurden potenzielle antiproliferative Effekte von SAM486A zur Behandlung des B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms untersucht [163]. Das Non-Hodgkin-Lymphom kann aus B-Zellen und aus T-Zellen entstehen. Letztere sind auch wichtige Zielzellen von HIV-1, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Substanz ebenfalls HIV-infizierte Körperzellen erreicht. Ferner zeigte diese klinische Studie, dass nicht mit einer ausgeprägten zellulären Toxizität von SAM486A in Patienten zu rechnen ist. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die Probanden in dieser Studie mit einer Konzentration von 100 mg/m² SAM486A behandelt wurden [163]. Dies entspricht im Patienten einer ungefähren Wirkstoffkonzentration von etwa 100 μM . Die in der vorliegenden Arbeit erzielten antiviralen Effekte von SAM486A wurden dagegen im submikromolaren Bereich bei einer Konzentration von 400 nM erreicht.

6.2 Wirkmechanismus von SAM486A

Der in dieser Arbeit verwendete Wirkstoff SAM486A ist ein hochpotenter niedermolekularer Inhibitor des Enzyms S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAMDC) (IC_{50} : 5 nM) [172]. SAMDC ist neben der Ornithindecaboxylase eines der limitierenden Enzyme des Polyaminstoffwechsels [128,158], so dass durch Inhibition dieser Enzyme effektiv in den zellulären Polyaminstoffwechsel eingegriffen werden kann. Dadurch ergeben sich vielfältige therapeutische Optionen, besonders zur Unterdrückung des Krebszellwachstums [158,203] und zur Hemmung der HIV-Replikation [22].

Während Chiang *et al.* [22] eine HIV-Inhibition nur grundsätzlich anhand einer Minderung des p24-Gehalts im Kulturüberstand feststellten, konnte der Mechanismus der HIV-1-Replikationsblockade in dieser Arbeit genau bestimmt werden. Insbesondere wurde hier gefunden, dass durch die Inhibition der S-Adenosylmethionin-Decarboxylase indirekt, über die Hemmung des Polyamins Spermidin, die Hypusin-Modifizierung und dadurch die Aktivierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A (eIF-5A) gehemmt wird. Das aktivierte (Hypusin-modifizierte) eIF-5A-Protein wiederum ist für den Kernexport der ungespleißten und einfach gespleißten HIV-1-mRNAs notwendig. Diese Transkripte werden durch das retrovirale Rev-Regulatorprotein unter Beteiligung verschiedener zellulärer Kofaktoren, wie beispielsweise eIF-5A, durch den CRM1/Exportin1-Kernexportrezeptor aus dem Zellkern transportiert. Somit führt eine Verringerung des intrazellulären Spermidinspiegels zur Hemmung von eIF-5A und indirekt zur Verminderung der Rev-Aktivität. In letzter Konsequenz wird dadurch die Virusvermehrung effizient gehemmt.

eIF-5A ist das einzig bekannte zelluläre Protein, das in seiner aktiven Form die außergewöhnliche Aminosäure Hypusin enthält. Die Hypusin-Modifizierung wird mit Hilfe der Enzyme Deoxyhypusin-Synthase (DHS) und Deoxyhypusin-Hydroxylase (DHH) aus dem Polyamin Spermidin synthetisiert [151,152] (Abb. 4.1). Eine Aktivierung von eIF-5A ist somit vom intrazellulären Spermidingehalt abhängig.

Regenass *et al.* zeigten, dass der Spermidingehalt durch die Hemmung von SAMDC mittels des Inhibitors CGP 48664, einem Vorläufer von SAM486A, signifikant gesenkt werden konnte [172]. In der vorliegenden Arbeit wurde die SAMDC-Aktivität mit Hilfe von SAM486A inhibiert und so der intrazelluläre Spermidingehalt gesenkt, wodurch schließlich mittels radioaktiver Markierung tatsächlich ein stark verringerter Gehalt an Hypusin-modifiziertem eIF-5A nachweisbar war (Abb. 4.14 und 4.15). In den unbehandelten Kontrollzellen waren die drei schon in früheren Studien beschriebenen Isoformen (Abb. 4.14),

ein eIF-5A-Vorläufer, die Hypusin-modifizierte Form und eine an Aminosäure-Position 50 (Lys⁵⁰) acetylierte Form dagegen deutlich nachweisbar [103,148].

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A ist als zellulärer Kofaktor des HIV-1 Rev-Regulatorproteins [181] für den Rev-vermittelten mRNA-Kernexport der ungespleißten und einfach gespleißten retroviralen mRNAs verantwortlich und folglich für die Replikation von HIV-1 essenziell [9,84]. Dementsprechend war es in der vorliegenden Arbeit möglich zu zeigen, dass SAM486A die Virusreplikation durch eine effiziente und spezifische Hemmung der Rev-Transaktivierung mindert. Insbesondere wurde mit Hilfe einer Reporteranalyse eine hohe Spezifität für Rev nachgewiesen, indem SAM486A nur die Rev- (Abb. 4.17), jedoch nicht die Tat-Transaktivierung (Abb. 4.19) signifikant beeinträchtigte.

Das Rev-Protein bindet an das RRE (*Rev response element*) der un- und einfach gespleißten viralen Transkripte, multimerisiert [164] und vermittelt den Kernexport dieser mRNAs über den zellulären CRM1/Exportin1-Transportweg. Der Kernexportrezeptor CRM1/Exportin1 interagiert im Zellkern in Anwesenheit von Ran-GTP mit der NES-Region von Rev und vermittelt dadurch den Durchtritt des Kernexportsubstrates (Rev-enthaltender Ribonukleoprotein-Komplex) durch die Poren der Kernmembran [51,139,145]. CRM1/Exportin1 scheint neben dem Transport von NES-enthaltenden Proteinen [51,58,99], wie HIV-1 Rev, auch für den Export bestimmter zellulärer mRNAs, wie zum Beispiel die Transkripte, die für IFN- α , c-Fos, COX-2 und CD83 kodieren, zuständig zu sein [16,90,101,166]. Eine Beteiligung von eIF-5A am zellulären mRNA-Kernexport ist bis jetzt jedoch nur für die mRNA von CD83 beschrieben worden [107]. Grundsätzlich werden die meisten zellulären mRNAs nicht durch CRM1/Exportin1, sondern durch einen anderen zellulären Kernexportrezeptor, welcher TAP/NXF1 genannt wird, Ran-GTP-unabhängig aus dem Zellkern transportiert [198]. Durch CRM1/Exportin1 werden demnach nur spezielle zelluläre und retrovirale Transkripte transportiert.

Im Falle des HIV-1 Rev-vermittelten mRNA-Kernexports wird dem Hypusin-enthaltenden Rev-Kofaktor eIF-5A eine Adapterfunktion zugeschrieben. Hierbei akkumuliert eIF-5A an den mit den Kernporen assoziierten nukleoplasmatischen Fibrillen und erhöht die Affinität von CRM1/Exportin1 für den Rev-RNA Ribonukleoprotein Komplex. eIF-5A ermöglicht dadurch eine effiziente Translokation der an Rev gebundenen retroviralen Transkripte vom Zellkern in das Zytoplasma [84]. In Abwesenheit von eIF-5A dagegen scheint CRM1/Exportin1 selbst in Gegenwart von Ran-GTP nur eine sehr geringe Affinität für das virale Rev-Protein aufzuweisen [5].

Dass SAM486A wirklich den Rev-vermittelten CRM1/Exportin1-Kernexport und nicht etwa einen späteren Schritt im Replikationszyklus von HIV-1 inhibiert, konnte im Rahmen dieser Arbeit auch durch eine hochspezifische Modifikation des viralen mRNA-Transportsubstrates [199] verifiziert werden. Beispielsweise werden mRNAs des Mason-Pfizer Affenvirus (MPMV) nicht mit Hilfe von CRM1/Exportin1 sondern mit Hilfe von TAP/NXF1 aus dem Zellkern der infizierten Wirtszelle transportiert. TAP/NXF1 bindet im Rahmen dieses Transportprozesses direkt an eine spezifische Sequenz in der viralen mRNA, welches deshalb *constitutive transport element* (CTE) genannt wird [15,69].

Es wurde in der vorliegenden Arbeit die Tatsache ausgenutzt, dass die *cis*-aktiven RNA-Kernexportsignale CTE und RRE entsprechende mRNAs für einen der beiden Transportwege, TAP/NXF1 bzw. CRM1/Exportin1, deklarieren. Die dazu verwendeten subgenomischen Vektoren (GPV-RRE und GPV-4xCTE [199]) unterscheiden sich allein dadurch, dass sie CTE- bzw. RRE-Sequenzen enthalten. Mit diesem Experiment konnte eindeutig gezeigt werden, dass die viralen Proteine selbst bei Anwesenheit von SAM486A exprimiert wurden, wenn die entsprechenden Transkripte TAP/NXF1-vermittelt aus dem Zellkern exportiert wurden (Abb. 4.21 und 4.22). Dadurch konnte bestätigt werden, dass SAM486A in der Tat hochspezifisch den Rev-eIF-5A-CRM1/Exportin1-vermittelten retroviralen mRNA-Kernexport hemmt, den TAP/NXF1-vermittelten Export jedoch nicht beeinflusst.

6.3 Einfluss von SAM486A auf den Metabolismus der Zelle

Wie zuvor ausführlich beschrieben, kommt es durch die Inhibition der S-Adenosylmethionin-Decarboxylase zu einem verringerten intrazellulären Polyaminspiegel [171] und in Folge zu einem Mangel an Hypusin-modifiziertem eIF-5A. Sowohl für die Polyamine Spermidin und Spermin als auch für eIF-5A wurde früher eine wichtige Rolle beim Zellwachstum und bei der Zellteilung beschrieben [140,152,159,200]. Daher wird die Hemmung der Polyamin-Synthese auch bei experimentellen Therapien zur Inhibition des Krebszellwachstums angewendet [158,203]. In Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit stellt sich deshalb die Frage, ob die antivirale Wirkung von SAM486A eventuell auch durch einen Einfluss auf den Metabolismus der Zelle entstanden sein könnte.

Die dazu durchgeführten Versuchsreihen zeigten jedoch, dass SAM486A bis zu einer Konzentration von 0,4 μ M einen ausgeprägten antiviralen Effekt aufwies, ohne gleichzeitig die Vitalität der untersuchten Zellen zu beeinflussen. Konkret wurden keine allgemein toxischen Effekte (Abb. 4.2), keine proapoptotische Wirkung (Abb. 4.3) oder eine negative Beeinflussung des Zellzyklus (Abb. 4.4) durch SAM486A beobachtet. Demnach könnte ein

therapeutisches Fenster existieren, das bis zu einer bestimmten SAM486A-Konzentration antiretrovirale Effekte erzielen lässt, ohne dabei den zellulären Metabolismus zu beeinträchtigen. Die zuvor erwähnte klinische Studie mit SAM486A (Kap. 6.1) [132,163] unterstützt diese Vorstellung.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit durch die metabolische Markierung von eIF-5A mit Hilfe von radioaktivem Putrescin auch gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von 0,4 μM SAM486A noch eine geringe Menge an Hypusin-modifiziertem eIF-5A in den untersuchten Zellen nachweisbar war (Abb. 4.14 und 4.15). Daraus kann geschlossen werden, dass bei dieser SAM486A-Konzentration die SAMDC-Aktivität nicht absolut inhibiert ist und deshalb noch geringe Mengen an Spermidin in der Zelle gebildet werden. Dies könnte bedeuten, dass der verbleibende Anteil an Spermidin (bzw. Hypusin-modifiziertem eIF-5A) zur Aufrechterhaltung der allgemeinen zellulären Funktionen ausreicht, auf den besonderen Vorgang des retroviralen mRNA-Kernexports jedoch limitierend wirkt.

Betrachtet man dieses Ergebnis im Kontext der antiretroviralen Kombinationstherapie, so stellt die Wirksamkeit einer geringen SAM486A-Konzentration von 0,4 μM eventuell einen weiteren wichtigen Vorteil dar. In der klinischen Phase II zur Behandlung des Non-Hodgkin-Lymphoms zeigten alle Patienten nach Verabreichung von etwa 100 μM SAM486A nur leichte Nebenwirkungen wie Brechreiz, Müdigkeit und Durchfall [132,163]. Wäre diese SAM486A-Konzentration oder sogar noch eine geringere in der Lage, im Patienten die Replikation von HIV-1 effizient zu inhibieren, könnten die signifikanten toxischen Nebenwirkungen der derzeitigen antiretroviralen Kombinationstherapie eventuell stark eingegrenzt werden und dadurch das Wohlbefinden des Patienten verbessert werden.

6.4 Weitere Inhibitoren des eIF-5A Stoffwechsels mit antiviraler Wirkung

Die hier vorgestellte antiretrovirale Strategie basiert auf der Hemmung des eIF-5A-Stoffwechsels und damit auf der indirekten Inhibition des HIV-1 Rev-Proteins. Dieses neuartige experimentelle Therapie-Prinzip wird durch andere, frühere Studien bestätigt bzw. unterstützt. So berichteten Andrus *et al.* 1998, dass die Hemmung der Deoxyhypusin-Hydroxylase (DHH), ein ebenfalls bei der Hypusin-Modifizierung von eIF-5A beteiligtes (Abb. 4.1) Eisen-abhängiges Enzym, eine deutliche Reduktion der Virusreplikation und eine verringerte Polysomen-Assoziation der ungespleißten retroviralen mRNA bewirkte [3]. Der dabei verwendete Wirkstoff Mimosin ist ein genereller Metall-Ionen-Chelatbildner [104,129,136,207]. In der Zelle ist die DHH jedoch bei weitem nicht das

einziges Ionen-abhängiges Enzym, das durch Mimosin inhibiert werden kann [34,77]. Inhibitoren wie Mimosin scheinen deshalb vielfältige zelluläre Funktionen zu beeinträchtigen und wirken daher im Vergleich zu SAM486A eher unspezifisch.

Ein weiterer niedermolekularer Inhibitor, CNI-1493, ist gegen die Deoxyhypusine-Synthase (DHS) gerichtet und zeigte in einer früheren Studie deutliche antiretrovirale Effekte [78]. Mit CNI-1493, wie auch mit DHS-spezifischen siRNAs, war es ebenfalls möglich, sowohl die Vermehrung von HIV-1-Laborstämmen als auch von diversen multiresistenten Virusisolaten effizient zu hemmen. Problematisch im Rahmen der weiteren klinischen Entwicklung von CNI-1493 scheint jedoch zu sein, dass diese Substanz, im Gegensatz zu SAM486A, wasserunlöslich ist und deshalb nur durch intravenöse Injektion appliziert werden kann [192]. Eine derartige Verabreichung eines Wirkstoffes ist jedoch im Rahmen einer chronischen, potenziell lebenslangen anti-HIV-Therapie nur sehr schwierig durchzuführen.

Schließlich wurde in einer weiteren Studie ein Spermidin-Analogon, 1,8-Diaminooctan (GC8), zur DHS-Hemmung verwendet [76]. Im Kontext der Replikation des Katzen-Immundefizienzvirus (*Feline Immunodeficiency Virus*; FIV), einem Lentivirus, das ebenfalls ein Rev-Protein besitzt, zeigte dieser DHS-Hemmer eine Dosis-abhängige Reduktion der FIV-Replikation, wobei die zytoplasmatische Akkumulation der Rev-regulierten viralen Transkripte ebenfalls negativ beeinflusst war. Signifikante Hemmraten waren allerdings erst bei relativ hohen Wirkstoffkonzentrationen von 150 μM bis 200 μM zu beobachten.

Zusammenfassend zeigen diese Arbeiten, dass es in der Tat möglich ist, die Replikation von Immundefizienzviren zu hemmen, indem man pharmazeutisch mit der Hypusin-Modifizierung des essenziellen zellulären Rev-Kofaktors eIF-5A interferiert. Aufgrund seiner Effizienz, hohen Spezifität, Wasserlöslichkeit und seiner, soweit bisher beurteilbar, nur geringen Nebenwirkungen scheint der SAMDC-Inhibitor SAM486A deutliche Vorteile im Vergleich zu den anderen zuvor erwähnten niedermolekularen Inhibitoren mit vergleichbarer Wirkweise zu haben.

6.5 Induziert SAM486A die Bildung resistenter Viren?

Im Hinblick auf eine neue Therapiemöglichkeit war es wichtig zu untersuchen, ob das Virus über einen längeren Zeitraum Resistenzen bezüglich SAM486A ausbildet. Während der reversen Transkription des HI-Virus kommt es durch eine fehlende Korrekturfunktion der Reversen Transkriptase [167,176] zu einer erhöhten Mutationsrate von 1:1000-1:10000 pro Base und Replikationszyklus [126]. Multipliziert mit einem hohen viralen Umsatz (*Turnover*) von 10^{10} viralen Partikeln pro Tag führt diese Mutationsrate zu einer ausgeprägten

genetischen Variabilität der Viren im Patienten [111]. Dadurch erlangt das Virus häufig einen Schutz vor Immunreaktionen des Körpers, oder es entwickelt Resistenzen gegen Therapeutika [47,83,190]. Diese Resistenzen entstehen vielfach schon innerhalb weniger Wochen [13,135,190].

Mit Hilfe eines Langzeitexperiments wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob das Virus seine Sensitivität gegenüber SAM486A verliert bzw. Resistenzen ausbildet. Tatsächlich konnte selbst nach einer zwölfwöchigen Kultivierung in Gegenwart einer suboptimalen SAM486A-Konzentration, die es dem Virus ermöglichte zu replizieren und dadurch zu mutieren, keine Beeinträchtigung der inhibitorischen Wirkung der Substanz gefunden werden (Abb. 4.12). Das Virus war demnach nicht in der Lage, innerhalb dieser Zeitspanne Resistenzen auszubilden. Dies war aufgrund des SAM486A-Wirkmechanismus auch nicht zu erwarten, da hier ein zelluläres Enzym, die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAMDC), inhibiert wird, deren Gen aufgrund seiner zellulären Herkunft keiner erhöhten Mutationsrate ausgesetzt ist.

6.6 Ausblick

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass durch eine Hemmung der S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAMDC) die Aktivierung des zellulären Proteins eIF-5A blockiert wird, wodurch der HIV-1 Rev-vermittelte Kernexport der viralen mRNAs negativ beeinträchtigt wird (Abb. 6.1). SAM486A zeigte ausgeprägte antivirale Eigenschaften und könnte besonders aufgrund der Hemmung eines zellulären Proteins eine bedeutende Grundlage zur Entwicklung neuer Therapien darstellen, besonders zur Behandlung von Patienten, die mit resistenten Viren infiziert sind.

Da der Wirkmechanismus ausführlich untersucht wurde, sind in diesem Zusammenhang nur noch wenige ausgewählte Experimente notwendig: Im Rahmen einer subzellulären mRNA-Fraktionierung sollte mit Northern Blot Analysen, oder besser quantitativ durch Echtzeit-PCR (*Real-Time PCR*), untersucht werden, ob in der zytoplasmatischen Fraktion in Anwesenheit von SAM486A tatsächlich weniger Transkripte der durch Rev regulierten 4 Kb- und 9 Kb-Klasse vorhanden sind. Im Zusammenhang mit einer klinischen Wirkstoffentwicklung wäre es notwendig, eine größere Anzahl klinischer Virusisolate, einschließlich unterschiedlich resistenter Viren, und verschiedener Virus-Subtypen zu untersuchen. Zusätzlich wäre es auch interessant zu überprüfen, inwieweit SAM486A in der Lage ist, bei bereits langfristig etablierten Infektionen zu wirken, bzw. ob positive oder vielleicht auch negative

synergistische antivirale Effekte bei gemeinsamer Verabreichung mit den derzeit klinisch etablierten antiretroviralen Wirkstoffen zu erwarten sind.

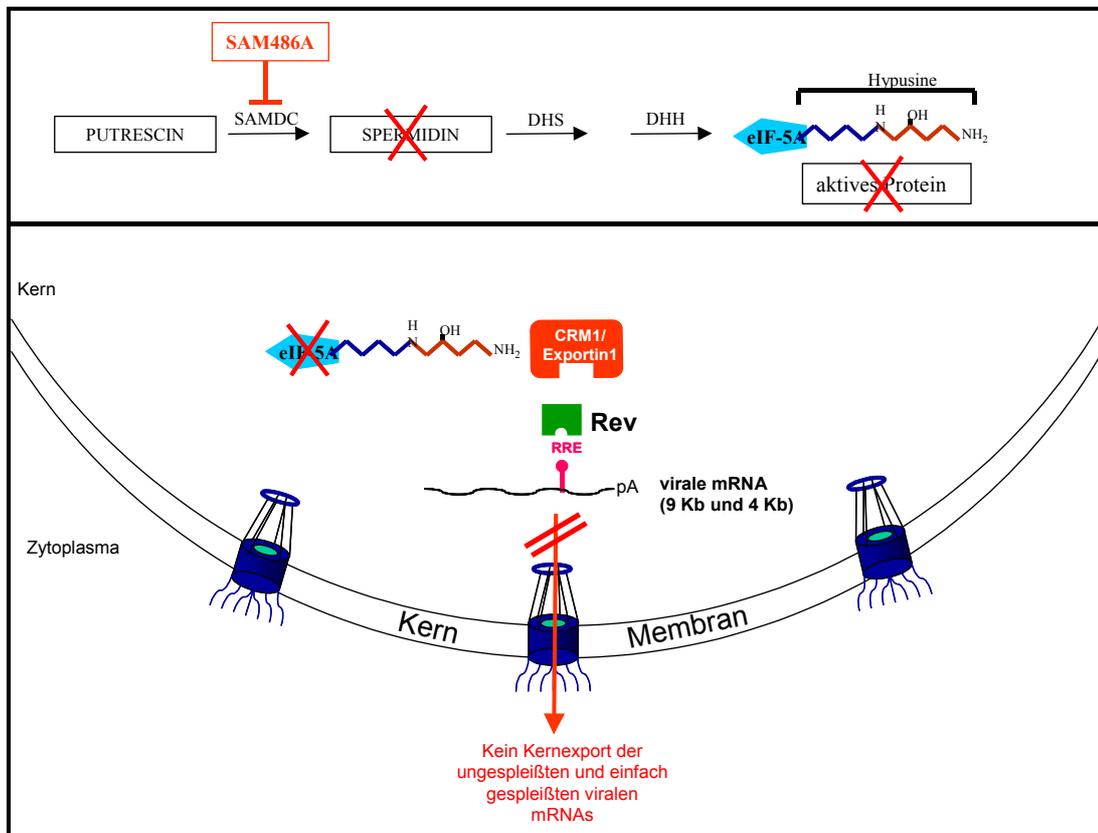


Abb. 6.1: Antivirale Wirkung durch SAM486A

7 Diskussion der RDP58-Ergebnisse

7.1 Antivirale Wirkung von RDP58

Das proteaseresistente Decapeptid RDP58 (Allotrap 1258) wurde ursprünglich mittels computergestütztem Design aus der schweren Kette des HLA I (*human leukocyte antigen*) Moleküls entwickelt. Es wurde berichtet, dass Peptide welche sich von dem HLA I Molekül ableiten, eine ausgeprägte antiinflammatorische Wirkung zeigen [89].

RDP58 reduziert sowohl in Zelllinien als auch in Tiermodellen die Produktion wichtiger entzündungsfördernder Zytokine wie TNF- α (Tumornekrosefaktor), INF- γ (Interferon), IL-2 (Interleukin), IL-12 und NGF (*nerve growth factor*) [65,206]. Das Peptid zeigte im Mausmodell eine gute antiinflammatorische Wirkung bei einer LPS-induzierten Blasenentzündung und einer Dickdarmentzündung. Im Menschen konnten die klinischen Symptome einer eitrigen Dickdarmentzündung (*Colitis ulcerosa*) und der Morbus Crohn-Krankheit stark reduziert werden [14,138,206].

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine sehr effiziente und spezifische antivirale Wirkung des Peptids nachgewiesen werden. Dass es sich hierbei um eine spezifische Inhibition handelte, konnte mit Hilfe des von Iyer *et al.* beschriebenen Kontrollpeptids DR2P gezeigt werden [89], das in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Replikation von HIV-1 zeigte (Abb. 5.7). RDP58 war in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ (entspricht 16,3 μM) in der Lage, die Replikation von M-tropen (HIV-1 BaL, Abb. 5.5 und 5.6), T-tropen (HIV-1 NL4-3, Abb. 5.8) und von multiresistenten (FE9, Abb. 5.9) Viren drastisch zu hemmen. Die antivirale Wirkung konnte in PM1 (Abb. 5.5-5.9) und in HeLaCD4-CAT Zellen (Abb. 5.10) nachgewiesen werden. Ferner konnte in einem Langzeitexperiment klar belegt werden, dass sich in einem Zeitraum von 12 Wochen ebenfalls keine RDP58-resistente Viren ausbilden (Abb. 5.13). Es konnte nachgewiesen werden, dass die antivirale Wirkung von RDP58 nicht durch einen gestörten Metabolismus der Zelle hervorgerufen wird, da 20 $\mu\text{g/ml}$ RDP58-Peptid weder toxisch (Abb. 5.2) noch Apoptose-induzierend (Abb. 5.4) waren, oder gar eine negative Auswirkungen auf den Zellzyklus (Abb. 5.3) zeigten.

Somit bietet der Wirkstoff RDP58 ähnlich wie SAM486A eine viel versprechende Basis für neuartige HIV-1-Therapien, insbesondere mit dem Potenzial, multiresistente Viren zu inhibieren.

Auch für RDP58 existieren bereits Studien der klinischen Phase II. Beispielsweise wurde Patienten mit einer entzündlichen Darmerkrankung (*Colitis Ulcerosa*) über 28 Tage hinweg täglich eine orale Dosis von 300 mg RDP58 verabreicht. Hierbei entstanden nur milde Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen oder Übelkeit [86,206]. Jedoch ist diese Verabreichungsform in Bezug auf HIV-1 von geringer Bedeutung, denn RDP58 ist oral nicht bioverfügbar, da es vom Darm nicht in den Blutkreislauf gelangt. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind intravenöse Applikationen (0,25 mg/kg) nur bis zum Affenmodell erprobt (entzündliche Darmerkrankung) [86].

Eine effiziente Hemmung der HIV-1-Replikation durch RDP58 konnte auch für eine bereits etablierte HIV-Infektion nachgewiesen werden (Abb. 5.11). Insbesondere war RDP58 selbst am sechsten Tag einer bereits experimentell etablierten Infektion (Abb. 5.11 B) in der Lage, die Virusvermehrung deutlich zu hemmen, wobei eine frühere RDP58 Verabreichung (nach drei Tagen, Abb. 5.11 A) allerdings zu einer verbesserten Virusinhibitionsrate führte. Für eine mögliche Therapie könnte dies bedeuten, dass RDP58 durchaus existierende Infektionen kontrollieren kann.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die inhibitorische Wirkung von RDP58 nach Entfernen aus der Kultur noch für etwa drei Tage anhält, das Virus anschließend jedoch wieder repliziert (Abb. 5.12). Wie sich dieses und die oben aufgeführten Ergebnisse in Hinblick auf eine neue HIV-1-Therapie verhalten, müsste nun in weiterführenden präklinischen und klinischen Studien untersucht werden.

7.2 Einfluss von RDP58 auf die frühen Schritte des HIV-1 Lebenszyklus

Durch eine differenzierte Betrachtung des Lebenszyklus von HIV-1 konnte eine Beeinflussung der frühen Schritte durch RDP58 ausgeschlossen werden. Mit Hilfe von FACS-Analysen wurde gezeigt, dass RDP58 weder die Expression noch die Präsentation der HIV-Rezeptoren CXCR4 und CD4 beeinträchtigt. Des Weiteren zeigten Analysen der Fusion der Zielzellmembran mit der Virushülle von T-tropen und von M-tropen Viren, dass das Peptid die Interaktion des Env-Proteins mit den Zielzellrezeptoren nicht beeinträchtigt (Abb. 5.17 und 5.18). Außerdem konnte mit Hilfe der Detektion von extrachromosomaler zirkulärer viraler DNA (Abb. 5.14), die unmittelbar nach einer Neuinfektion gebildet wird, nachgewiesen werden, dass es in Anwesenheit des Peptids zu einer Freisetzung und Auflösung des Kapsids mit anschließender reverser Transkription des viralen RNA- in ein DNA-Genom kommt, diese Abschnitte im HIV-Replikationszyklus also durch RDP58 nicht beeinträchtigt werden. Dass das Peptid ferner nicht die Integration der viralen DNA in das

Wirtszellgenom beeinflusst (Abb. 5.15), wurde durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit für den HIV-1-LTR (*long terminal repeat*) und die zellulären Alu-Sequenzen spezifischen Primern verifiziert. RDP58 beeinflusst demnach eindeutig nicht die Fusion, reverse Transkription oder Integration von HIV-1, folglich muss RDP58 einen späteren Schritt im viralen Lebenszyklus hemmen.

Somit ist der Wirkmechanismus von RDP58 konzeptionell verschieden vom Wirkmechanismus handelsüblicher Fusionsinhibitoren, wie beispielsweise dem Peptid T20 (Enfuvirtid) [109], und Reverser Transkriptase-Inhibitoren, wie beispielsweise Nukleosidanaloga (z.B. Zidovudin) [20].

7.3 Einfluss von RDP58 auf den Rev-vermittelten Kernexport

Die Idee, RDP58 auf seine antivirale Wirkung zu testen, wurde aufgrund der Veröffentlichungen von Cohen *et al.* [29] und Iyer *et al.* [89] entwickelt. In der Studie von Cohen *et al.* wurde gezeigt, dass der indirekte Rev-Inhibitor CNI-1493 die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α hemmt, obwohl die Gesamtmenge an zellulärer TNF- α mRNA nicht beeinflusst war. Ein ähnliches Phänomen beschrieben Iyer *et al.* für RDP58. Es wäre deshalb durchaus möglich gewesen, dass RDP58 ebenfalls, ähnlich wie CNI-1493, die HIV-1 Rev-Aktivität hemmen könnte. Diese Hypothese wurde des Weiteren durch Lazarov *et al.* bestärkt, welche nach subzellulärer Fraktionierung der TNF- α mRNA und anschließender Echtzeit-PCR in den RDP58-behandelten Zellen keinen Einfluss auf die Gesamtmenge der zellulären TNF- α mRNA fanden, im Zytoplasma jedoch signifikant weniger TNF- α mRNA zu messen war. Die Autoren schlossen daraus, dass RDP58 den Kernexport und/oder die Stabilität dieser mRNA beeinflussen könnte [113].

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch mit Hilfe einer Rev-Reportergenanalyse eindeutig nachgewiesen werden, dass die antivirale Wirkung von RDP58 nicht auf einer Inhibition des Rev-vermittelten Kernexports beruht (Abb. 5.20). Des Weiteren zeigte subzelluläre Fraktionierung von infizierten und RDP58-behandelten bzw. unbehandelten Zellen mit anschließender Northern Blot Analyse, dass innerhalb der zytoplasmatischen RNA-Fractionen etwa gleiche Mengen der einfach gespleißten retroviralen mRNAs vorlagen. Dies ließ den Schluss zu, dass der Rev-vermittelte Kernexport dieser mRNAs nicht beeinflusst ist (Abb. 5.21). Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Northern Blot-Untersuchung gezeigt werden, dass zwischen Peptid-behandelten und Kontrollzellen kein Unterschied in der Transkriptionsrate der viralen mRNAs vorlag (Abb. 5.21). Dieser Befund wurde durch

unabhängige Experimente bestätigt, die direkt die Wirkung des retroviralen Tat-Transaktivators auf die HIV-1 LTR-vermittelte Transkription untersuchten (Abb. 5.19). Auch hier konnten keine RDP58-spezifischen Effekte nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass RDP58 in Bezug auf die HIV-Inhibition einen Rev- und Tat-unabhängigen Wirkmechanismus besitzt.

7.4 Translation der viralen mRNAs

Wie zuvor bereits kurz diskutiert und in früheren Studien beschrieben, könnte RDP58 die Translation der TNF- α und der IFN- γ mRNA inhibieren [89,113]. Ein ähnlicher RDP58-Wirkmechanismus in Bezug auf die Hemmung der HIV-1-Vermehrung konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Zwar konnte im Rahmen einer Western Blot Analyse von RDP58-behandelten infizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle ab dem dritten Tag nach der Infektion stets ein geringerer Gehalt an Gag-Protein nachgewiesen werden (Abb. 5.23), dieser Effekt beruhte jedoch auf einer „Ausverdünnung“ der infizierten Zellen in der RDP58-behandelten Kultur. Das bedeutet, dass RDP58 den Replikationszyklus wahrscheinlich erst nach der Translation blockiert. Durch diese Inhibition werden weniger Viren aus den zu Anfang infizierten Zellen freigesetzt und in Folge auch weniger Zellen der Kultur neu infiziert. Dauert dieser Prozess mehrere Tage an, so werden im Vergleich zur ungehemmten Kontrollkultur weniger infektiöse Viruspartikel gebildet, weniger Zellen neu infiziert und folglich liegen in der behandelten Kultur auch geringere Mengen an viralen Proteinen vor.

Dass die Minderung des Gag-Proteinlevels tatsächlich allein durch diesen Vorgang zustande kam und nicht auf einem Block der Translation der viralen mRNAs beruhte, konnte in zwei unabhängigen Versuchen gezeigt werden. In diesen Experimenten wurde gewährleistet, dass in RDP58-behandelten und unbehandelten Proben gleiche Mengen an infizierten und uninfizierten Zellen vorlagen und keine Neuinfektion (*single round of replication*) möglich war (Kap. 5.6.8.3). Hierzu wurden einerseits HeLa Zellen, die keine HIV-1-spezifischen Rezeptoren besitzen, mit VSV-G-pseudotypisierten Viren, infiziert und andererseits HeLaCD4-CAT Zellen mit einem Plasmid, das für ein *env*-deletiertes HI-Virus kodiert transfiziert. In beiden Fällen erfolgte eine Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom. Weitere Infektionen durch von diesen Zellen freigesetzte virale Partikel konnten jedoch ausgeschlossen werden. In diesen Experimenten wurde gefunden, dass die intrazelluläre Expression der Gag-Proteine in Anwesenheit von RDP58 nicht beeinflusst wird, im Kulturüberstand aber signifikant weniger p24^{Gag}-Protein vorliegt (Abb. 5.24 und 5.25). Dieser

Sachverhalt bestätigt die Vermutung, dass RDP58 die Virusreplikation erst nach der Translation hemmt.

Zusätzlich konnte in diesen Versuchen eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden: In den RDP58-behandelten Zellen lag eine größere Menge an p24^{Gag}-Protein vor als in den Kontrollzellen (Abb. 5.24 und 5.25). Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine erhöhte Aktivierung der viralen Protease sein, wodurch der p55^{Gag}-Vorläufer verstärkt zu p24^{Gag} prozessiert würde.

Die HIV-Protease (PR) gehört zu den Aspartat-Proteasen [98,155,156] und bildet ein Homodimer [112,217]. Sie spaltet schrittweise das p55^{Gag}-Vorläuferprotein in das Matrix- (MA), Kapsid- (CA), Nukleokapsid- (NC) und das p6-Link-Protein [162,215].

Vielfach wurde beschrieben, dass es durch eine fehlerhafte oder inkomplette Spaltung des p55^{Gag}-Vorläuferproteins zur Freisetzung von nicht-infektiösen oder weniger infektiösen Viren aufgrund von Problemen mit der Kapsidstabilität kommt [52,96,147,215].

Nach dem Gag-Spaltungsmuster in Gegenwart von RDP58 zu urteilen (Abb. 5.24 und 5.25), dürfte es sich in dieser Arbeit jedoch um eine vollständige Prozessierung handeln, da sich das Muster nicht von den Kontrollzellen unterscheidet. Einschränkend muss hier jedoch bemerkt werden, dass aufgrund des eingesetzten Antikörpers nur die Spaltzwischenprodukte erkannt wurden, in denen auch das Kapsidprotein vorhanden ist. Zusätzlich wird in den oben genannten Studien beschrieben, dass auch bei unvollständiger Prozessierung der Viren kaum ein Einfluss auf deren Freisetzung zu sehen war, unter RDP58 hingegen wurden im Vergleich zur Kontrolle signifikant weniger Partikel freigesetzt.

Es wäre jedoch vorstellbar, dass es in Anwesenheit von RDP58 durch eine zu frühe Proteaseaktivität zu einer frühzeitigen Spaltung der Gag-Proteine kommt und dies mit der Virusfreisetzung interferiert.

Diese Interpretation wird durch eine frühere Beobachtung von Kräusslich bestärkt. Ihm gelang es, die Aktivität der viralen Protease zu steigern. Dies resultierte schließlich in einer verfrühten Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins, wodurch der Zusammenbau und die Freisetzung der Viruspartikel verhindert wurden [106].

Inwiefern RDP58 die Prozessierung der Gag-Proteine beeinflusst und ob die wenigen neu gebildeten viralen Partikel, die aus der Zelle austreten, infektiös sind, sollte in weiterführenden Studien detailliert untersucht werden.

7.5 Lokalisation von RDP58 und Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus

Durch Fluoreszenzmarkierung des Peptids konnte eine punktuelle Verteilung von RDP58 in der Nähe des Zellkerns beobachtet werden (Abb. 5.26). Genauer wurde gefunden, dass RDP58 fast vollständig mit der endosomalen Protease Cathepsin D kolokalisiert, woraus vermutet werden kann, dass das Peptid ausschließlich in Endosomen vorliegt (Abb. 5.28). Diese Annahme wird durch ein weiteres Experiment gestützt, in dem eine Lokalisation von RDP58 mit dem Endoplasmatischen Retikulum mit Hilfe eines für dieses Kompartiment spezifischen Markers ausgeschlossen wurde (Abb. 5.27).

Eine alleinige Lokalisation von RDP58 in Endosomen würde bedeuten, dass das Peptid über den endozytotischen Weg in die Zelle aufgenommen wird. Von HIV-1 ist hingegen bekannt, dass eine erfolgreiche Infektion eine Aufnahme des Viruskapsids in die Wirtszelle durch Membranfusion vermittelt, und nicht endozytotisch stattfindet. Auch im weiteren Verlauf stellen die Endosomen keinen bisher bekannten Ort des retroviralen Lebenszyklus dar, sodass gezeigt wurde, dass das Peptid mit keinen für die Replikation von HIV-1 essenziellen Kompartimenten kolokalisiert. Dies könnte bedeuten, dass RDP58 nur indirekt, eventuell über ein zelluläres Protein, auf den Lebenszyklus von HIV-1 einwirkt. Insbesondere schließt die hier gefundene Lokalisation die in Kap. 7.4 gemachte Vermutung nicht aus, RDP58 wirke hemmend auf die Zusammensetzung der Viruspartikel.

7.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass RDP58 die Replikation von HIV-1 inhibiert, ohne jedoch die rezeptorvermittelte Neuinfektion, Integration, Tat-vermittelte Transkription, den Rev-vermittelten Kernexport oder die Translation der Gag-spezifischen Proteine zu beeinflussen. RDP58 zeigte, ähnlich wie SAM486A, eine hervorragende antivirale Wirkung und stellt somit eine neue Option der antiviralen Therapie dar.

Zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus von RDP58 sind jedoch weiterführende Experimente notwendig. Insbesondere gilt es, die Reifung und Freisetzung der Viruspartikel genauer zu untersuchen. Eine interessante Fragestellung ist, ob RDP58 tatsächlich, wie vermutet, die Proteaseaktivität erhöht. Hierzu könnte man die Prozessierung des p55^{Gag}-Vorläuferproteins in Anwesenheit von RDP58 *in vitro* und *in vivo* untersuchen.

Außerdem wäre es möglich, die in Anwesenheit von RDP58 generierten Viruspartikel elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Dadurch könnte man Aufschluss über die Struktur der Viren erhalten, genauer ob diese ein Kapsid besitzen und ob dieses die typische konische Form aufweist.

Zusätzlich könnten Neuinfektionen mit gleichen Virusmengen aus dem Kulturüberstand von RDP58- bzw. DMSO-behandelten Zellen durchgeführt werden. Dies würde zeigen, ob die Viren aus den RDP58-Kulturen in der Lage sind, die Zellen genauso effizient zu infizieren wie die Viren aus den Kontroll-Kulturen.

In Hinblick auf einen potenziellen Einsatz von RDP58 und SAM486A im Rahmen einer HIV-Therapie ist es interessant, dass sich die Wirkmechanismen der beiden Substanzen grundsätzlich voneinander unterscheiden. Deshalb wäre es eventuell denkbar, diese beiden Wirkstoffe später einmal in einer Kombinationstherapie einzusetzen. Dies erfordert aber neben der Erforschung des genauen Wirkmechanismus weitere präklinische und klinische Studien, die beweisen, dass RDP58 auch antiviral im Patienten wirkt.

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Strategien zur Therapie von Infektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) untersucht.

Im Laufe der Behandlung von HIV-infizierten Patienten mit der gegenwärtigen hochaktiven antiretroviralen Kombinationstherapie (HAART) treten zunehmend hochresistente Viren auf, welche die weiteren klinischen Therapieoptionen stark einschränken. Es ist deshalb von größter Dringlichkeit, neuartige Behandlungsstrategien zu entwickeln, welche auch die Hemmung von HAART-resistenten Viren ermöglichen.

Während der Neubildung von HI-Viren müssen virale mRNAs vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert werden. Dieser Vorgang wird durch das retrovirale mRNA-bindende Rev Protein vermittelt, indem dieses mit verschiedenen zellulären Kofaktoren wechselwirkt. Einer dieser Faktoren, der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A), enthält die seltene Aminosäure Hypusin. Es handelt sich hierbei um eine Spermidin-abhängige hochspezifische posttranslationale Modifizierung des eIF-5A Vorläuferproteins, die für die eIF-5A Funktion essenziell ist.

Ausgehend von diesem Wissensstand sollte hier die Funktionsweise von zwei experimentellen Wirkstoffen untersucht werden, die möglicherweise den HIV-1 Rev Kofaktor eIF-5A hemmen und dadurch die Neubildung von HI-Viren verhindern. Da diese Wirkstoffe eine zelluläre Struktur zum Ziel haben, müssten mit ihnen auch hochresistente (HAART-resistente) HI-Viren hemmbar sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei bekannte experimentelle Wirkstoffe, das Hydrazon SAM486A und das Decapeptid RDP58, analysiert. Diese Wirkstoffe wurden für die hier durchgeführten Experimente ausgewählt, da beide Substanzen bereits in klinischen Phase II Studien bei neoplastischen und/oder entzündlichen Erkrankungen untersucht werden und dabei bisher keine signifikanten toxischen Nebenwirkungen auftraten.

Mit Hilfe vielfältiger Infektionsexperimente konnte eindeutig gezeigt werden, dass beide Wirkstoffe, SAM486A und RDP58, eine ausgeprägte antivirale Wirkung zeigten, und die Replikation von Makrophagen-tropen-, T Zell-tropen- und insbesondere von multi-resistenten HI-Viren effizient hemmten, ohne dabei die Infektion und Integration der proviralen DNA in das Genom der Wirtszelle zu beeinträchtigen. Mit Hilfe entsprechender detaillierter Analysen konnte ausgeschlossen werden, dass diese antiviralen Effekte auf einer

Beeinflussung des zellulären Metabolismus beruhen. Die antiviral wirksamen Substanzkonzentrationen (0,4 μ M SAM486A bzw. 20 μ g/ml RDP58) induzierten keine Apoptose, und beeinflussten weder den Zellzyklus noch den zellulären Energiestoffwechsel. Wie erwartet, bildeten sich in Langzeitexperimenten selbst nach zwölf Wochen keine Resistenzen gegen diese Wirkstoffe aus.

SAM486A wurde ursprünglich als ein spezifischer Inhibitor der S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAMDC) beschrieben, einem zellulären Schlüsselenzym des Polyaminstoffwechsels, dessen Hemmung die intrazelluläre Konzentration des Polyamins Spermidin negativ beeinflusst. Tatsächlich konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass SAM486A die Spermidin-abhängige Hypusin-Modifizierung des Rev Kofaktors eIF-5A verhindert. Mit Hilfe einer Reihe verschiedener Reporter-Assays konnte schließlich nachgewiesen werden, dass der Virus-Replikationsblock in SAM486A-behandelten Zellkulturen auf der spezifischen Hemmung des Rev-vermittelten viralen mRNA Kernexports beruhte.

Im Gegensatz zu SAM486A zeigte das RDP58-Peptid jedoch eine andere Wirkweise. Durch die detaillierte Analyse aller Abschnitte des HIV-1 Lebenszyklus wurde offensichtlich, dass RDP58 weder die frühen Schritte der Infektion, noch die Rev-Funktion hemmte. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass von RDP58-behandelten Zellen deutlich weniger Viruspartikel freigesetzt werden, als von unbehandelten Zellen. Detaillierte Studien der viralen Proteinexpression zeigten dann, dass in Anwesenheit des Peptids die Translation der viralen *gag*-mRNAs stattfindet, hierbei jedoch intrazellulär eine Anhäufung des p24^{Gag}-Proteins zu beobachten war. Diese Experimente zeigten, dass diese Anhäufung durch eine frühzeitige Aktivierung der viralen Protease entstanden sein könnte, einhergehend mit einer verstärkten Prozessierung des p55^{Gag}-Vorläufers zu dem p24^{Gag}-Protein. Der exakte Wirkmechanismus von RDP58, und damit seine genaue Zielstruktur, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Zusammenfassend wurden zwei neue viel versprechende Strategien zur Hemmung von Infektionen mit HIV-1 untersucht und die entsprechenden antiretroviralen Mechanismen weitgehend aufgeklärt. Die vorgestellten Ergebnisse können die wissenschaftliche Basis zur Entwicklung neuartiger antiretroviraler Therapien bilden, die auch die Hemmung von multi-resistenten (HAART-resistenten) HI-Viren ermöglichen.

9 Literatur

1. **Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., and Martin, M. A.** (1986); Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone; *J Virol.*; 59(2); 284-291
2. **Alm, K., Berntsson, P. S., Kramer, D. L., Porter, C. W., and Oredsson, S. M.** (2000); Treatment of cells with the polyamine analog N, N11-diethylnorspermine retards S phase progression within one cell cycle; *Eur.J.Biochem.*; 267(13); 4157-4164
3. **Andrus, L., Szabo, P., Grady, R. W., Hanauske, A. R., Huima-Byron, T., Slowinska, B., Zagulska, S., and Hanauske-Abel, H. M.** (1998); Antiretroviral effects of deoxyhypusyl hydroxylase inhibitors: a hypusine-dependent host cell mechanism for replication of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1); *Biochem.Pharmacol.*; 55(11); 1807-1818
4. **Arrigo, S. J. and Chen, I. S.** (1991); Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs; *Genes Dev.*; 5(5); 808-819
5. **Askjaer, P., Bachi, A., Wilm, M., Bischoff, F. R., Weeks, D. L., Ogniewski, V., Ohno, M., Niehrs, C., Kjems, J., Mattaj, I. W., and Fornerod, M.** (1999); RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase; *Mol Cell Biol*; 19(9); 6276-6285
6. **Baltimore, D.** (1970); RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses; *Nature*; 226(5252); 1209-1211
7. **Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L.** (2004); Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983; *Rev.Invest Clin.*; 56(2); 126-129
8. **Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R., and Cullen, B. R.** (1988); Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells; *Gene*; 66(1); 1-10
9. **Bevec, D., Jaksche, H., Oft, M., Wohl, T., Himmelspach, M., Pacher, A., Schebesta, M., Koettnitz, K., Dobrovnik, M., Csonga, R., Lottspeich, F., and Hauber, J.** (1996); Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A; *Science*; 271(5257); 1858-1860
10. **Bock, P. J. and Markovitz, D. M.** (2001); Infection with HIV-2; *AIDS*; 15 Suppl 5S35-S45

11. **Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S., and Cullen, B. R.** (1995); Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins; *Cell*; 82(3); 485-494
12. **Bohnlein, E., Berger, J., and Hauber, J.** (1991); Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex; *J.Virol.*; 65(12); 7051-7055
13. **Bonfanti, P., Capetti, A., and Rizzardini, G.** (1999); HIV disease treatment in the era of HAART; *Biomed.Pharmacother.*; 53(2); 93-105
14. **Bourreille, A., Doubremelle, M., de la Bletiere, D. R., Segain, J. P., Toquet, C., Buelow, R., and Galmiche, J. P.** (2003); RDP58, a novel immunomodulatory peptide with anti-inflammatory effects. A pharmacological study in trinitrobenzene sulphonic acid colitis and Crohn disease; *Scand.J.Gastroenterol.*; 38(5); 526-532
15. **Bray, M., Prasad, S., Dubay, J. W., Hunter, E., Jeang, K. T., Rekosh, D., and Hammarskjold, M. L.** (1994); A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 91(4); 1256-1260
16. **Brennan, C. M., Gallouzi, I. E., and Steitz, J. A.** (2000); Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo; *J.Cell Biol.*; 151(1); 1-14
17. **Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E., and Bishop, J. M.** (1987); Correct integration of retroviral DNA in vitro; *Cell*; 49(3); 347-356
18. **Bushman, F. D., Fujiwara, T., and Craigie, R.** (1990); Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro; *Science*; 249(4976); 1555-1558
19. **Camaur, D. and Trono, D.** (1996); Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation; *J.Virol.*; 70(9); 6106-6111
20. **Chang, Y. C. and Tyring, S. K.** (2004); Therapy of HIV infection; *Dermatol.Ther.*; 17(6); 449-464
21. **Chen, K. Y. and Liu, A. Y.** (1997); Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A; *Biol.Signals*; 6(3); 105-109
22. **Chiang, P. K., McCann, P. P., Lane, J. R., Pankaskie, M. C., Burke, D. S., and Mayers, D. L.** (1996); Antihuman Immunodeficiency Virus (HIV-1) Activities of Inhibitors of Polyamine Pathways; *J.Biomed.Sci.*; 3(2); 78-81
23. **Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., and .** (1986); Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS; *Science*; 233(4761); 343-346
24. **Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Salle, M., Montagnier, L., and Alizon, M.** (1986); Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2; *Nature*; 324(6098); 691-695

25. **Clement, P. M., Henderson, C. A., Jenkins, Z. A., Smit-McBride, Z., Wolff, E. C., Hershey, J. W., Park, M. H., and Johansson, H. E.** (2003); Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2; *Eur.J.Biochem.*; 270(21); 4254-4263
26. **Cochrane, A. W., Jones, K. S., Beidas, S., Dillon, P. J., Skalka, A. M., and Rosen, C. A.** (1991); Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression; *J.Virol.*; 65(10); 5305-5313
27. **Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., and .** (1986); What to call the AIDS virus?; *Nature*; 321(6065); 10-
28. **Coffin, J. M.** (1997); *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.;
29. **Cohen, P. S., Nakshatri, H., Dennis, J., Caragine, T., Bianchi, M., Cerami, A., and Tracey, K. J.** (1996); CNI-1493 inhibits monocyte/macrophage tumor necrosis factor by suppression of translation efficiency; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 93(9); 3967-3971
30. **Connor, R. I., Chen, B. K., Choe, S., and Landau, N. R.** (1995); Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes; *Virology*; 206(2); 935-944
31. **Cullen, B. R.** (1986); Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism; *Cell*; 46(7); 973-982
32. **D'Agostino, D. M., Felber, B. K., Harrison, J. E., and Pavlakis, G. N.** (1992); The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs; *Mol.Cell Biol.*; 12(3); 1375-1386
33. **Daelemans, D., Afonina, E., Nilsson, J., Werner, G., Kjems, J., De Clercq, E., Pavlakis, G. N., and Vandamme, A. M.** (2002); A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 99(22); 14440-14445
34. **Dai, Y., Gold, B., Vishwanatha, J. K., and Rhode, S. L.** (1994); Mimosine inhibits viral DNA synthesis through ribonucleotide reductase; *Virology*; 205(1); 210-216
35. **Daly, T. J., Cook, K. S., Gray, G. S., Maione, T. E., and Rusche, J. R.** (1989); Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro; *Nature*; 342(6251); 816-819
36. **Daly, T. J., Doten, R. C., Rennert, P., Auer, M., Jaksche, H., Donner, A., Fisk, G., and Rusche, J. R.** (1993); Biochemical characterization of binding of multiple HIV-1 Rev monomeric proteins to the Rev responsive element; *Biochemistry*; 32(39); 10497-10505

37. **De Vry, C. G., Valdez, M., Lazarov, M., Muhr, E., Buelow, R., Fong, T., and Iyer, S.** (2005); Topical application of a novel immunomodulatory peptide, RDP58, reduces skin inflammation in the phorbol ester-induced dermatitis model; *J.Invest Dermatol.*; 125(3); 473-481
38. **Debouck, C.** (1992); The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS; *AIDS Res.Hum.Retroviruses*; 8(2); 153-164
39. **Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., and Landau, N. R.** (1996); Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1; *Nature*; 381(6584); 661-666
40. **Domingo, P., Perez, A., Torres, O. H., Montiel, J. A., and Vazquez, G.** (1999); Lipodystrophy in HIV-1-infected patients; *Lancet*; 354(9181); 868-
41. **Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G., and Doms, R. W.** (1996); A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors; *Cell*; 85(7); 1149-1158
42. **Dorhout, B., te Velde, R. J., Ferwerda, H., Kingma, A. W., de Hoog, E., and Muskiet, F. A.** (1995); In vivo growth inhibition of L1210 leukemia by 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A), a new inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase; *Int.J.Cancer*; 61(2); 214-217
43. **Dube, M. P., Johnson, D. L., Currier, J. S., and Leedom, J. M.** (1997); Protease inhibitor-associated hyperglycaemia; *Lancet*; 350(9079); 713-714
44. **Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L.** (1998); A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system; *J.Virol.*; 72(11); 8463-8471
45. **Dybul, M., Fauci, A. S., Bartlett, J. G., Kaplan, J. E., and Pau, A. K.** (2002); Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents; *Ann.Intern.Med.*; 137(5 Pt 2); 381-433
46. **Emerman, M. and Malim, M. H.** (1998); HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology; *Science*; 280(5371); 1880-1884
47. **Eyer-Silva, W. A. and Morgado, M. G.** (2005); A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality; *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*; 100(8); 869-873
48. **Fauci, A. S.** (1993); Immunopathogenesis of HIV infection; *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.*; 6(6); 655-662
49. **Felber, B. K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T., and Pavlakis, G. N.** (1989); rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 86(5); 1495-1499

50. **Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W., and Luhrmann, R.** (1995); The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs; *Cell*; 82(3); 475-483
51. **Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W.** (1997); CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals; *Cell*; 90(6); 1051-1060
52. **Forshey, B. M., von Schwedler, U., Sundquist, W. I., and Aiken, C.** (2002); Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication; *J.Virol.*; 76(11); 5667-5677
53. **Fozard, J. R., Part, M. L., Prakash, N. J., Grove, J., Schechter, P. J., Sjoerdsma, A., and Koch-Weser, J.** (1980); L-Ornithine decarboxylase:an essential role in early mammalian embryogenesis; *Science*; 208(4443); 505-508
54. **Franke, E. K., Yuan, H. E., and Luban, J.** (1994); Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions; *Nature*; 372(6504); 359-362
55. **Frankel, A. D. and Young, J. A.** (1998); HIV-1: fifteen proteins and an RNA; *Annu.Rev.Biochem.*; 671-25
56. **Freed, E. O.** (2001); HIV-1 replication; *Somat.Cell Mol.Genet.*; 26(1-6); 13-33
57. **Fritz, C. C., Zapp, M. L., and Green, M. R.** (1995); A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev; *Nature*; 376(6540); 530-533
58. **Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E.** (1997); CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal; *Nature*; 390(6657); 308-311
59. **Furman, P. A., Fyfe, J. A., St Clair, M. H., Weinhold, K., Rideout, J. L., Freeman, G. A., Lehrman, S. N., Bolognesi, D. P., Broder, S., Mitsuya, H., and .** (1986); Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 83(21); 8333-8337
60. **Furtado, M. R., Callaway, D. S., Phair, J. P., Kunstman, K. J., Stanton, J. L., Macken, C. A., Perelson, A. S., and Wolinsky, S. M.** (1999); Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy; *N.Engl.J Med.*; 340(21); 1614-1622
61. **Gabuzda, D. H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W. A., and Sodroski, J.** (1992); Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes; *J.Virol.*; 66(11); 6489-6495
62. **Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D. M., Kaplan, M. H., Gallo, R. C., and Popovic, M.** (1986); The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection; *Science*; 233(4760); 215-219
63. **Gelderblom, H. R.** (1991); Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function; *AIDS*; 5(6); 617-637

-
64. **Goldman, M. E., Nunberg, J. H., O'Brien, J. A., Quintero, J. C., Schleif, W. A., Freund, K. F., Gaul, S. L., Saari, W. S., Wai, J. S., Hoffman, J. M., and .** (1991); Pyridinone derivatives: specific human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors with antiviral activity; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 88(15); 6863-6867
 65. **Gonzalez, R. R., Fong, T., Belmar, N., Saban, M., Felsen, D., and Te, A.** (2005); Modulating bladder neuro-inflammation: RDP58, a novel anti-inflammatory peptide, decreases inflammation and nerve growth factor production in experimental cystitis; *J.Urol.*; 173(2); 630-634
 66. **Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., and Saxon, A.** (1981); Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency; *N.Engl.J.Med.*; 305(24); 1425-1431
 67. **Greene, W. C.** (1991); The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection; *N.Engl.J.Med.*; 324(5); 308-317
 68. **Greene, W. C. and Peterlin, B. M.** (2002); Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy; *Nat.Med.*; 8(7); 673-680
 69. **Gruter, P., Taberner, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B. K., and Izaurralde, E.** (1998); TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus; *Mol.Cell*; 1(5); 649-659
 70. **Guatelli, J. C., Gingeras, T. R., and Richman, D. D.** (1990); Alternative splice acceptor utilization during human immunodeficiency virus type 1 infection of cultured cells; *J.Virol.*; 64(9); 4093-4098
 71. **Guhaniyogi, J. and Brewer, G.** (2001); Regulation of mRNA stability in mammalian cells; *Gene*; 265(1-2); 11-23
 72. **Gutman, M., Beltran, P. J., Fan, D., Delworth, M. G., Singh, R. K., Wilson, M. R., and Fidler, I. J.** (1995); Treatment of nude mice with 4-amidinoindan -1- one2 '-amidinohydrazone, a new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor, delays growth and inhibits metastasis of human melanoma cells; *Melanoma Res.*; 5(3); 147-154
 73. **Hadzopoulou-Cladaras, M., Felber, B. K., Cladaras, C., Athanassopoulos, A., Tse, A., and Pavlakis, G. N.** (1989); The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region; *J.Virol.*; 63(3); 1265-1274
 74. **Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. D., and Garten, W.** (1992); Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160; *Nature*; 360(6402); 358-361

-
75. **Hanly, S. M., Rimsky, L. T., Malim, M. H., Kim, J. H., Hauber, J., Duc, D. M., Le, S. Y., Maizel, J. V., Cullen, B. R., and Greene, W. C.** (1989); Comparative analysis of the HTLV-I Rex and HIV-1 Rev trans-regulatory proteins and their RNA response elements; *Genes Dev.*; 3(10); 1534-1544
 76. **Hart, R. A., Billaud, J. N., Choi, S. J., and Phillips, T. R.** (2002); Effects of 1,8-diaminooctane on the FIV Rev regulatory system; *Virology*; 304(1); 97-104
 77. **Hashiguchi, H. and Takahashi, H.** (1977); Inhibition of two copper-containing enzymes, tyrosinase and dopamine beta-hydroxylase, by L-mimosine; *Mol.Pharmacol.*; 13(2); 362-367
 78. **Hauber, I., Bevec, D., Heukeshoven, J., Kratzer, F., Horn, F., Choidas, A., Harrer, T., and Hauber, J.** (2005); Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy; *J.Clin.Invest*; 115(1); 76-85
 79. **Hauber, I., Harrer, T., Low, P., Schmitt, M., Schwingel, E., and Hauber, J.** (2000); Determination of HIV-1 circular DNA as a surrogate marker for residual virus replication in patients with undetectable virus loads; *AIDS*; 14(16); 2619-2621
 80. **Heaphy, S., Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M., and Skinner, M. A.** (1990); HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region; *Cell*; 60(4); 685-693
 81. **Henry, K., Melroe, H., Huebesch, J., Hermundson, J., and Simpson, J.** (1998); Atorvastatin and gemfibrozil for protease-inhibitor-related lipid abnormalities; *Lancet*; 352(9133); 1031-1032
 82. **Henry, K., Wallace, R. J., Bellman, P. C., Norris, D., Fisher, R. L., Ross, L. L., Liao, Q., and Shaefer, M. S.** (2001); Twice-daily triple nucleoside intensification treatment with lamivudine-zidovudine plus abacavir sustains suppression of human immunodeficiency virus type 1: results of the TARGET Study; *J.Infect.Dis.*; 183(4); 571-578
 83. **Hirsch, M. S., Conway, B., D'Aquila, R. T., Johnson, V. A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Demeter, L. M., Hammer, S. M., Jacobsen, D. M., Kuritzkes, D. R., Loveday, C., Mellors, J. W., Vella, S., and Richman, D. D.** (1998); Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society--USA Panel; *JAMA*; 279(24); 1984-1991
 84. **Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Muller, E., Schmitt, I., Stauber, R. H., Lottspeich, F., Jockusch, B. M., Scheer, U., Hauber, J., and Dabauvalle, M. C.** (2001); Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin; *J.Cell Biol.*; 152(5); 895-910
 85. **Holland, S. M., Ahmad, N., Maitra, R. K., Wingfield, P., and Venkatesan, S.** (1990); Human immunodeficiency virus rev protein recognizes a target sequence in rev-responsive element RNA within the context of RNA secondary structure; *J.Virol.*; 64(12); 5966-5975
 86. **Holtmann, M. M.** (2003); RDP-58 (SangStat Medical); *IDrugs.*; 6(12); 1188-1194
-

-
87. **Hsu, M., Harouse, J. M., Gettie, A., Buckner, C., Blanchard, J., and Cheng-Mayer, C.** (2003); Increased mucosal transmission but not enhanced pathogenicity of the CCR5-tropic, simian AIDS-inducing simian/human immunodeficiency virus SHIV(SF162P3) maps to envelope gp120; *J.Virol.*; 77(2); 989-998
88. **Hu, X., Washington, S., Verderame, M. F., Demers, L. M., Mauger, D., and Manni, A.** (2004); Biological activity of the S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor SAM486A in human breast cancer cells in vitro and in vivo; *Int.J.Oncol.*; 25(6); 1831-1838
89. **Iyer, S., Kontoyiannis, D., Chevrier, D., Woo, J., Mori, N., Cornejo, M., Kollias, G., and Buelow, R.** (2000); Inhibition of tumor necrosis factor mRNA translation by a rationally designed immunomodulatory peptide 7; *J.Biol.Chem.*; 275(22); 17051-17057
90. **Jang, B. C., Munoz-Najar, U., Paik, J. H., Claffey, K., Yoshida, M., and Hla, T.** (2003); Leptomycin B, an inhibitor of the nuclear export receptor CRM1, inhibits COX-2 expression; *J.Biol.Chem.*; 278(5); 2773-2776
91. **Janne, J., Poso, H., and Raina, A.** (1978); Polyamines in rapid growth and cancer; *Biochim.Biophys.Acta*; 473(3-4); 241-293
92. **Junker, U., Bevec, D., Barske, C., Kalfoglou, C., Escaich, S., Dobrovnik, M., Hauber, J., and Bohnlein, E.** (1996); Intracellular expression of cellular eIF-5A mutants inhibits HIV-1 replication in human T cells: a feasibility study; *Hum.Gene Ther.*; 7(15); 1861-1869
93. **Kang, H. A. and Hershey, J. W.** (1994); Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*; *J.Biol.Chem.*; 269(6); 3934-3940
94. **Kang, H. A., Schwelberger, H. G., and Hershey, J. W.** (1993); Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*; *J.Biol.Chem.*; 268(20); 14750-14756
95. **Kao, S. Y., Calman, A. F., Luciw, P. A., and Peterlin, B. M.** (1987); Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product; *Nature*; 330(6147); 489-493
96. **Kaplan, A. H., Zack, J. A., Knigge, M., Paul, D. A., Kempf, D. J., Norbeck, D. W., and Swanstrom, R.** (1993); Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles; *J.Virol.*; 67(7); 4050-4055
97. **Katahira, J., Ishizaki, T., Sakai, H., Adachi, A., Yamamoto, K., and Shida, H.** (1995); Effects of translation initiation factor eIF-5A on the functioning of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus Rev inhibited trans dominantly by a Rex mutant deficient in RNA binding; *J.Virol.*; 69(5); 3125-3133
98. **Kay, J. and Dunn, B. M.** (1990); Viral proteinases: weakness in strength; *Biochim.Biophys.Acta*; 1048(1); 1-18
-

99. **Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A., and Gerace, L.** (1998); Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro; *J.Cell Biol.*; 141(4); 863-874
100. **Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J., and Baltimore, D.** (1989); Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression; *J.Virol.*; 63(9); 3708-3713
101. **Kimura, T., Hashimoto, I., Nagase, T., and Fujisawa, J.** (2004); CRM1-dependent, but not ARE-mediated, nuclear export of IFN-alpha1 mRNA; *J.Cell Sci.*; 117(Pt 11); 2259-2270
102. **Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C., and Montagnier, L.** (1984); T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV; *Nature*; 312(5996); 767-768
103. **Klier, H., Csonga, R., Joao, H. C., Eckerskorn, C., Auer, M., Lottspeich, F., and Eder, J.** (1995); Isolation and structural characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein eIF-5A from HeLa cells; *Biochemistry*; 34(45); 14693-14702
104. **Kontoghiorghes, G. J., Piga, A., and Hoffbrand, A. V.** (1986); Cytotoxic and DNA-inhibitory effects of iron chelators on human leukaemic cell lines; *Hematol.Oncol.*; 4(3); 195-204
105. **Kramer, D., Mett, H., Evans, A., Regenass, U., Diegelman, P., and Porter, C. W.** (1995); Stable amplification of the S-adenosylmethionine decarboxylase gene in Chinese hamster ovary cells; *J.Biol.Chem.*; 270(5); 2124-2132
106. **Krausslich, H. G.** (1991); Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 88(8); 3213-3217
107. **Kruse, M., Rosorius, O., Kratzer, F., Bevec, D., Kuhnt, C., Steinkasserer, A., Schuler, G., and Hauber, J.** (2000); Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA; *J.Exp.Med.*; 191(9); 1581-1590
108. **Kusunoki, S. and Yasumasu, I.** (1978); Inhibitory effect of alpha-hydrazinoornithine on egg cleavage in sea urchin eggs; *Dev.Biol.*; 67(2); 336-345
109. **LaBonte, J., Lebbos, J., and Kirkpatrick, P.** (2003); Enfuvirtide; *Nat.Rev.Drug Discov.*; 2(5); 345-346
110. **Laemmli, U. K.** (1970); Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature*; 227(5259); 680-685
111. **Lal, R. B., Chakrabarti, S., and Yang, C.** (2005); Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development; *Indian J.Med.Res.*; 121(4); 287-314

112. **Lapatto, R., Blundell, T., Hemmings, A., Overington, J., Wilderspin, A., Wood, S., Merson, J. R., Whittle, P. J., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., and .** (1989); X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes; *Nature*; 342(6247); 299-302
113. **Lazarov M** (2003); RDP58, a Novel Antiinflammatory Peptide, Inhibits Multiple Intracellular Messenger Pathways and Transcription Factors to Block TNF- α , IFN- α , and IL12 Production. *Gastroenterology*. 2003;124(Suppl 1):A-102.;
114. **Lemey, P., Pybus, O. G., Rambaut, A., Drummond, A. J., Robertson, D. L., Roques, P., Worobey, M., and Vandamme, A. M.** (2004); The molecular population genetics of HIV-1 group O; *Genetics*; 167(3); 1059-1068
115. **Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., and Oshiro, L. S.** (1984); Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS; *Science*; 225(4664); 840-842
116. **Little, S. J., Holte, S., Routy, J. P., Daar, E. S., Markowitz, M., Collier, A. C., Koup, R. A., Mellors, J. W., Connick, E., Conway, B., Kilby, M., Wang, L., Whitcomb, J. M., Hellmann, N. S., and Richman, D. D.** (2002); Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV; *N.Engl.J.Med.*; 347(6); 385-394
117. **Liu, H., Wu, X., Newman, M., Shaw, G. M., Hahn, B. H., and Kappes, J. C.** (1995); The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures; *J.Virol.*; 69(12); 7630-7638
118. **Lu, Y. L., Spearman, P., and Ratner, L.** (1993); Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions; *J.Virol.*; 67(11); 6542-6550
119. **Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V., and Goff, S. P.** (1993); Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B; *Cell*; 73(6); 1067-1078
120. **Malim, M. H., Bohnlein, S., Hauber, J., and Cullen, B. R.** (1989); Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function; *Cell*; 58(1); 205-214
121. **Malim, M. H. and Cullen, B. R.** (1991); HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency; *Cell*; 65(2); 241-248
122. **Malim, M. H. and Cullen, B. R.** (1993); Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes; *Mol.Cell Biol.*; 13(10); 6180-6189
123. **Malim, M. H., Hauber, J., Fenrick, R., and Cullen, B. R.** (1988); Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes; *Nature*; 335(6186); 181-183
124. **Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V., and Cullen, B. R.** (1989); The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA; *Nature*; 338(6212); 254-257

125. **Manni, A., Badger, B., Wechter, R., Kunselman, S., Rossini, A., and Demers, L.** (1995); Biochemical and growth-modulatory effects of the new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor CGP 48664 in malignant and immortalized normal human breast epithelial cells in culture; *Int.J.Cancer*; 62(4); 485-491
126. **Mansky, L. M.** (1996); The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene; *Virology*; 222(2); 391-400
127. **Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onorato, I., Stouwe, R. A., Holzman, R. S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H. W., and Cunningham-Rundles, S.** (1981); An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction; *N.Engl.J.Med.*; 305(24); 1431-1438
128. **McCann, P. P. and Pegg, A. E.** (1992); Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy; *Pharmacol.Ther.*; 54(2); 195-215
129. **Megarrity, R. G.** (1978); An automated colorimetric method for mimosine in *Leucaena* leaves; *J.Sci.Food Agric.*; 29(2); 182-186
130. **Mellors, J. W., Munoz, A., Giorgi, J. V., Margolick, J. B., Tassoni, C. J., Gupta, P., Kingsley, L. A., Todd, J. A., Saah, A. J., Detels, R., Phair, J. P., and Rinaldo, C. R., Jr.** (1997); Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection; *Ann.Intern.Med.*; 126(12); 946-954
131. **Mi, Z., Kramer, D. L., Miller, J. T., Bergeron, R. J., Bernacki, R., and Porter, C. W.** (1998); Human prostatic carcinoma cell lines display altered regulation of polyamine transport in response to polyamine analogs and inhibitors; *Prostate*; 34(1); 51-60
132. **Millward, M. J., Joshua, A., Kefford, R., Aamdal, S., Thomson, D., Hersey, P., Toner, G., and Lynch, K.** (2005); Multi-centre Phase II trial of the polyamine synthesis inhibitor SAM486A (CGP48664) in patients with metastatic melanoma; *Invest New Drugs*; 23(3); 253-256
133. **Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St Clair, M. H., Lehrman, S. N., Gallo, R. C., Bolognesi, D., Barry, D. W., and Broder, S.** (1985); 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus III/lymphadenopathy-associated virus in vitro; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 82(20); 7096-7100
134. **Modrow S.** (2003); *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg;
135. **Molla, A., Korneyeva, M., Gao, Q., Vasavanonda, S., Schipper, P. J., Mo, H. M., Markowitz, M., Chernyavskiy, T., Niu, P., Lyons, N., Hsu, A., Granneman, G. R., Ho, D. D., Boucher, C. A., Leonard, J. M., Norbeck, D. W., and Kempf, D. J.** (1996); Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir; *Nat.Med.*; 2(7); 760-766
136. **Mosca, P. J., Lin, H. B., and Hamlin, J. L.** (1995); Mimosine, a novel inhibitor of DNA replication, binds to a 50 kDa protein in Chinese hamster cells; *Nucleic Acids Res.*; 23(2); 261-268

-
137. **Muesing, M. A., Smith, D. H., and Capon, D. J.** (1987); Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein; *Cell*; 48(4); 691-701
 138. **Murthy, S., Flanigan, A., Coppola, D., and Buelow, R.** (2002); RDP58, a locally active TNF inhibitor, is effective in the dextran sulphate mouse model of chronic colitis; *Inflamm.Res.*; 51(11); 522-531
 139. **Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L. I., and Rosbash, M.** (1997); The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export; *Curr.Biol.*; 7(10); 767-775
 140. **Nishimura, K., Murozumi, K., Shirahata, A., Park, M. H., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.** (2005); Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation; *Biochem.J.*; 385(Pt 3); 779-785
 141. **Nishimura, K., Ohki, Y., Fukuchi-Shimogori, T., Sakata, K., Saiga, K., Beppu, T., Shirahata, A., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.** (2002); Inhibition of cell growth through inactivation of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by deoxyspergualin; *Biochem.J.*; 363(Pt 3); 761-768
 142. **Nunberg, J. H., Schleif, W. A., Boots, E. J., O'Brien, J. A., Quintero, J. C., Hoffman, J. M., Emini, E. A., and Goldman, M. E.** (1991); Viral resistance to human immunodeficiency virus type 1-specific pyridinone reverse transcriptase inhibitors; *J.Virol.*; 65(9); 4887-4892
 143. **Oberyszyn, T. M., Robertson, F. M., Tober, K. L., Ross, M. S., Parrett, M. L., Wilgus, T. A., Iyer, S., Woo, J., and Buelow, R.** (2001); Inhibition of cutaneous UV light-induced tumor necrosis factor-alpha protein production by Allotrap 1258, a novel immunomodulatory peptide; *Photochem.Photobiol.*; 73(2); 184-190
 144. **Olsen, H. S., Cochrane, A. W., Dillon, P. J., Nalin, C. M., and Rosen, C. A.** (1990); Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids; *Genes Dev.*; 4(8); 1357-1364
 145. **Ossareh-Nazari, B., Bachelerie, F., and Dargemont, C.** (1997); Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export; *Science*; 278(5335); 141-144
 146. **Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J., and Holmberg, S. D.** (1998); Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators; *N.Engl.J.Med.*; 338(13); 853-860
 147. **Park, J. and Morrow, C. D.** (1993); Mutations in the protease gene of human immunodeficiency virus type 1 affect release and stability of virus particles; *Virology*; 194(2); 843-850
 148. **Park, M. H.** (1988); The identification of an eukaryotic initiation factor 4D precursor in spermidine-depleted Chinese hamster ovary cells; *J.Biol.Chem.*; 263(16); 7447-7449

149. **Park, M. H.** (1989); The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities; *J.Biol.Chem.*; 264(31); 18531-18535
150. **Park, M. H., Lee, Y. B., and Joe, Y. A.** (1997); Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation; *Biol.Signals*; 6(3); 115-123
151. **Park, M. H., Wolff, E. C., and Folk, J. E.** (1993); Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation; *Biofactors*; 4(2); 95-104
152. **Park, M. H., Wolff, E. C., and Folk, J. E.** (1993); Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation?; *Trends Biochem.Sci.*; 18(12); 475-479
153. **Parker, R. and Song, H.** (2004); The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover; *Nat Struct.Mol Biol*; 11(2); 121-127
154. **Paulsson, K. and Wang, P.** (2003); Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum; *Biochim.Biophys.Acta*; 1641(1); 1-12
155. **Pearl, L. H. and Taylor, W. R.** (1987); A structural model for the retroviral proteases; *Nature*; 329(6137); 351-354
156. **Pearl, L. H. and Taylor, W. R.** (1987); Sequence specificity of retroviral proteases; *Nature*; 328(6130); 482-
157. **Pegg, A. E.** (1988); Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy; *Cancer Res.*; 48(4); 759-774
158. **Pegg, A. E. and McCann, P. P.** (1992); S-adenosylmethionine decarboxylase as an enzyme target for therapy; *Pharmacol.Ther.*; 56(3); 359-377
159. **Pegg, A. E., Seely, J. E., Poso, H., della, R. F., and Zagon, I. A.** (1982); Polyamine biosynthesis and interconversion in rodent tissues; *Fed.Proc.*; 41(14); 3065-3072
160. **Perez, L. G., O'Donnell, M. A., and Stephens, E. B.** (1992); The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein; *J.Virol.*; 66(7); 4134-4143
161. **Perkins, A., Cochrane, A. W., Ruben, S. M., and Rosen, C. A.** (1989); Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein; *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.*; 2(3); 256-263
162. **Pettit, S. C., Lindquist, J. N., Kaplan, A. H., and Swanstrom, R.** (2005); Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates; *Retrovirology.*; 266-
163. **Pless, M., Belhadj, K., Menssen, H. D., Kern, W., Coiffier, B., Wolf, J., Herrmann, R., Thiel, E., Bootle, D., Sklenar, I., Muller, C., Choi, L., Porter, C., and Capdeville, R.** (2004); Clinical efficacy, tolerability, and safety of SAM486A, a novel polyamine biosynthesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: results from a phase II multicenter study; *Clin.Cancer Res.*; 10(4); 1299-1305

-
164. **Pollard, V. W. and Malim, M. H.** (1998); The HIV-1 Rev protein; *Annu.Rev.Microbiol.*; 52491-532
165. **Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C.** (1984); Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS; *Science*; 224(4648); 497-500
166. **Prechtel, A. T., Chemnitz, J., Schirmer, S., Ehlers, C., Langbein-Detsch, I., Stulke, J., Dabauvalle, M. C., Kehlenbach, R. H., and Hauber, J.** (2006); Expression of CD83 is regulated by HuR via a novel cis-active coding region RNA element; *J.Biol.Chem.*;
167. **Preston, B. D., Poiesz, B. J., and Loeb, L. A.** (1988); Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase; *Science*; 242(4882); 1168-1171
168. **Purcell, D. F. and Martin, M. A.** (1993); Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity; *J.Virol.*; 67(11); 6365-6378
169. **Reeves, J. D. and Doms, R. W.** (2002); Human immunodeficiency virus type 2; *J.Gen.Virol.*; 83(Pt 6); 1253-1265
170. **Reeves, J. D., Gallo, S. A., Ahmad, N., Miamidian, J. L., Harvey, P. E., Sharron, M., Pohlmann, S., Sfakianos, J. N., Derdeyn, C. A., Blumenthal, R., Hunter, E., and Doms, R. W.** (2002); Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 99(25); 16249-16254
171. **Regenass, U., Caravatti, G., Mett, H., Stanek, J., Schneider, P., Muller, M., Matter, A., Vertino, P., and Porter, C. W.** (1992); New S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors with potent antitumor activity; *Cancer Res.*; 52(17); 4712-4718
172. **Regenass, U., Mett, H., Stanek, J., Mueller, M., Kramer, D., and Porter, C. W.** (1994); CGP 48664, a new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor with broad spectrum antiproliferative and antitumor activity; *Cancer Res.*; 54(12); 3210-3217
173. **Retrovirusbulletin** (2004); Retrovirusbulletin Ausgabe 4; www.virologie.uni-erlangen.de;
174. **Richman, D. D.** (1993); HIV drug resistance; *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*; 33149-164
175. **Robert-Guroff, M., Popovic, M., Gartner, S., Markham, P., Gallo, R. C., and Reitz, M. S.** (1990); Structure and expression of tat-, rev-, and nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages; *J.Virol.*; 64(7); 3391-3398
176. **Roberts, J. D., Bebenek, K., and Kunkel, T. A.** (1988); The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1; *Science*; 242(4882); 1171-1173

-
177. **Roques, P., Robertson, D. L., Souquiere, S., Apetrei, C., Nerrienet, E., Barre-Sinoussi, F., Muller-Trutwin, M., and Simon, F.** (2004); Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N; *AIDS*; 18(10); 1371-1381
178. **Rosen, C. A., Terwilliger, E., Dayton, A., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A.** (1988); Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 85(7); 2071-2075
179. **Rosorius, O., Reichart, B., Kratzer, F., Heger, P., Dabauvalle, M. C., and Hauber, J.** (1999); Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1; *J.Cell Sci.*; 112 (Pt 14)2369-2380
180. **Rucker, J., Doranz, B. J., Edinger, A. L., Long, D., Berson, J. F., and Doms, R. W.** (1997); Cell-cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry; *Methods Enzymol.*; 288118-133
181. **Ruhl, M., Himmelspach, M., Bahr, G. M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G. K., Probst, H., Bevec, D., and .** (1993); Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation; *J.Cell Biol.*; 123(6 Pt 1); 1309-1320
182. **Schatz, O., Oft, M., Dascher, C., Schebesta, M., Rosorius, O., Jaksche, H., Dobrovnik, M., Bevec, D., and Hauber, J.** (1998); Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 95(4); 1607-1612
183. **Schmit, J. C. and Weber, B.** (1997); Recent advances in antiretroviral therapy and HIV infection monitoring; *Intervirology*; 40(5-6); 304-321
184. **Schroff, R. W., Gottlieb, M. S., Prince, H. E., Chai, L. L., and Fahey, J. L.** (1983); Immunological studies of homosexual men with immunodeficiency and Kaposi's sarcoma; *Clin.Immunol.Immunopathol.*; 27(3); 300-314
185. **Schutz, S., Chemnitz, J., Spillner, C., Frohme, M., Hauber, J., and Kehlenbach, R. H.** (2006); Stimulated Expression of mRNAs in Activated T Cells Depends on a Functional CRM1 Nuclear Export Pathway; *J.Mol.Biol.*;
186. **Schwartz, S., Felber, B. K., Benko, D. M., Fenyó, E. M., and Pavlakis, G. N.** (1990); Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1; *J.Virol.*; 64(6); 2519-2529
187. **Schwartz, S., Felber, B. K., and Pavlakis, G. N.** (1992); Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein; *J.Virol.*; 66(1); 150-159
188. **Seidenfeld, J., Gray, J. W., and Marton, L. J.** (1981); Depletion of 9L rat brain tumor cell polyamine content by treatment with D,L-alpha-difluoromethylornithine inhibits proliferation and the G1 to S transition; *Exp.Cell Res.*; 131(1); 209-216

189. **Seiler, N. and Atanassov, C. L.** (1994); The natural polyamines and the immune system; *Prog.Drug Res.*; 4387-141
190. **Shafer, R. W. and Vuitton, D. A.** (1999); Highly active antiretroviral therapy (HAART) for the treatment of infection with human immunodeficiency virus type 1; *Biomed.Pharmacother.*; 53(2); 73-86
191. **Shi, X. P., Yin, K. C., Ahern, J., Davis, L. J., Stern, A. M., and Waxman, L.** (1996); Effects of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture; *Biochim.Biophys.Acta*; 1310(1); 119-126
192. **Sitaraman, S. V., Hoteit, M., and Gewirtz, A. T.** (2003); Semapimod. Cytokine; *Curr Opin Investig.Drugs*; 4(11); 1363-1368
193. **Smit-McBride, Z., Schnier, J., Kaufman, R. J., and Hershey, J. W.** (1989); Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhyphusinated forms of the protein; *J.Biol.Chem.*; 264(31); 18527-18530
194. **Sommer, M. N., Bevec, D., Klebl, B., Flicke, B., Holscher, K., Freudenreich, T., Hauber, I., Hauber, J., and Mett, H.** (2004); Screening assay for the identification of deoxyhypusine synthase inhibitors; *J.Biomol.Screen.*; 9(5); 434-438
195. **Staszewski, S. and Stephan, C.** (2004); ["State of the HAART". Current strategies for antiretroviral therapy]; *Internist (Berl)*; 45(12); 1428-1436
196. **Stevenson, M., Haggerty, S., Lamonica, C. A., Meier, C. M., Welch, S. K., and Wasiak, A. J.** (1990); Integration is not necessary for expression of human immunodeficiency virus type 1 protein products; *J.Virol.*; 64(5); 2421-2425
197. **Strebel, K.** (2003); Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev; *AIDS*; 17 Suppl 4S25-S34
198. **Stutz, F. and Izaurralde, E.** (2003); The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export; *Trends Cell Biol.*; 13(6); 319-327
199. **Swanson, C. M., Puffer, B. A., Ahmad, K. M., Doms, R. W., and Malim, M. H.** (2004); Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly; *EMBO J.*; 23(13); 2632-2640
200. **Tabor, C. W. and Tabor, H.** (1984); Polyamines; *Annu.Rev.Biochem.*; 53749-790
201. **Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J., and Gottlinger, H. G.** (1994); Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions; *Nature*; 372(6504); 363-365
202. **Thomas, T. and Thomas, T. J.** (2001); Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications; *Cell Mol.Life Sci.*; 58(2); 244-258
203. **Thomas, T. and Thomas, T. J.** (2003); Polyamine metabolism and cancer; *J.Cell Mol.Med.*; 7(2); 113-126

-
204. **Thomas, T. J., Gunnia, U. B., and Thomas, T.** (1992); Reversal of the abnormal development of T cell subpopulations in the thymus of autoimmune MRL-lpr/lpr mice by a polyamine biosynthesis inhibitor; *Autoimmunity*; 13(4); 275-283
205. **Tolbert, W. D., Ekstrom, J. L., Mathews, I. I., Secrist, J. A., III, Kapoor, P., Pegg, A. E., and Ealick, S. E.** (2001); The structural basis for substrate specificity and inhibition of human S-adenosylmethionine decarboxylase; *Biochemistry*; 40(32); 9484-9494
206. **Travis, S., Yap, L. M., Hawkey, C., Warren, B., Lazarov, M., Fong, T., and Tesi, R. J.** (2005); RDP58 is a novel and potentially effective oral therapy for ulcerative colitis; *Inflamm.Bowel.Dis.*; 11(8); 713-719
207. **Tsai, W. C. and Ling, K. H.** (1974); Effect of metals on the absorption and excretion of mimosine and and 3, 4-dihydroxypyridine in rat in vivo; *Taiwan.Yi.Xue.Hui.Za Zhi.*; 73(9); 543-549
208. **Valentini, S. R., Casolari, J. M., Oliveira, C. C., Silver, P. A., and McBride, A. E.** (2002); Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling; *Genetics*; 160(2); 393-405
209. **Viraben, R. and Aquilina, C.** (1998); Indinavir-associated lipodystrophy; *AIDS*; 12(6); F37-F39
210. **Walter, H., Schmidt, B., Korn, K., Vandamme, A. M., Harrer, T., and Uberla, K.** (1999); Rapid, phenotypic HIV-1 drug sensitivity assay for protease and reverse transcriptase inhibitors; *J.Clin.Virol.*; 13(1-2); 71-80
211. **Wang, W. K., Chen, M. Y., Chuang, C. Y., Jeang, K. T., and Huang, L. M.** (2000); Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1; *J.Microbiol.Immunol.Infect.*; 33(3); 131-140
212. **Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H. R., and Krausslich, H. G.** (1996); Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase; *Virology*; 219(1); 228-236
213. **Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y., and Taylor, S. S.** (1995); Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus; *Cell*; 82(3); 463-473
214. **Wensing, A. M. and Boucher, C. A.** (2003); Worldwide transmission of drug-resistant HIV; *AIDS Rev.*; 5(3); 140-155
215. **Wiegers, K., Rutter, G., Kottler, H., Tessmer, U., Hohenberg, H., and Krausslich, H. G.** (1998); Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites; *J.Virol.*; 72(4); 2846-2854
216. **Wilusz, C. J. and Wilusz, J.** (2004); Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus; *Trends Genet.*; 20(10); 491-497
-

217. **Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B. K., Baldwin, E., Weber, I. T., Selk, L. M., Clawson, L., Schneider, J., and Kent, S. B.** (1989); Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease; *Science*; 245(4918); 616-621
218. **Zuk, D. and Jacobson, A.** (1998); A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization; *EMBO J.*; 17(10); 2914-2925

10 Abkürzungen

%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immuno deficiency syndrom</i>
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ARC	<i>AIDS-related complex</i>
ARV	<i>AIDS-related virus</i>
as	<i>antisense</i>
AZT	Azidothymidin (Zidovudin)
BGH	<i>bovine growth hormone</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CA	Kapsidprotein
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CPRG	Chlorophenol-red-β-D-Galactopyranosid
CRM1	<i>chromosomal maintenance gene</i>
CRS	<i>cis acting repressive sequences</i>
CTE	<i>constitutive transport element</i>
Cy3	Carbocyanin 3
dATP	Deoxyadenosin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Deoxyguanosin-5'-Triphosphat
DHH	Deoxyhypusin-Hydroxylase
DHS	Deoxyhypusin-Synthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Deoxythymidin-5'-Triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
eIF-5A	eukaryotischer Initiationsfaktor 5A
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
env	<i>envelope</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	<i>early response gene</i>
EtBr	Ethidium Bromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fe	Eisen
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
gag	gruppenspezifische Antigene

Gal	Galactosidase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC7	N1-Guanyl-1,7-diaminoheptan
GC8	1,8-Diaminooctan
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GMCSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
gp	Glykoprotein
GPV	subgenomischer HIV-Vektor mit <i>gag-</i> , <i>pol-</i> , <i>vif-</i> , und <i>vpr-</i> Gen
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
HIV-1	humanes Immundefizienzvirus Typ 1
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HPI	Heinrich-Pette-Institut
HTLV III	humanes T-Zell Leukämie Virus III
HTLV	humanes T-Zell Leukämie Virus
IC	<i>inhibitory concentration</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin-2
IN	Integrase
INF	Interferon
INS	<i>instability repressive sequences</i>
IPG	immobilisierten pH-Gradient
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasenpaare
LAMP-1	<i>lysosome associated membrane protein-1</i>
LAS	Lymphadenopathisches Syndrom
LAV	Lymphadenopathie-assoziiertes Virus
LB	Luria-Bertani
LI	p6-Link-Protein
LPS	Lipopolysacchrid
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LUC	Luciferase
Lys	Lysin
M	Molar
MA	Matrix
mA	Milliamper
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
Mo-MLV	Moloney-Maus-Leukämie Virus
MOPS	(N-Morpholinol)-Propansulfonsäure
MPMV	Mason-Pfizer Affenvirus
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid

NC	Nukleokapsid
nef	<i>negative factor</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NKS	<i>newborn calf serum (NCS)</i>
nle	Norleucin
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer
NNRTIs	nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
NRTIs	nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRZ	Nationales Referenzzentrum
OD	optische Dichte
ODC	Ornithindecaboxylase
OL	oben links
OR	oben rechts
ORF	<i>open reading frame</i>
PA	Polyadenylierungs-Stelle
PAPT	Putrescin-Aminopropyl-Transferase
PB	Primer-Bindungsstelle
PBMCs	Periphere Blut Mononukleare Zellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Protease-Inhibitoren
PI	Propidiumiodid
PIC	Präintegrationskomplex
PID	Präintegrations DNA
pmol	Pikomol
pol	Polymerase
PP	Polypurintrakt
PR	Protease
R	<i>repeat</i>
RDP58	synthetisches Decapeptid
R5	Makrophagen-trophes HI-Virus
rev	<i>regulator of expression of virion proteins</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	<i>Rev response element</i>
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Reverse Transkriptase
RTC	Reverse-Transkriptase-Komplex
s	<i>sense</i>
SA	Spleißakzeptor
SAM486A	Dihydrochlorid-Salz-Monohydrat von 4-(Aminoiminomethylen)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one-diaminomethylenhydrazon
SAMDC	S-Adenosylmethionin-Decarboxylase
SAPT	Spermidin-Aminopropyl-Transferase
SD	Spleißdonor
SDS	<i>sodium-dodecyl-sulfat</i>

SEAP	<i>secreted alkaline phosphatase</i>
sec	Sekunde
SIV	Simian Immundefizienzvirus
SV	Simian-Virus
TAR	<i>trans-activation response</i>
tat	<i>transactivator of transcription</i>
TBS	<i>tris-buffered-saline</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TP	Transmembranprotein
U	<i>unique</i>
UKE	Uniklinikum Eppendorf
UL	unten links
UN	uninfiziert
Upm	Umdrehung pro Minute
UR	unten rechts
UV	ultraviolett
V	Volt
vif	<i>virion-infectivity-factor</i>
vpr	<i>viral protein r</i>
VSV-G	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus
X4	T-Zell-trophes HI-Virus
Zyto	Zytoplasma

11 Anhang

Publikation:

Birgit Schäfer, Ilona Hauber, Andrea Bunk, Jochen Heukeshoven, Arne Düsedau, Dorian Bevec, and Joachim Hauber (2006): Inhibition of HIV-1 by interference with cellular S-adenosylmethionine decarboxylase activity. Zur Publikation eingereicht.