

Funktionelle Charakterisierung neuer Leitstrukturen für die Antivirale Therapie

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

des Departments Chemie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Marcel Krepstakies
aus Elmshorn

Hamburg 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2005 bis Januar 2011 unter Anleitung von Prof. Joachim Hauber und Betreuung von Prof. Wolfgang Deppert im Heinrich-Pette-Institut – Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in der Abteilung Zellbiologie und Virologie angefertigt.

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert

2. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Joachim Hauber

Tag der mündlichen Prüfung: 11. März 2011

Meinen Eltern

Danksagung

An dieser Stelle ist es mir wichtig, mich ausdrücklich bei allen Personen zu bedanken, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Joachim Hauber für die Möglichkeit meine Dissertation in der Abteilung Zellbiologie und Virologie des HPI anfertigen zu können. Danke für die Unterstützung und Förderung während dieser Zeit und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen. In zahlreichen Diskussionen konnte ich große Einsicht in wissenschaftliche Denk- und Arbeitsweisen erlangen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Wolfgang Deppert für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit seitens des Departments Chemie der Universität Hamburg.

Ohne Prof. Dr. Klaus Brandenburg wäre das Peptidprojekt nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die vertrauensvolle, anregende und fruchtbare fachübergreifende Kooperation. Vielen Dank an Barbara Holstermann und Dr. Heinrich Hohenberg für die freundliche und spannende Zusammenarbeit bei der Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Frau Prof. Ulrike Holzgrabe und Dr. Tim Göbel danke ich für die Überlassung der untersuchten DOHH-Inhibitoren ebenso wie den Mitgliedern des Konsortiums „Combating Drug Resistance“ für ihre Zusammenarbeit. Hier danke ich insbesondere Marcus Schröder und Prof. Dr. Chris Meier für die rasche Synthese der getesteten DHS-Verbindungen. Frau Prof. Dr. Kaiser danke ich für die Möglichkeit den DOHH-Assay in ihren Laboren durchführen zu dürfen und für die zahlreichen ausführlichen Gespräche.

Bei der gesamten Abteilung 4 und der HIV-Gruppe des UKE bedanke ich mich für die heitere familiäre Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Das war eine tolle Zeit und ich habe mich bei Euch immer sehr wohl gefühlt. Andrea Lindner, Niklas Beschorner und Britta Weseloh danke ich für ihre ständige und umsichtige Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Bettina Abel für die sorgfältige Anfertigung der zahlreichen *Realtime* PCRs. Von der langjährigen Erfahrung von Dr. Ilona Hauber habe ich sehr profitiert. Herzlichen Dank für die zahlreichen Tipps, Tricks und Ideen. Dr. Jan Chemnitz, Dr. Helga Hofmann-Sieber und Dr. Claus-Henning Nagel danke ich vielmals für die ständige Diskussionsbereitschaft und den kreativen und kompetenten Rat. Ein besonders großer Dank gilt Dr. Dirk Hoffmann, Cordula Grüttner und Dorothea Pieper für viele lustige und auch manche ernste Gespräche und die schöne gemeinsame Zeit. Dr. Susann Schirmer danke ich sehr für die kritische und sehr konstruktive Durchsicht dieser Arbeit und für die schöne Zeit in der Bötelkamp-WG.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie bedanken, für ihre bedingungslose Unterstützung, das grenzenlose Vertrauen und den immerwährenden Glauben an mich.

Carina, Danke für den großen Rückhalt. Du machst mich so glücklich!

Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Summary.....	3
3	Einleitung.....	5
3.1	Das Humane Immundefizienz Virus	5
3.1.1	Morphologie	5
3.1.2	Replikation.....	7
3.1.3	Eintritt des Virions in die Zelle.....	9
3.1.4	Regulation des Exportes viraler RNA aus dem Zellkern	10
3.1.5	Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A).....	11
3.1.6	Die Deoxyhypusinsynthase (DHS).....	12
3.1.7	Die Deoxyhypusinhydroxylase (DOHH)	12
3.1.8	AIDS und Antiretrovirale Therapie	13
3.2	Das Herpes Simplex Virus.....	17
3.2.1	Morphologie und Replikation.....	18
3.2.2	Eintritt des Viruspartikels in die Wirtszelle	20
3.2.3	Therapie.....	21
3.3	Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit	22
4	Material	24
4.1	Bakterienstämme	24
4.2	Eukaryotische Zelllinien	24
4.3	Viren	25
4.3.1	Humane Immundefizienz Viren	25
4.3.2	Herpes Simplex Viren	25
4.4	Medien.....	25
4.4.1	Medien für die Anzucht von Bakterien.....	25
4.4.2	Medien für Kultivierung von eukaryotischen Zellen	25
4.4.3	Medienzusätze	26
4.5	Oligonukleotide	26
4.6	Radioaktivität.....	27
4.7	Expressionsplasmide.....	28
4.8	Enzyme	29
4.8.1	Restriktionsnukleasen/Puffer.....	29
4.8.2	Sonstige Enzyme.....	29
4.9	Inhibitoren	29
4.10	Antikörper.....	29
4.10.1	Primärantikörper	29
4.10.2	Sekundärantikörper.....	29

4.11	Reagenssysteme	30
4.12	Chemikalien	31
4.13	Verbrauchsmaterialien	33
4.14	Lösungen und Puffer	33
5	Methoden	35
5.1	Molekularbiologische Methoden.....	35
5.1.1	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien zur Transformation	35
5.1.2	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	35
5.1.3	Kultivierung von Bakterien zur Plasmidisolierung.....	35
5.1.4	DNA-Standardmethoden.....	36
5.1.5	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	36
5.1.6	Isolierung von RNA	36
5.1.7	Isolierung von genomischer DNA	37
5.1.8	Reverse Transkription von mRNA.....	37
5.1.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	37
5.1.10	Semiquantitative <i>nested</i> -PCR	38
5.1.11	Quantitative <i>Realtime</i> PCR	39
5.1.12	Herstellung von pSUPER Konstrukten für die RNA Interferenz (RNAi)	40
5.1.13	Generierung von pSilencer Konstrukten für die RNAi.....	40
5.1.14	Konstruktion von lentiviralen shRNA-Vektoren	40
5.1.15	Konstruktion von lentiviralen miRNA-Vektoren.....	41
5.1.16	Generierung eines DOHH-Expressionsvektors	41
5.2	Zellbiologische Methoden.....	41
5.2.1	Kultivierung von Suspensionszellen	41
5.2.2	Kultivierung von adhärenenten Zellen	42
5.2.3	Isolierung und Kultivierung von PBMCs (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)	42
5.2.4	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen.....	42
5.2.5	Transfektion von 293T Zellen mit PEI.....	42
5.2.6	Transfektion von HeLa Zellen mit TurboFect oder TransIT	43
5.2.7	Transfektion von siRNA und esiRNA in HeLa Zellen mit Lipofectamin 2000.....	43
5.2.8	Zell-Zell-Fusionsanalyse.....	43
5.2.9	AlamarBlue/MTT Viabilitätsassay.....	44
5.2.10	FACS-basierte Zell-Zyklus-Analyse.....	44
5.2.11	FACS-basierte Apoptose-Untersuchung.....	44
5.2.12	p24-ELISA.....	45
5.2.13	CAT-ELISA.....	46
5.2.14	SEAP-Reporterassay	46
5.2.15	β -Galaktosidaseassay	46
5.2.16	Luciferaseassay.....	46
5.3	Biochemische Methoden	47
5.3.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten.....	47
5.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	47
5.3.3	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	47
5.3.4	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	47
5.3.5	Westernblot.....	47
5.3.6	Affinitätschromatographische Aufreinigung eines Antikörpers gegen humane DOHH	48
5.3.7	Expression und Aufreinigung von humanem eIF-5A	48

5.3.8	Expression und Aufreinigung von humaner DHS	49
5.3.9	Expression und Aufreinigung von humaner DOHH	50
5.3.10	DHS Aktivitätsassay	50
5.3.11	DOHH Aktivitätsassay	51
5.4	Mikroskopie	52
5.4.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	52
5.4.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	52
5.5	Virologische Methoden.....	53
5.5.1	Produktion von HIV-1 Partikeln.....	53
5.5.2	Produktion von pseudotypisierten retroviralen Partikeln	53
5.5.3	Infektion adhärenter und Suspensionszelllinien mit HIV-1	53
5.5.4	Transduktion von adhärenten Zelllinien mit lentiviralen Vektoren	54
5.5.5	Luciferase-Reporter Infektionsassay	54
5.5.6	HIV-1 Anheftungsassay.....	54
5.5.7	Produktion von HSV-1 und HSV-2 Partikeln	54
5.5.8	Bestimmung von HSV Plaque-Titern	55
5.5.9	Produktion von tritiierten HSV-1 Partikeln.....	55
5.5.10	Infektion von Vero Zellen mit HSV-1 und HSV-2	55
5.5.11	HSV-1 Anheftungs- und Eintrittsassay.....	56
6	Ergebnisse	57
6.1	Inhibition der Hypusin-Modifikation von eIF-5A	57
6.1.1	Inhibition der Hydroxylierung von Deoxyhypusin-modifiziertem eIF-5A.....	57
6.1.2	Inhibition der humanen DHS mit niedermolekularen Verbindungen	76
6.2	Synthetische antimikrobielle Peptide als Inhibitoren der HIV und HSV Replikation	85
6.2.1	Analyse der zellulären Toxizität.....	86
6.2.2	Inhibition der HIV-1 Replikation	89
6.2.3	Lokalisation der SALP.....	97
6.2.4	Inhibition der HSV-1 und HSV-2-Infektion.....	102
7	Diskussion	107
7.1	Inhibition der Hypusin-Modifikation von eIF-5A	107
7.1.1	Inhibition der humanen DOHH durch niedermolekulare Verbindungen	109
7.1.2	Inhibition der humanen DOHH durch RNA Interferenz.....	111
7.1.3	Inhibition der humanen DHS mit niedermolekularen Verbindungen	112
7.2	Synthetische antimikrobielle Peptide als Inhibitoren der Replikation von HIV und HSV.....	115
8	Abkürzungsverzeichnis.....	123
9	Literatur	125
	Gefahrenstoffe.....	141
	Publikationen.....	142
	Eidesstattliche Erklärung.....	143

1 Zusammenfassung

Die Bekämpfung viraler Infektionen stellt durch das schnelle Auftreten Medikamenten-resistenter Virusvarianten eine immer neue Herausforderung an die Entwicklung neuartiger Inhibitoren und Inhibitionsstrategien dar. Dies gilt insbesondere für Erreger, wie das humane Immundefizienz Virus (HIV), die durch eine hohe Mutationsrate charakterisiert sind. Eine der häufigsten Behandlungsstrategien zielt auf die spezifische Hemmung viruseigener Enzyme ab, die keine zellulären Homologe besitzen und somit hochspezifisch inhibiert werden können. Allerdings können hier bereits einzelne Punktmutationen ausreichen, um dem HI-Virus eine Resistenz zu verleihen. Ein neuer innovativer Ansatz beruht deshalb auf der Hemmung von Wirtszellproteinen, die für die Virusreplikation essenziell sind. Einem derartigen indirekten Eingriff in ihren Lebenszyklus können sich Viren weitaus schwerer entziehen. Hier besteht die besondere Herausforderung darin, eine inhibitorische Wirkung zu erreichen und gleichzeitig zelltoxische Effekte im Wirt zu vermeiden.

Die Nutzung entsprechender zellulärer Zielstrukturen als Angriffspunkte für neue Therapieansätze ist das zentrale Thema der hier vorliegenden Arbeit. So wurden zum Einen potenzielle Inhibitoren der Aktivierung des zellulären HIV-1 Kofaktors eIF-5A untersucht, zum Anderen wurden neue synthetische Peptide identifiziert, die eine antivirale Aktivität bei Infektionen mit HIV-1 und Herpes Simplex Viren (HSV) aufweisen. Schließlich wurden Untersuchungen zum Wirkmechanismus dieser Inhibitoren durchgeführt.

Der aktivierte eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) ist ein für die HIV-1 Replikation essenzielles zelluläres Protein, welches als Kofaktor des viralen Rev Regulatorproteins für die nukleozytoplasmatische Translokation intronhaltiger viraler mRNA benötigt wird. Als bisher einziges Säugerzellprotein enthält eIF-5A in seiner aktiven Form die außergewöhnliche Aminosäure Hypusin. Es handelt sich hierbei um die Modifikation eines Lysinrestes, die hochspezifisch in zwei aufeinander folgenden enzymatisch katalysierten Schritten erfolgt. Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass eine Hemmung der hierfür verantwortlichen Enzyme Deoxyhypusinsynthase (DHS) oder Deoxyhypusinhydroxylase (DOHH) zu einer effizienten Hemmung der HIV-1 Replikation führt. Bislang verwendete Inhibitoren der DOHH zeigten jedoch toxische Nebenwirkungen. Die DOHH wurde dabei ausschließlich mit unspezifischen Eisenchelatoren inhibiert, wobei kein Effekt auf den Rev-vermittelten RNA-Transport nachgewiesen werden konnte. Für die DHS-Inhibitoren wurde dagegen eine Hemmung des mRNA Transports über den von Rev frequentierten CRM1 Kernexportweg beschrieben, was dieses Enzym zu einem attraktiven Zielprotein für neue Inhibitoren machte.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden deshalb sieben neue potenzielle DOHH-Hemmstoffe hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität untersucht, deren Struktur sich an den bekannten Inhibitoren orientierte.

Eine der Verbindungen, JK8-2, hemmte die HIV-1 Replikation zu über 70%. Funktionelle Studien zeigten jedoch keinen Einfluss von JK8-2 auf die Rev-Funktion und ebenso keine Spezifität für die DOHH. Durch weiterführende Untersuchungen konnte der Wirkmechanismus einem inhibitorischen Effekt vor oder während der Provirusintegration zugeordnet werden.

Durch den Einsatz von RNA-Interferenz (RNAi) sollte anschließend geklärt werden, ob der durch die DOHH katalysierte zweite Schritt der Hypusinmodifikation tatsächlich essenziell für die Rev-Funktion ist. Mit Hilfe zahlreicher RNAi-Methoden konnte in stabilen DOHH *knockdown* Zellen die DOHH-Proteinmenge um 70% vermindert werden. Funktionelle Untersuchungen zeigten aber weder einen Einfluss auf Rev, noch auf die Replikation von HIV-1. Die DOHH-Reaktion ist demnach entweder nicht essenziell für die HIV-Replikation oder die nach dem *knockdown* verbleibende Proteinmenge immer noch ausreichend für die Rev-Funktion.

Auf der Suche nach neuen Inhibitoren der DHS wurden sechs Verbindungen analysiert, die strukturelle Ähnlichkeiten mit dem DHS-Substrat Spermidin aufweisen. Von den getesteten Verbindungen zeigte ein Wirkstoff, der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI, eine ausgeprägte antivirale Wirkung in HIV-1 infizierten Zellen, ohne deren allgemeinen Metabolismus, Zellzyklus oder Apoptoseverhalten zu beeinflussen. Die Spezifität für DHS war verglichen mit dem bekannten Inhibitor CNI-1493 jedoch schwach und ein Einfluss auf die Rev-Funktion nicht nachweisbar.

Das HI-Virus wird meist beim ungeschützten Geschlechtsverkehr übertragen und infiziert Leukozyten. Die Infektion schwächt das Immunsystem bis es zum Ausbruch von AIDS und zum Tod durch opportunistische Erkrankungen kommt. Zu solchen opportunistischen Erregern zählen die weit verbreiteten Herpes Simplex Viren (HSV), welche ebenfalls sexuell übertragen werden können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde für die ursprünglich als Inhibitoren der bakteriellen Sepsis beschriebenen SALP (*synthetic anti-lipopolysaccharide peptides*) auch eine ausgeprägte antivirale Wirkung, sowohl in der HIV-1 Infektion als auch bei der Infektion mit HSV nachgewiesen, ohne toxisch auf die Zellen zu wirken. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Behandlung von Zellen mit den kationischen Peptiden die initiale Bindung von Viruspartikel und Zielzelle effizient hemmt. Durch konfokal- und elektronenmikroskopische Untersuchungen, sowie Isothermalen Titrationskalorimetriemessungen wurde auf der Zelloberfläche ubiquitär exprimiertes Heparansulfat als SALP-Bindungspartner identifiziert. Heparansulfat wird als universeller zellulärer Anheftungspartner von vielen Pathogenen genutzt. Somit stellen SALP vielversprechende Kandidaten als Komponente von topisch applizierten Breitband-Mikrobiziden zur Verhinderung von sexuell übertragbaren Virusinfektionen dar.

2 Summary

Due to the ongoing occurrence of drug-resistant virus variants the development of novel inhibitors and therapeutic strategies is a major challenge in current biomedical research. This is particularly true in case of rapidly mutating pathogens, like the human immunodeficiency virus (HIV). One of the most common treatment strategies aims at the direct inhibition of viral enzymes lacking a cellular homologue, which allows highly specific suppression of virus replication. However, single point mutations are sufficient to confer drug-resistance to HIV. A new innovative approach relies on the pharmacological interference with cellular proteins that are essential for virus replication, since such an intervention strategy may be more difficult to be overcome by viruses. The particular challenge herein lies in the achievement of an inhibitory effect in absence of cellular toxicities. Such new therapeutic approaches, which are based on cellular target structures, are the central subject of this thesis. Thus, potential inhibitors for the activation of the cellular HIV-1 cofactor eIF-5A were analyzed and new synthetic peptides were identified as potential inhibitors of HIV-1 and herpes simplex virus (HSV). Furthermore, their antiviral mechanism of action was characterized in detail.

The activated eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) is a cellular protein that is essential for HIV-1 replication. This cellular factor serves as a cofactor of the viral Rev-protein that mediates the nucleocytoplasmic translocation of intron-containing viral mRNA. In its active form eIF-5A is the only cellular protein containing the unusual amino acid hypusine, a modification of a specific lysine residue that is catalyzed in a highly specific manner by two succeeding enzymatic reactions. It has been shown that the inhibition of either of the two responsible enzymes, deoxyhypusine synthase (DHS) and deoxyhypusine hydroxylase (DOHH), leads to an efficient block in HIV-1 replication. However, the DOHH inhibitors described so far demonstrated significant cell-toxic effects. Furthermore, in these former studies DOHH could only be inhibited by unspecific iron-chelators, whereupon no evidence for an influence of Rev-mediated mRNA transport was demonstrated. In contrast, DHS-inhibitors have been reported to prevent HIV Rev-mediated mRNA transport via the CRM1 nuclear export pathway. This observation renders DHS an attractive target for a new class of antiviral inhibitors.

Hence, in this thesis work the antiviral activity of seven new potential anti-DOHH compounds was examined. One of these compounds, JK8-2, indeed inhibited HIV-1 replication by more than 70%. However, subsequent functional studies showed no influence of JK8-2 on Rev-function, as well as no specificity for DOHH. The examination of its mode of action revealed an activity during or before chromosomal integration of the HIV provirus.

Subsequently, RNA interference (RNAi) technology was applied to clarify whether or not the DOHH-catalyzed step in hypusine modification of eIF-5A is essential for Rev activity. By means of various RNAi methods stable cell lines were established in which the endogenous DOHH level was knocked down by 70%. However, subsequent functional analyses revealed that neither an influence on Rev-activity, nor on HIV-1 replication was detectable in these cells. Therefore, the DOHH-reaction is either not essential for HIV-replication or the remaining protein level after DOHH silencing was still sufficient for Rev-function.

In search of new DHS inhibitors six compounds have been analyzed, featuring structural similarity with the natural DHS substrate spermidine. Of these one compound, the DNA intercalating fluorescence dye DAPI exhibited a pronounced antiviral effect in HIV-1 infected cell cultures, without negatively affecting cell metabolism, cell cycle progression or apoptosis. However, when compared to the established DHS inhibitor CNI-1493, its specificity towards DHS was rather low and an impact on Rev-activity was not detectable.

Globally, HIV is mostly transmitted during unprotected sexual intercourse. Over time, the infection weakens the immune system leading to AIDS, which is followed by death due to various opportunistic infections. Those opportunistic pathogens include the wide spread herpes simplex viruses (HSV), which can also be transmitted sexually.

In the second part of this work it was demonstrated that synthetic anti-lipopolysaccharide peptides (SALP), initially described as inhibitors of bacterial sepsis, are efficient inhibitors of HIV-1 and HSV without causing any detectable cellular toxicities. Furthermore it was shown that treatment of cells with these cationic peptides prevents the binding of viral particles to target cells. By employing confocal and electron microscopy, as well as isothermal titration calorimetry measurements, it was demonstrated that SALP bind to heparan sulfate, which is ubiquitously expressed on cell surfaces. Importantly, heparan sulfate is utilized as a primary cellular attachment site by many pathogens, including HIV and HSV. Therefore, SALP may be exploited as valuable components of topically applied broad-spectrum microbicides for prevention of sexually transmitted virus infections.

3 Einleitung

Im Jahre 1982 erschienen mehrere Berichte der *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, USA) über eine erworbene Immunschwäche-Erkrankung (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*, AIDS), die sich seit Ende 1979 in sechs Metropolregionen an Ost- und Westküste der USA ausbreitete (Center of Disease Control, 1982). Bei sämtlichen Betroffenen wurden schwere opportunistische Infektionen wie Pneumocystis-Pneumonie oder Kaposi-Sarkome festgestellt, die normalerweise in Patienten mit geschwächtem Immunsystem auftreten. Die Rate der Neuerkrankungen verdoppelte sich in diesem Zeitraum alle sechs Monate mit einer Mortalität von über 60% nach nur einem Jahr. Das Phänomen trat zu 75% bei homo- und bisexuellen Männern, zu 13% bei Abhängigen intravenös verabreichter Drogen, zu 6% bei Haitianern und zu 0,3% bei an Hämophilie A erkrankten Menschen auf.

Bei der Suche nach der Ursache für dieses ungewöhnlich häufige und sich schnell verbreitende Krankheitsbild konnten die Gruppen um Luc Montagnier und Robert Gallo annähernd zeitgleich ein T-Zell-lymphotropes Retrovirus aus AIDS-Patienten isolieren (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983). Gallo hielt es zunächst fälschlicherweise für eine Variante des von ihm 1980 entdeckten ersten humanpathogenen Retrovirus, dem Humanen T-Zell Leukämie Virus, HTLV (Poiesz et al., 1980). In den folgenden Jahren wurde das Virus auch als Lymphadenopathie-assoziiertes Virus, LAV (Montagnier et al., 1984), und AIDS-assoziiertes Retrovirus, ARV (Levy et al., 1984), bezeichnet, bevor das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) 1986 die Bezeichnung Humanes Immundefizienz Virus, HIV, empfahl (Coffin et al., 1986).

3.1 Das Humane Immundefizienz Virus

Das HI-Virus gehört innerhalb der Familie der *Retroviridae* zur Gattung der Lentiviren. Retroviren verdanken ihren Namen der charakteristischen Eigenschaft, dass sie ihr als RNA vorliegendes Genom mit Hilfe der ihnen eigenen Reversen Transkriptase entgegen des üblichen genetischen Informationsflusses (retrograd) in DNA übersetzen. Das Wort Lentivirus leitet sich vom lateinischen *lentus* (langsam) ab, da die Vertreter dieser Gattung langsam fortschreitende, chronisch degenerative Krankheiten auslösen (Stowring et al., 1979). Daneben gehören zwei weitere Gattungen zur Familie der *Retroviridae*, die Onkoretroviren (α , β , γ , δ und ϵ -Retroviren) und die Spumaviren.

3.1.1 Morphologie

Das HI-Virion weist einen Durchmesser von etwa 100 nm auf. Die äußere Hülle besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, die von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abstammt. In der Hüllmembran ist das transmembrane Glykoprotein gp41 verankert, das nicht-kovalent an das externe

stark glykosylierte Hüllprotein gp120 gebunden ist (Abbildung 1). Die Innenseite der Hüllmembran ist mit Matrixproteinen (p17) bedeckt, welche über N-terminale Myristylanker an die Hüllmembran gebunden sind. Die Matrix ist über das p6 Linkerprotein mit dem charakteristisch konisch geformten Viruskapsid verbunden, das sich aus p24 Kapsidproteinen (CA) zusammensetzt. Das Viruskapsid enthält zwei Kopien des einzelsträngigen viralen RNA Genoms, an welches Nukleokapsidproteine (NC, p7) assoziiert sind. Zusätzlich enthält das Viruskapsid die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Außerhalb des Kapsids befindet sich die HIV Protease (PR). Ebenfalls in das Virion verpackt werden die akzessorischen Proteine Vpr (*viral protein r*), Vif (*viral infectivity factor*) und Nef (*negative factor*) (Cimarelli und Darlix, 2002).

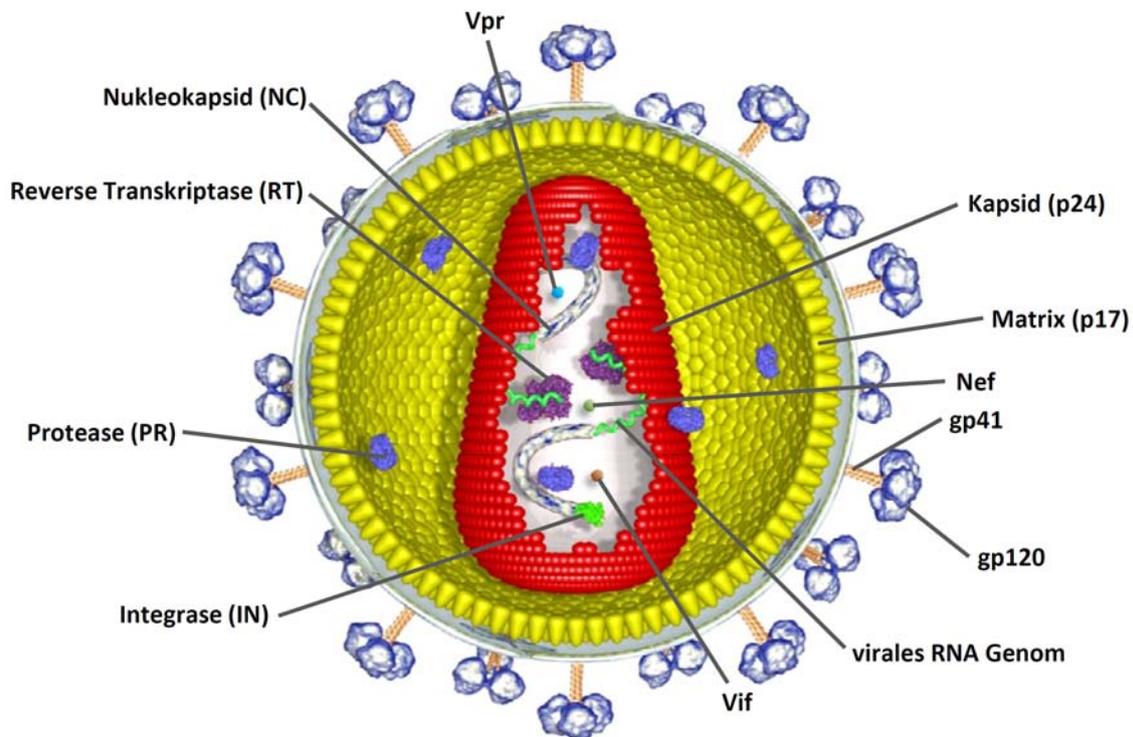


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines HI-Virus (leicht verändert mit freundlicher Genehmigung von Danilo Dubrau, MSc).

Das einzelsträngige RNA Genom besitzt eine positive Polarität und hat eine Länge von 9 kb (Abbildung 2). Wie auch eukaryotische mRNA enthält es eine 5'-Cap-Struktur sowie ein polyadenyliertes 3'-Ende. Der kodierende Bereich des HIV Genoms wird von regulatorischen Sequenzen flankiert. So befindet sich zwischen Cap und dem Startcodon die repetitive R-Region, in der die TAR-Sequenz (*Tat-responsive RNA element*) und das Polyadenylierungssignal enthalten sind. An das TAR-Element bindet der virale Transaktivator der Transkription, Tat, was zu einer erheblichen Verstärkung der Transkription führt (Cullen, 1986; Kao et al., 1987). Die Sequenz der R-Region wiederholt sich am 3'-Ende des Genoms unmittelbar vor der Poly-A-Sequenz. Im Anschluss an die R-Region folgt der untranslatierte U5 Bereich und die Primerbindungsstelle (PB), an die eine für die

Initiation der reversen Transkription essenzielle tRNA mit Spezifität für Lysin hybridisiert ist (Wain-Hobson et al., 1985). Noch vor dem Startcodon des *gag*-Leserahmens folgt das Verpackungs- oder Ψ -Signal, welches für die Dimerisierung des viralen Genoms und dessen Verpackung in virale Partikel notwendig ist (Lever et al., 1989). Stromabwärts des kodierenden Bereichs befindet sich der Polypurintrakt (PPT), auf den der untranslatierte U3 Bereich folgt. Bei der reversen Transkription werden U3, R und U5 Bereich dupliziert. Sie flankieren das Provirus und werden daher als *long terminal repeats* (LTR) bezeichnet.

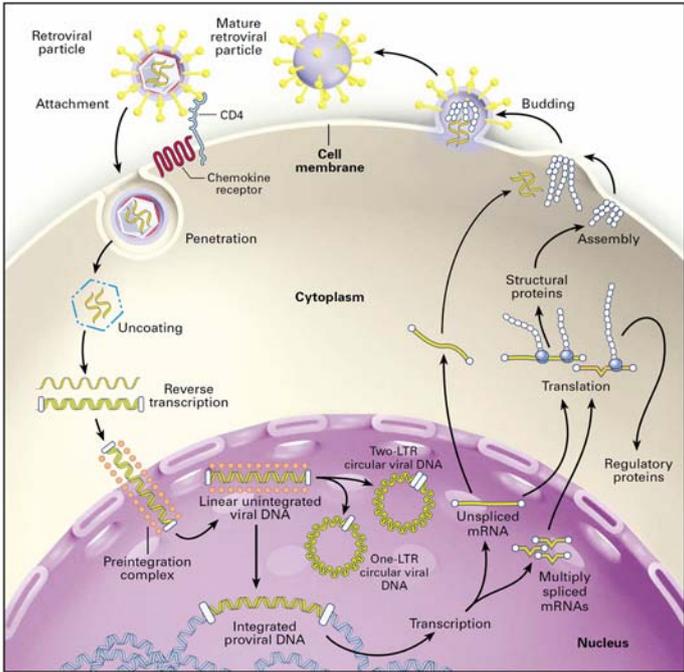
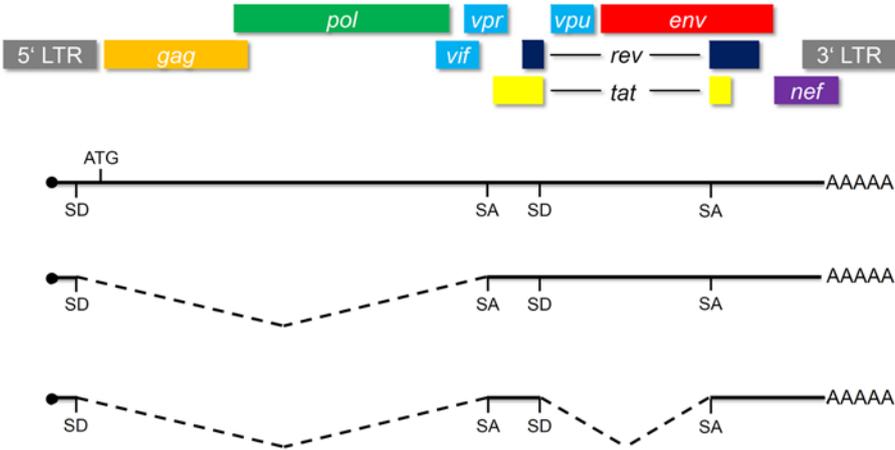


Abbildung 2: Genomorganisation (oben) und Lebenszyklus des HI-Virus (unten, aus Furtado et al., 1999).

3.1.2 Replikation

Der HIV Replikationszyklus beginnt mit der Bindung des gp120 Hüllproteins an den primären CD4-Rezeptor auf Zielzellen wie Makrophagen oder T-Helferzellen (Klatzmann et al., 1984). Und

anschließend an einen der beiden Chemokinkorezeptoren CCR5 oder CXCR4 (Deng et al., 1996; Doranz et al., 1996). Nach der Bindung des Korezeptors wird die Fusion mit der Plasmamembran der Zielzelle eingeleitet, worauf das Viruskapsid in die Zelle gelangt und dort dissoziiert. Daraufhin kommt es zur Bildung des Reverse-Transkriptase-Komplexes (RTC), in dem die reverse Transkription der viralen ssRNA in dsDNA erfolgt. Aus Matrixproteinen, Integrase, Vpr und dem dsDNA Genom bildet sich anschließend der Präintegrationskomplex (PIC), der über die Kernlokalisierungssignale der Matrixproteine und der Integrase in den Kern importiert wird (Sherman und Greene, 2002). Der aktive Kernimport der viralen cDNA ermöglicht es somit Lentiviren, im Gegensatz zu Onkoretroviren, auch ruhende Zellen zu infizieren. Die Integrase inseriert die provirale dsDNA anschließend in das Wirtszellgenom, präferenziell in die Nähe aktiver Genbereiche. Mehrere Berichte deuten darauf hin, dass die Transkription der viralen Gene bereits vor der Integration des Provirus stattfinden kann (Stevenson et al., 1990). Die Transkription ist zu Beginn, in Abwesenheit von viralem Tat, stark attenuiert und erfolgt lediglich auf basalem Niveau. Die vollständig gespleißten Primärtranskripte kodieren für die regulatorischen Proteine Tat und Rev sowie für Nef (Robert-Guroff et al., 1990). Durch Bindung von Tat an das TAR-Element und die darauffolgende Rekrutierung zellulärer Faktoren wird die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II phosphoryliert, wodurch ihre Prozessivität stark erhöht und die Attenuation aufgehoben wird (Parada und Roeder, 1996).

Das Regulatorprotein Rev (*regulator of expression of virion proteins*) vermittelt den Kernexport nicht oder unvollständig gespleißter viraler mRNA. Die ungespleißte virale RNA wird einerseits als Genom in neu entstehende Viruspartikel verpackt, kodiert aber auch für das strukturelle Gag-Vorläuferprotein p55^{Gag} sowie für die viralen Enzyme (*pol*) Protease, Reverse Transkriptase und Integrase. Dabei überlappt der offene Leserahmen des *gag*-Gens mit dem des *pol*-Gens derart, dass letzteres nur durch einen Wechsel des ribosomalen Leserasters translatiert werden kann. Dieser Wechsel wird durch eine uridinreiche Sequenz im NC-Bereich vermittelt und ereignet sich bei ca. 5% der Translationsereignisse. Hierdurch wird das *gag*-Stopcodon überlesen und das Gag-Pol Vorläuferprotein p160^{gag/pol} gebildet. Kotranslational wird der N-Terminus der Gag und Gag-Pol Vorläuferproteine myristyliert und kann sich so an die Zellmembran anheften. Der Nukleokapsidteil von p55^{Gag} bindet im Zytoplasma zwei Kopien genomischer viraler RNA über das Verpackungssignal Ψ .

Einfach gespleißte Transkripte kodieren für das Vorläuferprotein der Hüllproteine gp160^{Env} sowie für die akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Vpu (*viral protein u*). Nach der Translation am rauen Endoplasmatischen Retikulum wird gp160^{Env} im Golgi-Apparat glykosyliert und während des Transportes zur Zellmembran durch eine zelluläre Furinprotease in gp120 und gp41 gespalten. An der Zellmembran führt die Akkumulation von Gag und Hüllproteinen zur Knospung und letztendlich zur

Abschnürung von Viruspartikeln. Die Reifung zu infektiösen Viren erfolgt schließlich infolge der Spaltung von Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteinen durch die virale Protease.

3.1.3 Eintritt des Virions in die Zelle

Die Infektion einer Zelle durch das HI-Virus stellt einen komplexen Prozess dar, an dem mehrere virale und zelluläre Komponenten beteiligt sind. Um eine Zelle zu infizieren, müssen die Membranen von HI-Virus und Wirtszelle fusionieren (Stein et al., 1987). Dies wird durch eine gerichtete Sequenz von Bindungs- und Konformationsänderungsereignissen des viralen Hüllproteins Env vermittelt, das in Form von Heterotrimeren auf der Virusoberfläche vorliegt (Weiss et al., 1990; Chan et al., 1997). Jede Untereinheit des Env-Proteins besteht aus einem gp120 Oberflächenprotein (SU), das die Bindung zu dem zellulären Rezeptor vermittelt und einem nicht-kovalent assoziierten gp41 Transmembranprotein (TM), das an seinem N-Terminus ein hydrophobes Fusionspeptid besitzt (Wyatt und Sodroski, 1998). Aus Sequenzvergleichen verschiedener Virusisolate ergab sich eine Unterteilung des gp120 Proteins in fünf konstante (C1 – C5) und fünf variable Domänen (V1 – V5), wobei die variablen Bereiche durch Disulfidbrücken verknüpfte Schleifen ausbilden, die für die Interaktion mit den zellulären Rezeptoren verantwortlich sind (Modrow et al., 1987).

Primärrezeptor für die Bindung der HIV Partikel an die Zelle ist das glykosylierte Oberflächenmolekül CD4, das auf T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Es gehört zur Familie der Immunglobuline und bindet zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor MHC-Klasse II-Antigen-Komplexe auf Antigen präsentierenden Zellen. Erste Kristallstrukturen eines gp120-CD4-Komplexes (Kwong et al., 1998) zeigten, dass CD4 mit seinem N-Terminus in einer Bindungstasche von gp120 bindet. Dies hat zur Folge, dass sich die gp120 Monomere um 45° drehen und sich zudem um 15° nach außen neigen (Liu et al., 2008), wobei der für die Korezeptorerkennung essenzielle *V3-loop* exponiert wird (Rizzuto et al., 1998). Je nach Tropismus des HI-Virus weist der *V3-loop* eine Affinität für einen der beiden Chemokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4 auf. Isolate mit Affinität für CCR5 werden als Makrophagentrop (M- oder R5-trop) bezeichnet, wohingegen T-Zell-trope (T- oder X4-trop) Virusvarianten CXCR4 als Korezeptor nutzen (Berger et al., 1999).

Nach der Bindung von CD4 erfolgt ebenfalls eine Umlagerung des gp41 Proteins. Dabei bildet sich aus den drei Monomeren eine Triple-Helix, an deren Ende sich das hydrophobe Fusionspeptid befindet. Nach der Korezeptorbindung wird dieses in die Zellmembran inseriert, was eine weitere Umlagerung zu einem 6-Helix-Bündel zur Folge hat (Melikyan et al., 2000). Hierdurch werden Virus- und Zellmembran einander angenähert und fusionieren zunächst miteinander, bevor sich schließlich eine Membranpore bildet, durch die der Inhalt des Viruspartikels in die Zelle gelangt.

Bevor die spezifische Interaktion zwischen gp120 und CD4 die HIV-Partikel fest an die Zelle bindet, finden weniger spezifische Adsorptions- und Anheftungsereignisse zwischen Virion und Zelloberfläche statt, die jedoch einen Einfluss auf die Infektiosität haben. Dabei interagieren positiv geladene Regionen im gp120 *V3-loop* (Demaria und Bushkin, 1996), in der Korezeptorinteraktionsdomäne (Vives et al., 2005; Crublet et al., 2008) sowie in der Fusionsdomäne von gp41 (Cladera et al., 2001) elektrostatisch mit dem negativ geladenen Glykosaminoglykan Heparansulfat (Callahan et al., 1991; Mondor et al., 1998; Moulard et al., 2000). Heparansulfat ist kovalent an zelluläre Oberflächenproteine gebunden, die als Heparansulfat Proteoglykane (HSPG) bezeichnet werden. HSPG stellen Rezeptoren für verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren dar, werden aber auch von vielen Pathogenen als Primärrezeptoren verwendet (Wadstrom und Ljungh, 1999; Spillmann, 2001).

3.1.4 Regulation des Exportes viraler RNA aus dem Zellkern

Für die HIV-Replikation ist der Transport intronhaltiger viraler mRNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma essenziell, da unvollständig oder nicht gespleißte Transkripte für strukturelle Virusproteine, Hüllproteine und für die viralen Enzyme kodieren. Der Kernexport dieser RNA-Spezies wird durch das regulatorische Protein Rev vermittelt. Rev enthält sowohl eine argininreiche Sequenz, die als Kernlokalisierungssignal (NLS) und RNA-Bindedomäne (RBD) fungiert (Hope et al., 1990), als auch ein leuzinreiches hydrophobes Kernexportsignal (NES), wodurch ein *Shuttling* zwischen Kern und Zytoplasma ermöglicht wird (Meyer und Malim, 1994; Kalland et al., 1994). Das NLS wird von zwei Multimerisierungsdomänen flankiert, die es Rev gestatten, die für die biologische Aktivität wesentlichen Multimere zu bilden (Olsen et al., 1990; Malim und Cullen, 1991). Durch Bindung einer *cis*-aktiven Sekundärstruktur auf der viralen mRNA im Bereich des *env* Gens, dem RRE (*Rev response element*, Malim et al., 1989), vermittelt Rev die nukleozytoplasmatische Translokation der viralen mRNA über den CRM1 (*chromosomal maintenance gene*, Exportin1) Kernexportweg (Fischer et al., 1995; Bogerd et al., 1998).

Hierfür bindet zunächst ein Rev-Molekül an die primäre Bindungsstelle, den *stem-loop* IIb des hochstrukturierten RRE und rekrutiert sukzessive weitere Rev Moleküle, die sich ebenfalls an das RRE anlagern, was zur Bildung des funktionellen Rev-Multimers führt. Über das Kernexportsignal rekrutiert Rev den Exportfaktor CRM1 unter Beteiligung des Transportfaktors RanGTP und weiterer zellulärer Kofaktoren. Dieser Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex transloziert über eine CRM1-vermittelte Interaktion mit Komponenten des Kernporenkomplexes in das Zytoplasma. Durch Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP zerfällt der RNP-Komplex und Rev wird nach Interaktion mit dem Importfaktor Importin- β in Anwesenheit von RanGDP zurück in den Kern transportiert.

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

Ein weiterer essenzieller zellulärer Rev-Kofaktor ist der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A). Durch Interaktion mit dem NES verstärkt eIF-5A die Rev Transaktivierung (Ruhl et al., 1993). Dem Namen nach wurde eIF-5A (alte Bezeichnung eIF-4D) erstmalig als Initiationsfaktor der Translation beschrieben (Cooper et al., 1983). Depletion von eIF-5A in der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Proteinbiosynthese (Kang und Hershey, 1994). Einzigartig für eIF-5A ist eine hochkonservierte posttranslationale Modifikation des Lysin⁵⁰-Restes zu der ungewöhnlichen Aminosäure Hypusin (Park et al., 1981; Cooper et al., 1983), die bisher nur bei eIF-5A gefunden wurde. Das Hypusin-haltige Protein aus dem Archaeabakterium *Sulfolobus acidocaldarius* besitzt ca. 90% Sequenzhomologie zu eIF-5A im Bereich des modifizierten Lysinrestes (Bartig et al., 1992). Hypusin liegt nur in der aktiven, für die Rev-Funktion essenziellen, Form des eIF-5A vor und wird in zwei enzymatisch katalysierten Schritten durch die Deoxyhypusinsynthese (DHS) und Deoxyhypusinhydroxylase (DOHH) gebildet (Park et al., 1993, Abbildung 3).

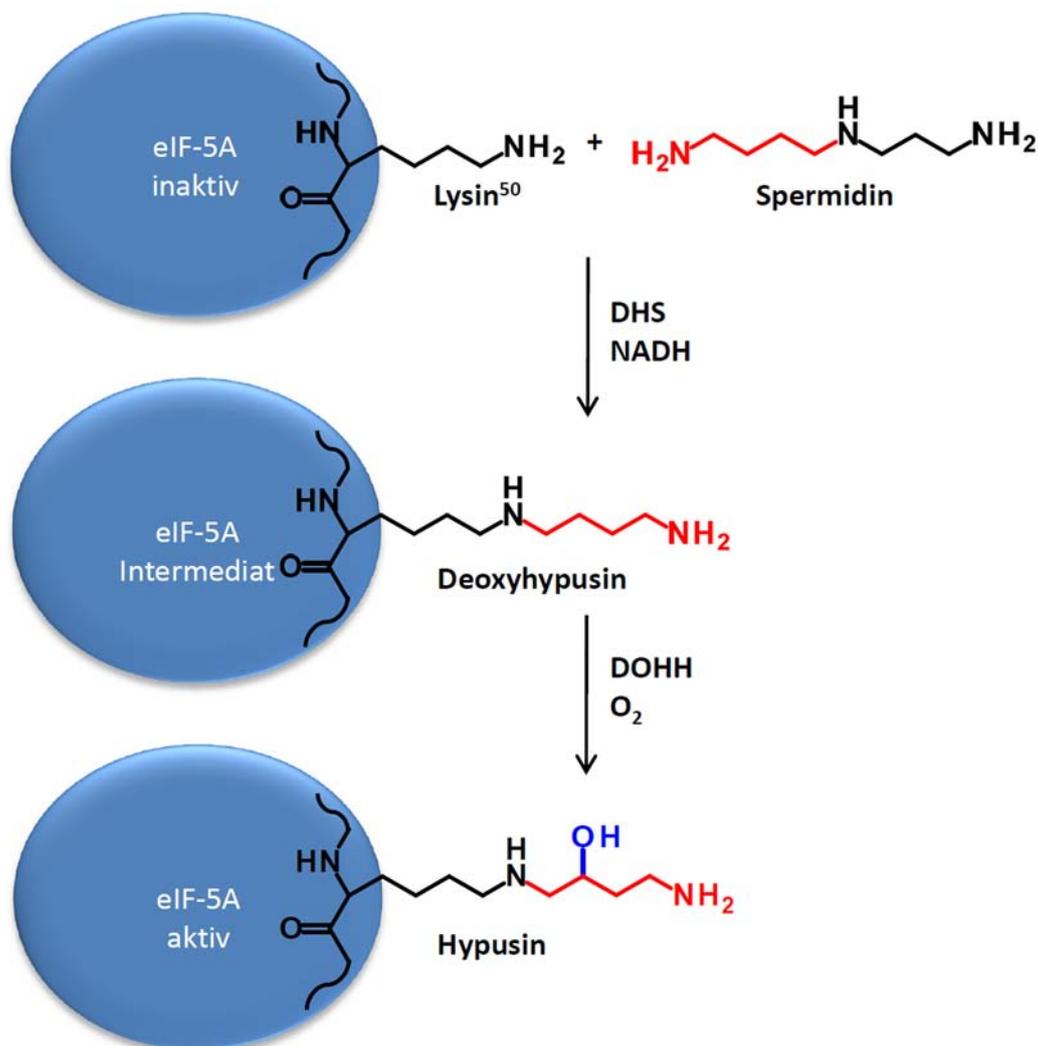


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zweistufigen Hypusin-Modifikation von eIF-5A.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Hemmung der DHS oder bereits die Inhibition der Bildung von Spermidin, dem Substrat der DHS, zu einer Verhinderung des Rev-vermittelten Transportes intronhaltiger viraler mRNA und damit zu einer Inhibition der HIV Replikation führt (Hauber et al., 2005; Schäfer et al., 2006). Unlängst wurde beschrieben, dass sogar die Inhibition der DOHH, also des letzten Schrittes der Hypusinmodifikation, bereits einen antiviralen Effekt auf die HIV-Replikation aufweist (Hoque et al., 2009).

3.1.6 Die Deoxyhypusinsynthese (DHS)

Der erste Schritt in der posttranslationalen Modifikation von eIF-5A wird durch die DHS katalysiert (Wolff et al., 1990). Sie gehört zu der Familie der Transferasen und überträgt einen Aminobutylrest von Spermidin auf das Lys⁵⁰ von eIF-5A, wobei das Zwischenprodukt Deoxyhypusin gebildet wird. Neben Spermidin ist für diese Reaktion die Anwesenheit des Kofaktors NAD als Wasserstoffakzeptor erforderlich. Die DHS besitzt 369 Aminosäuren und bildet in der aktiven Form ein Homotetramer, in dem jeweils zwei Monomere gemeinsam eine Tunnel-förmige aktive Spermidin-Bindungstasche ausbilden (Umland et al., 2004). Diese kann über einen *ball and chain* Mechanismus von dem jeweils anderen Dimer mit einer flexiblen Seitenkette verschlossen werden (Liao et al., 1998). Der Kofaktor NAD wird an der Berührungsfläche zweier Monomere in der Nähe der aktiven Tasche gebunden. Die aktive DHS besteht also aus vier Monomeren, die zwei Moleküle NAD binden und zwei reaktive Zentren bilden. Als spezifische Inhibitoren wurden bislang meist Spermidin-Analoga, wie z.B. N1-Guanyl-1,7-diaminoheptan (GC-7), verwendet (Jakus et al., 1993). Diese binden kompetitiv mit dem DHS-Substrat in der Spermidin-Bindungstasche (Umland et al., 2004). Einen anderen Mechanismus offenbart der hochaktive Inhibitor der DHS-Reaktion und gleichzeitig der HIV-1 Replikation CNI-1493 (Hauber et al., 2005), der in der Nähe der tunnelförmigen aktiven Tasche die Bindung von eIF-5A inhibiert (Klinke et al., unveröffentlichte Daten).

3.1.7 Die Deoxyhypusinhydroxylase (DOHH)

Über die Deoxyhypusinhydroxylase ist noch nicht viel bekannt. Sie katalysiert den zweiten Schritt in der Aktivierung von eIF-5A. Dabei wird ein Hydroxylrest auf den Aminobutylrest von Deoxyhypusin übertragen. Das Enzym wurde erstmals aus Rattenhoden isoliert und charakterisiert (Abbruzzese et al., 1986). Erst 20 Jahre später gelang die Klonierung und rekombinante Expression (Park et al., 2006). Bisher ist noch keine Kristallstruktur veröffentlicht worden. Alle strukturellen Vorhersagen stammen aus Sequenzvergleichen mit verwandten Hydroxylasen und Monooxygenasen. Die DOHH ist ein Metalloenzym, in dem zwei Eisenionen von vier Histidinresten und zwei Glutamatresten komplexiert sind. Diese stammen aus einer Zweiergruppe von vier aufeinanderfolgenden α -Haarnadelschleifen, die als HEAT-Motive bezeichnet werden und für verschiedene Monooxygenasen

beschrieben wurden. Für die Übertragung des Hydroxylrestes wird molekularer Sauerstoff durch Bindung an die Eisenionen aktiviert, wobei ein (μ -1,2-Peroxo)di-eisen III Komplex gebildet wird (Vu et al., 2009). Zwei Studien beschrieben einen antiretroviralen Effekt nach Inhibition der DOHH-Reaktion mit den Eisenchelatoren L-Mimosin, Deferiprone und Ciclopirox (Andrus et al., 1998; Hoque et al., 2009). Die Gruppe um Andrus begründete diesen Effekt mit einer verminderten Polysomenbeladung der viralen ungespleißten mRNA im Gegensatz zu zellulärer mRNA. In der induzierbar HIV-1 exprimierenden T-Zelllinie ACH-2 führte die Behandlung mit den verwendeten Inhibitoren zur einer erheblichen Steigerung der Induktion von Apoptose. In der Studie von Hoque et al. beschreiben die Autoren eine verminderte Bindung zwischen DOHH und eIF-5A, was schließlich zu einer Inhibition der HIV-1 Replikation aufgrund der Hemmung der Initiation der Transkription vom HIV-1 LTR Promotor führte. Allerdings wurden für die gleichen Verbindungen sowohl eine anti-proliferative Wirkung durch einen G1-Zellzyklusarrest beschrieben, als auch ein antiangiogenetischer Effekt, der aus der Verhinderung der Reifung von Kollagen resultiert, da neben Deoxyhypusin auch die Hydroxylierung von Prolin inhibiert wurde (Clement et al., 2002). Es konnte also gezeigt werden, dass die Inhibition der DOHH zu einer Inhibition der HIV-1 Replikation führen kann. Mit den verwendeten Hemmstoffen ging dies jedoch zu Lasten der Wirtszellfunktion. Die DOHH ist dennoch ein günstiges Zielprotein für Inhibitoren der HIV-1 Replikation. Im Gegensatz zur DHS, die für die Zellviabilität in der Bierhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, absolut essenziell ist (Schnier et al., 1991; Wöhl et al., 1992; Sasaki et al., 1996; Park et al., 1998), zeigen DOHH-*knock-out* Hefezellen keine Veränderung des Zellwachstums (Park et al., 2006). Die Entwicklung neuer spezifischerer DOHH-Inhibitoren mit verminderter Toxizität stellt daher einen vielversprechenden neuen Ansatz in der antiretroviralen Therapie dar.

3.1.8 AIDS und Antiretrovirale Therapie

Die Infektion mit HIV besitzt zu Beginn keine charakteristischen Virus-spezifischen Symptome. In den ersten drei bis sechs Wochen nach Infektion treten grippeähnliche Krankheitsmerkmale wie Fieber, Müdigkeit, Kopfschmerzen oder Übelkeit auf. In dieser akuten Phase steigt die Anzahl der Viruskopien im Blutplasma rapide an (Abbildung 4). Als Folge der Infektion nimmt gleichzeitig die Anzahl der CD4⁺ T-Lymphozyten (T-Helferzellen) durch die massive Replikation des Virus und dem damit verbundenen Absterben der infizierten Zellen ab (Tindall und Cooper, 1991). Es gelingt dem Immunsystem jedoch eine HIV-spezifische Immunantwort zu etablieren und die Viruslast um mehrere Größenordnungen zu reduzieren, wobei sich die Zahl der CD4⁺ T-Lymphozyten stabilisiert. Dies ist der Beginn der asymptomatischen Latenzphase, die mehrere Jahre bis Jahrzehnte andauern kann (Fauci et al., 1991) und in der die Viruslast erfolgreich kontrolliert wird. Diese Immunität ist jedoch nicht ausreichend, um die Virusreplikation vollständig zu unterdrücken, da die HIV Expression in den Lymphknoten persistiert, auch wenn die Viruslast im Blutplasma nur noch schwer

nachzuweisen ist (Michael et al., 1992). Während der Latenzphase sinkt die Anzahl der CD4⁺ Zellen kontinuierlich ab bis das Immunsystem derart kompromittiert ist, dass opportunistische Infektionen auftreten können. Dies sind Krankheiten, die für das intakte Immunsystem eines gesunden Menschen meist harmlos verlaufen, aber von dem geschwächten Immunsystem HIV-infizierter Patienten nicht mehr bekämpft werden können.

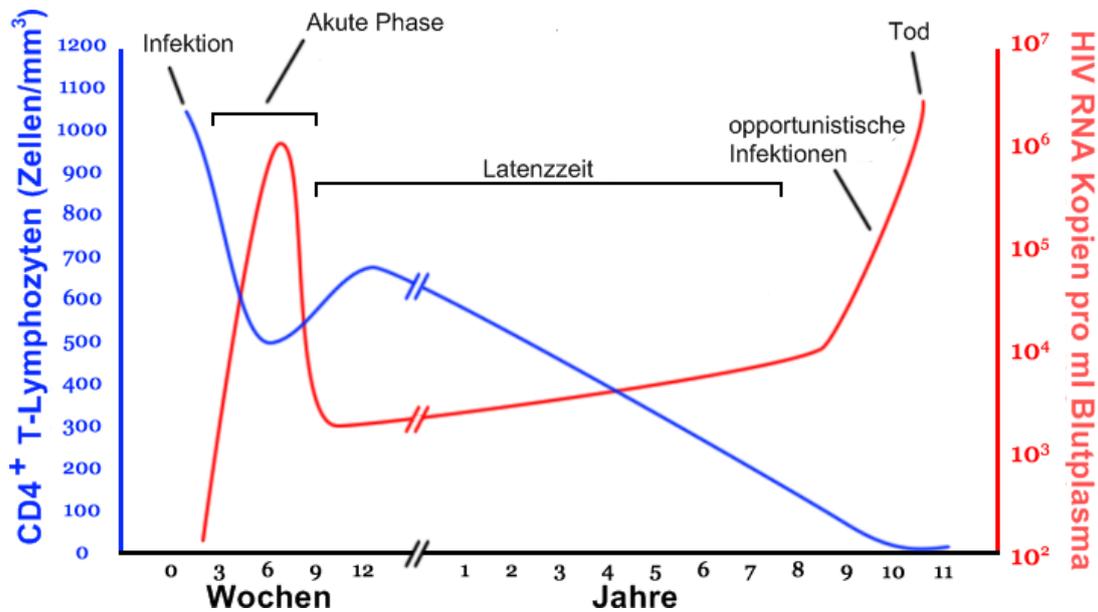


Abbildung 4: Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion (wikipedia.de, verändert nach Pantaleo et al., 1993).

Die *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC) legte eine Reihe sogenannter AIDS-definierender Erkrankungen fest, zu denen unter anderem Pneumocystis-Pneumonie, Kaposi-Sarkom, Candidosen und verschiedene Lymphome gehören. Ein weiterer Indikator für den Krankheitsverlauf ist die Anzahl von T-Helferzellen im Blut. Sinkt diese unter einen Schwellenwert von 200 Zellen pro Mikroliter Blut bei gleichzeitigem Auftreten AIDS-definierender Krankheitsbilder, wird die Diagnose AIDS gestellt. Nach dem aktuellen UNAIDS Report für das Jahr 2009 lebten weltweit 33,3 Mio. Menschen mit einer HIV-1 Infektion. Im gleichen Zeitraum wurden 2,6 Mio. Neuinfektionen und 1,8 Mio. Todesfälle in Folge einer HIV-Infektion/AIDS Erkrankung registriert. Zwei Drittel der Infizierten leben im Afrika südlich der Sahara, wo in einigen Ländern bereits jeder vierte Mensch infiziert ist. Erfreulicherweise geht in den letzten Jahren die Anzahl der Neuinfektionen weltweit zurück. Die Zahl der HIV-Inzidenzen sank in 26 Ländern der Hochprävalenzregionen wie dem südlichen Afrika, der Karibik und in Asien um mehr als 25%. Allerdings ist in Osteuropa und Zentralasien ein deutlicher Anstieg der AIDS-Fatalitäten von über 25% registriert worden (unaids.org).

Bei der Entwicklung der Therapie von HIV-1 Infektionen dienten die viralen Enzyme als erste Angriffspunkte. Die Wirkstoffe sollen das Virus direkt an seiner Vermehrung hindern, sie wirken also

virostatisch. Bereits kurz nach Bekanntwerden des ätiologischen Agens für das AIDS-Krankheitsbild waren antiretrovirale Wirkstoffe verfügbar. Als erste wirksame Verbindung wurde 1985 Azidothymidin (AZT, Ziduvodin) erfolgreich *in vitro* (Mitsuya et al., 1985) und später auch in klinischen Studien an HIV-1 Infizierten (Yarchoan et al., 1986) getestet. Bei AZT handelt es sich um eine *prodrug*, die durch zelluläre Enzyme in das wirksame Nukleotidanalogen AZT-Triphosphat (AZTTP) umgewandelt wird. AZTTP fungiert als kompetitiver Inhibitor der HIV-1 Reversen Transkriptase (RT) und führt zum Kettenabbruch der DNA-Synthese. Es hat eine 100-fach höhere Affinität für die RT als für die zelluläre DNA-Polymerase. Später folgten Analoga des Cytidins (Lamivudin, 3TC), Guanosins (Abacavir), Inosins sowie des Adenosins als weitere nukleosidische und nukleotidische RT Inhibitoren (NRTI). Zu Beginn der Behandlung der HIV-1 Infektion wurden Monotherapien der Wirkstoffe mit hohen Dosen verordnet, wobei die Patienten alle vier Stunden Tabletten zu sich nehmen mussten, um die Ausbildung von Resistenzen zu verhindern.

Die RT ist ebenfalls Zielenzym nichtnukleosidischer Inhibitoren (NNRTI, De Clercq, 1991). Diese binden nicht-kompetitiv an die RT und blockieren dabei die Nukleotid-Bindungsstelle, so dass Nukleotide schlechter binden und die DNA-Synthese dadurch deutlich verlangsamt wird (z. B. Efavirenz). Etwa zeitgleich befanden sich Inhibitoren der HIV-1 Protease (PI) in der Entwicklung (McQuade et al., 1990). Hier werden Peptidmimetika eingesetzt, die die Proteasespaltstelle nachbilden, jedoch nicht durch die Protease prozessiert werden können (z. B. Saquinavir). Inzwischen ist auch ein nichtpeptidischer PI (NPPI, Tipranavir) verfügbar. Infolge der Proteasehemmung findet keine Reifung der freigesetzten Viruspartikel statt, wodurch diese nicht mehr infektiös sind.

In der antiretroviralen Therapie ist allerdings die Ausbildung von Resistenzen gegen die jeweiligen Wirkstoffe eines der größten Probleme. Die RT hat eine hohe Mutationsrate, so dass alle 10^3 bis 10^4 Basen eine falsche Base eingebaut wird (Preston et al., 1988) und pro reverser Transkription 1-10 Mutationen in das virale Genom eingefügt werden. Bei einigen NRTI reicht bereits eine Punktmutation im RT-Gen, um eine Resistenz hervorzurufen. Mangelnde Adhärenz, d. h. eine nicht-regelmäßige Einnahme der Medikamente, führt daher rasch zur Selektion resistenter Virusvarianten. Aus diesem Grund wurden anfangs Monotherapien mit hohen Dosen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt nach Primärinfektion eingesetzt, wenn die Viruslast hoch, die Anzahl der vorkommenden Quasispezies gering und damit das Vorhandensein resistenter Klone noch unwahrscheinlich ist. Allerdings weisen z. B. NRTI eine ausgeprägte mitochondriale Toxizität auf (Brinkman et al., 1999). Der Einbau in die DNA der auf Nukleoside angewiesenen Mitochondrien führt zu Stoffwechselstörungen wie Lipodystrophie, Pankreatitis oder Laktatazidose, die zum Versagen der Nierenfunktion führen kann (Galli et al., 2002). Die Einnahme von PI wird häufig von gastro-intestinalen Beschwerden begleitet und kann einen Einfluss auf den Lebermetabolismus haben. Die Mehrzahl der

PI hemmen das Cytochrom-P450-System, was zu einer höheren Verweildauer lipophiler Arzneistoffe und damit zu deren Überdosierung führen kann (Granfors et al., 2006) und weiterhin einen negativen Einfluss auf die Biosynthese von z. B. Steroidhormonen und Prostaglandinen hat.

Durch die Verfügbarkeit verschiedenartiger Inhibitoren wurde dazu übergegangen, diese in Kombination zu verabreichen. Dies war der Beginn der sogenannten hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART). Dafür werden üblicherweise zwei NRTI mit einem NNRTI oder einem PI in geringer Konzentration kombiniert. Dadurch wurde eine erhebliche Verbesserung der Lebensqualität für die Patienten erreicht, da sowohl die Viruslast nachhaltig reduziert als auch die Progression von AIDS verlangsamt werden konnte. Dies führt zu einer Erhöhung der Lebenserwartung (May et al., 2006) und gestattet vielen HIV-1 Infizierten einen annähernd normalen Lebensalltag zu führen. Umgekehrt bewirkt die Unterdrückung von Symptomen eine Verschlechterung der Adhärenz und damit eine Zunahme der Resistenzen, was eine ständige Weiterentwicklung neuer Inhibitoren nötig macht. Bei einem Drittel der Patienten kommt es trotz der Minimierung der Wirkstoffdosen zu Unverträglichkeiten mit aktuellen Wirkstoffen und den o.g. Nebenwirkungen. Auch dieses macht die Entwicklung verträglicherer Hemmstoffe dringend notwendig.

Seit 2007 befindet sich ein spezifischer Integrase-Inhibitor (INI), Raltegravir, auf dem Markt (Grinsztejn et al., 2007). Raltegravir hemmt den Strangtransfer, bei dem die zuvor von der Integrase prozessierten 3'-Enden der viralen DNA kovalent mit der chromosomalen Wirts-DNA ligiert werden. Im Gegensatz zu Proteasen und der DNA-Polymerase-verwandten RT gibt es für die Integrase kein entsprechendes Wirtsenzym, was ein Grund für die gute Verträglichkeit und die geringen Nebenwirkungen dieses Wirkstoffes sein könnten. Raltegravir ist daher auch Bestandteil neuerer Kombinationstherapien.

Neuere Inhibitoren sind gegen den Eintritt der viralen Partikel in die Zelle gerichtet. So bindet der peptidische Fusionsinhibitor Enfurvitid (T20) an gp41 und verhindert nach der Korezeptorbindung durch gp120 die Fusion mit der Wirtszellmembran. Ein anderer Wirkstoff, Maraviroc, hingegen ist ein Korezeptorantagonist und bindet CCR5, den für Makrophagen-trope (R5-trope) HIV-1 Stämme essenziellen Korezeptor. Es ist damit der erste auf dem Markt befindliche Inhibitor, der ein zelluläres Protein zum Ziel hat. CCR5 ist hierbei eine günstige Zielstruktur, da es nicht essenziell zu sein scheint. Dies ist dadurch belegt, dass Individuen mit einer homozygoten Deletion von 32 Basenpaaren in der kodierenden Sequenz von CCR5 (CCR5 Δ 32) besitzen trotz des nicht funktionellen Proteins eine gute allgemeine Gesundheit (Lederman et al., 2006b). R5-trope Viren sind zwar bei der großen Mehrheit der Neuinfizierten die vorherrschende Virusspezies, während der Latenzzeit kommt es jedoch bei der Hälfte der Patienten zu einem Tropismuswechsel auf T-Zell-trope (X4-trope) Stämme, die CXCR4 als Korezeptor verwenden und so durch Maraviroc nicht inhibiert werden können.

Die große Mehrheit der HIV-Infektionen verläuft über die vaginale Route und im Gegensatz zu Westeuropa und Nordamerika, wo zwei Drittel der Infizierten Männer sind, ist das Geschlechter-spezifische Verhältnis in Hochprävalenzregionen wie im südlichen Afrika annähernd umgekehrt. In der Altersgruppe zwischen 15 und 24 Jahren sind dort laut UNAIDS sogar 75% der Infizierten junge Frauen. Gründe hierfür sind die höhere Anfälligkeit von Frauen für eine HIV-Infektion (Quinn und Overbaugh, 2005) und die Ablehnung von Kondomen in der männlichen Bevölkerung (Pool et al., 2000). Aufgrund finanzieller und logistischer Barrieren ist eine flächendeckende therapeutische Versorgung etwa im südlichen Afrika bisher nicht möglich. Daher werden dringend günstigere Alternativen zur klassischen HAART benötigt. Ein Ansatz beruht auf der topischen Anwendung von Mikrobiziden zur Verhinderung vaginaler HIV-Übertragung (Lederman et al., 2006a). Dabei handelt es sich nicht um Mikrobizide im üblichen Sinn, sondern zumeist um Gele mit Zusätzen, die eine sexuelle Übertragung von HIV verhindern sollen. Generell wird hier zwischen unspezifischen und spezifischen Agenzien unterschieden. Bei den unspezifischen Zusätzen kamen zunächst Detergenzien zum Einsatz, die Membranen der Viren aber auch die der Wirtszellen zersetzen können (Roddy et al., 1998; Feldblum et al., 2008). Ein anderer Ansatz setzte Puffer ein, die das saure Milieu der Vagina aufrecht erhalten und dadurch sowohl antiviral als auch spermizid wirken (van De Wijgert et al., 2001). Darüber hinaus wurden anionische Polymere eingesetzt, die unspezifisch den Eintritt viraler Partikel hemmen (Bernstein et al., 2003; Jiang et al., 2005). Unter den spezifischen Wirkstoffen finden sich CCR5 Korezeptorantagonisten oder NRTI bzw. NNRTI (Lederman et al., 2004; Veazey et al., 2005; Mayer et al., 2006; Schwartz et al., 2008). Unspezifisch wirksame Agenzien bieten den Vorteil, dass neben HIV-1 die Übertragung anderer sexuell übertragbarer Erreger, etwa HIV-2, Chlamydien oder Neisserien ebenfalls gehemmt wird. Die bisher abgeschlossenen klinischen Studien zeigten aber noch keine signifikante Verminderung der HIV Transmission.

3.2 Das Herpes Simplex Virus

Bereits Hippokrates (460-370 v. Chr.) beschrieb die genitale Manifestation des Herpes Simplex als sich ausbreitende Bläschenkrankheit (Kampmeier, 1984). Auch die Übertragbarkeit einer Bläschen-erkrankung an den Lippen durch Küssen war schon in der römischen Antike bekannt und findet z. B. auch Erwähnung in Shakespeares Tragödie „Romeo und Julia“ (1. Akt, 4. Szene Mercutio zu Romeo). Heutzutage ist Herpes Simplex weit verbreitet. So liegt die Seroprävalenz für *Herpes labialis* in Deutschland bei über 80% (Hellenbrand et al., 2005).

Die Herpes Simplex Viren gehören zur Unterfamilie der Alphaherpesviren innerhalb der Familie der *Herpesviridae* und sind damit umhüllte Viren mit linear doppelsträngigem DNA Genom. Sie werden in zwei Subtypen eingeteilt und für gewöhnlich als Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2) bezeichnet. Die systematischen Namen lauten Humanes Herpesvirus 1 (HHV-1) und Humanes

Herpesvirus 2 (HHV-2, Gärtner und Müller-Lantzsch, 2002). Herpes Simplex Viren dringen bei der Primärinfektion in die Epithelzellen der Mundschleimhäute (HSV-1) oder der Genitalschleimhäute (HSV-2) ein, wobei Bereiche am Übergang von Schleimhaut zu normaler Haut bevorzugt werden. Dort repliziert das Virus und wird durch Zerstörung der infizierten Zelle freigesetzt oder durch Verschmelzung mit benachbarten Zellen weitergegeben. Aus dem Epithel gelangen HS Viren in freie Nervenenden der Neuronen des umliegenden Gewebes, in welchen das Viruskapsid entlang der Mikrotubuli des Axons retrograd zu den Zellkernen trigeminaler Ganglien (HSV-1), bzw. Sakralganglien des Rumpfes (HSV-2) wandert. Hier etabliert das Virus eine für Herpesviren charakteristische lebenslange Latenz, in der nur vereinzelte Gene exprimiert werden (Jones, 1998; Bloom, 2004). Durch Stress oder kompromittierte Immunfunktion kann es zu einer Reaktivierung des Virus kommen (Whitley, 2001), was zu einem anteretrograden Transport der Virionen zu den Nervenenden und einer rekurrenten Infektion von Epithelzellen führt. Diese kann genau wie die Primärinfektion symptomlos erfolgen, führt in der Regel jedoch zu charakteristischen Herpes-Läsionen (HSV-1 *Herpes labialis*, HSV-2 *Herpes genitalis*, Wutzler, 2011). Während dieser lytischen Infektion wird das Virus durch Speichelkontakt, Schmierinfektion oder durch engen Schleimhautkontakt übertragen. Der Krankheitsverlauf ist in immunkompetenten Individuen meist gutartig und dauert ein bis zwei Wochen. Herpes Simplex Viren können jedoch auch schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen. Bei der Herpes-Simplex-Enzephalitis (HSV-1) kommt es zu einer häufig tödlichen Entzündung des Gehirns. Beim *Herpes neonatorum* wird HSV-2 bei einer bestehenden *Herpes genitalis* der Mutter perinatal auf den Säugling übertragen. Es handelt sich dabei um eine disseminierte, generalisierte Herpes-Infektion, die in 50-80% der Fälle letal verläuft (Whitley und Roizman, 2001).

3.2.1 Morphologie und Replikation

Das Herpes Simplex Virion (Abbildung 5) hat einen Durchmesser von ca. 225 nm (Grünwald 2003) und ist von einer Lipiddoppelschicht umgeben, in der virale Glykoproteine enthalten sind, die sowohl für die Bindung an die Zielzelle und den Viruseintritt verantwortlich sind, als auch immunmodulatorische Funktionen besitzen. Sie spielen ebenfalls eine Rolle beim Virionzusammenbau und Austritt aus der Zelle. Das Tegument, welches den Raum zwischen Virusmembran und Kapsid ausfüllt, ist eine Schicht aus 20 verschiedenen Proteinen, die unter anderem essenziell für den Beginn der Virusreplikation sind. In dem ikosaedrischen Kapsid befindet sich das 152 kb große lineare DNA Genom, welches mit mindestens 84 offenen Leserahmen für mehr als 100 Genprodukte kodiert (Ward und Roizman, 1994). Das Genom setzt sich aus einer langen und einer kurzen Region zusammen, in denen einzigartige Sequenzen von invertierten Sequenzwiederholungen flankiert sind.

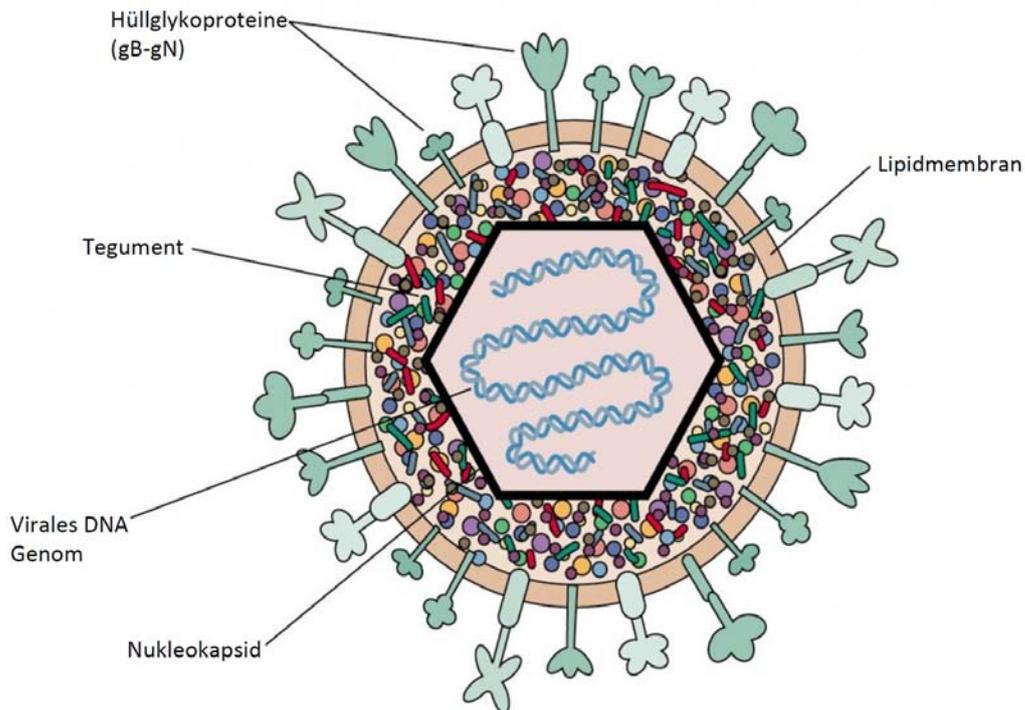


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Herpes Simplex Viruspartikels.

Die HSV-Infektion beginnt mit der sequenziellen Bindung zellulärer Oberflächenmoleküle durch die viralen glykosylierten Hüllproteine (Abbildung 6), welche zu einer Fusion der Virusmembran mit der Plasmamembran der Zelle führt (siehe 3.2.2, Spear et al., 2000; Spear und Longnecker, 2003; Spear, 2004). Hierdurch gelangt das Viruskapsid in die Zelle und wird mit Hilfe von noch unbekanntem Tegumentproteinen Dynein-abhängig entlang von Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Sodeik et al., 1997; Döhner et al., 2002; Döhner et al., 2006). Dort bindet das Kapsid an Kernporenkomplexe und entlässt die virale DNA in das Nukleoplasma. Die Genexpression ist Kaskaden-artig reguliert (Roizman und Knipe, 2001). Durch Tegumentproteine wird die Genexpression der unmittelbar frühen Gene aktiviert, welche die Bildung der Replikationskompartimente innerhalb des Zellkerns vermitteln (Everett, 2001; Everett und Murray, 2005) und die Expression der frühen Gene induzieren. Diese sind verantwortlich für die virale DNA-Replikation und den Nukleotidmetabolismus. Bei den während der DNA-Replikation exprimierten späten Genen handelt es sich um Struktur- und Hüllproteine sowie um Proteine, welche im Zellkern die Verpackung der viralen DNA in neusynthetisierte Kapside vermitteln (Roizman und Knipe, 2001; Weir, 2001; Rajcani et al., 2004.) Bis zum Austritt aus der Zelle erfolgen mehrere Knospungs- und Membranfusionsvorgänge. Die Kapside knospen zunächst an der inneren Kernmembran in den perinukleären Raum, der in das Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums übergeht. Die primäre Hülle fusioniert mit der äußeren nukleären Membran und setzt das Kapsid ins Zytosol frei. Tegumentproteine assemblieren an Endosomen oder trans-Golgi Komponenten, wo sie an die zytosolischen Domänen viraler Transmembranproteine assoziiert sind. Während der zweiten Knospung in das Lumen dieser Organellen werden fertige Virionen gebildet

und durch Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran in den extrazellulären Raum sekretiert (Mettenleiter, 2002; Mettenleiter, 2004).

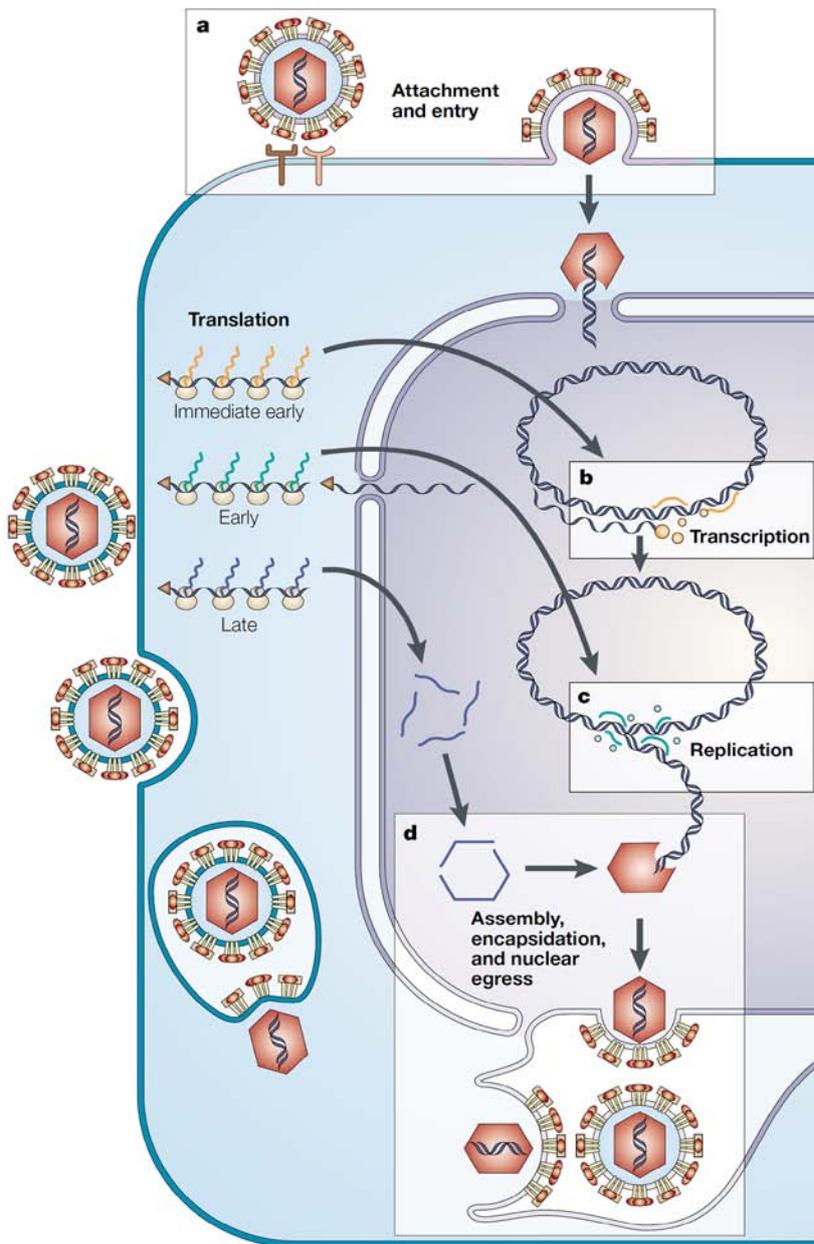


Abbildung 6: Lytischer Replikationszyklus von HSV (Coen und Schaffer, 2003). Nach Bindung zellulärer Rezeptoren fusionieren Virus- und Zellmembran. Das Kapsid gelangt so in das Zytoplasma und inseriert die lineare virale DNA in den Zellkern. Dort wird sie zirkularisiert und die Expression der unmittelbar frühen (*immediate early*) viralen Gene beginnt. Diese vermitteln die Expression der frühen Gene, welche für die virale DNA-Replikation zuständig sind, und durch diese schließlich die Expression der späten Gene reguliert. Letztere kodieren für strukturelle und Hüllproteine, die für den Aufbau des Viruspartikels benötigt werden. Das Kapsid assembliert im Zellkern und wird von der inneren Kernmembran umhüllt. Über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat gelangen die Virionen an die Plasmamembran, von wo sie in den extrazellulären Raum sekretiert werden.

3.2.2 Eintritt des Viruspartikels in die Wirtszelle

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben sind bei HIV-1 zwei Glykoproteine für die Bindung an die Zielzelle und die Fusion mit der Wirtszellmembran verantwortlich. Im Fall von Alphaherpesviren sind fünf Glykoproteine, gB, gC, gD, gH und gL, beteiligt (Spear, 2004; Campadelli-Fiume et al., 2007, siehe Abbildung 7). Abgesehen von gC sind sie alle essenziell für den Eintritt des Viruspartikels in die Wirtszelle. Der erste Kontakt zwischen Virion und Zelle wird durch die Interaktion von gC und/oder gB mit Heparansulfat Proteoglykanen (HSPG) vermittelt (Herold et al., 1991; Shieh et al., 1992).

Obwohl gC nicht essenziell ist, führt dessen Abwesenheit zur einer verminderten viralen Bindung an die Zelloberfläche (Herold et al., 1994). Nach der Bindung wird die Fusion zwischen Virion und Zelle durch Wechselwirkungen von gD mit einem von drei unabhängigen Rezeptoren eingeleitet (Montgomery et al., 1996; Geraghty et al., 1998; Shukla et al., 1999). Durch Bindung an das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül Nectin-1, den *herpes virus entry mediator* (HVEM), ein TNF-Rezeptor verwandtes Protein, oder an eine spezielle Modifikation von Heparansulfat, 3-O-sulfatisiertes Heparansulfat (3-O HS), wird in gD eine Konformationsänderung ausgelöst, die die Bildung eines multi-Glykoprotein-komplexes induziert, an dem gB, gD, gH und gL beteiligt sind (Carfi et al., 2001). gL hat als einziges dieser Glykoproteine keinen Transmembranteil und bildet einen heterodimeren Komplex mit gH. Sowohl gB als auch gH besitzen mehrere fusogene Domänen. gB ist unter den Herpesviren hochkonserviert und enthält Eigenschaften von Klasse I und II viralen Fusionsproteinen. Klasse I Proteine verfügen über Haarnadel-Trimere mit N-terminal hydrophoben Membran-penetrierenden Peptiden, die α -helicale *coiled-coiled* Strukturen ausbilden. Klasse II Proteine enthalten β -Strukturen mit intern lokalisierten Fusionsdomänen (Heldwein et al., 2006). Ebenso wie gB besitzt auch gH zwei Wiederholungen von sieben Aminosäuren, die für die Induktion der Fusion notwendig sind (Campadelli-Fiume et al., 2007). Durch die Interaktion der fusogenen Domänen mit der Plasmamembran werden die Virus- und Zellmembran einander angenähert, bis eine Mischung der Membranen, der sogenannten Hemifusion einsetzt (Subramanian und Geraghty, 2007). Daraufhin bildet sich ein Fusionspore, durch die das virale Kapsid in die Zelle gelangt.

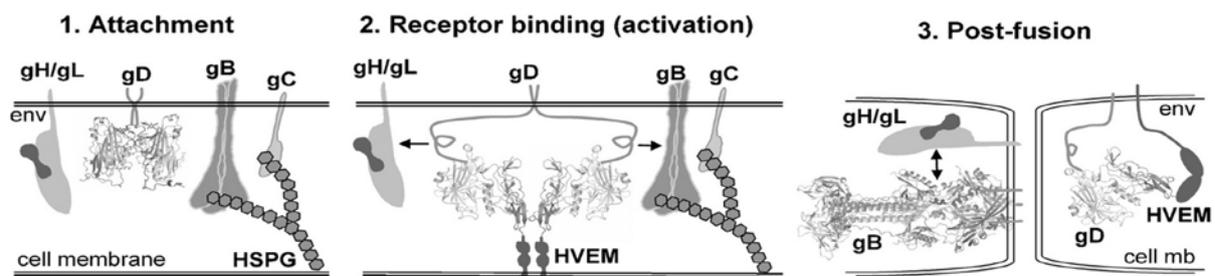


Abbildung 7: Veranschaulichung der HS-Virus-Zellwechselwirkungen, die zur Fusion des Virions mit der Plasmamembran führen (aus Heldwein und Krummenacher, 2008).

3.2.3 Therapie

Das Herpesvirus Genom kodiert für mehr als 50 Proteine, die an verschiedenen Stellen des viralen Lebenszyklus aktiv und für die Virusreplikation essenziell sind. Damit bieten Herpesviren eine Reihe von möglichen Zielstrukturen für eine antivirale Therapie. Dennoch wird von den klinisch verwendeten Wirkstoffen bislang hauptsächlich die virale DNA-Polymerase durch Nukleosidanaloga wie Aciclovir (Park et al., 1979) oder Penciclovir (Boyd et al., 1987) adressiert. Diese wirken als Pro-Pharmaka und werden erst in der Zelle durch Modifikation zum eigentlichen Inhibitor umgewandelt.

Sie sind ein spezifisches Substrat der viralen Thymidinkinase (TK), die sie 3000mal effektiver phosphoryliert als die zelluläre Kinase. Daraufhin werden sie von zellulären Enzymen in Triphosphate überführt und konkurrieren auf diese Weise mit normalen Desoxynukleosidtriphosphaten als Substrat für die virale DNA Polymerase. Ihr Einbau in die virale DNA terminiert die Elongation und scheint ebenfalls die DNA-Polymerase zu inaktivieren (McGuirt und Furman, 1982; Furman et al., 1984). Auch dieser Schritt ist Virus-spezifisch, da Aciclovir-Triphosphat von der viralen Polymerase 100mal effizienter gebunden wird als von der zellulären. Aciclovir wird standardmäßig topisch und systemisch bei Herpes Simplex Virus Infektionen eingesetzt. Die Tatsache, dass sich gegen Aciclovir schnell Resistenzen ausbilden, und dass es durch den Einbau in zelluläre DNA ein potenziell chromosomales Mutagen darstellt, macht die Suche nach alternativen Behandlungsmethoden allerdings absolut notwendig.

3.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Testung und Charakterisierung neuer Inhibitoren für die HIV-1 Infektion.

Das Auftreten von Resistenzen gegen gängige antivirale Wirkstoffe ist ein großes Problem in der Behandlung von Virusinfektionen. Die Majorität der eingesetzten Medikamente richtet sich gegen virale Enzyme und Strukturen. Dem resultierenden Selektionsdruck können die Viren durch ihre enorme Anpassungsfähigkeit, besonders schnell bei mangelhafter Adhärenz seitens der Patienten entkommen, und somit die jeweiligen Wirkstoffe nutzlos machen. In einem alternativen Therapieansatz sollten zelluläre Zielstrukturen für die Medikamentenentwicklung validiert werden, welche für die Virusreplikation essenziell sind und deren Blockierung zur Inhibition der Virusvermehrung, aber nicht zu Toxizität für die Wirtszelle führt. Dies hätte den Vorteil, dass eine Anpassung für das Virus schwieriger und damit eine Resistenz gegen den Wirkstoff weniger wahrscheinlich wird (Lederman, 1995; Lederman et al., 2006a).

Ein solches zelluläres Zielprotein stellt die aktive Form des eukaryotischen Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) dar, welches das einzige bekannte Protein ist, das die besondere Aminosäure Hypusin enthält. Hierbei handelt es sich um eine Modifikation eines Lysinrestes, die sequenziell durch die beiden Enzyme DHS und DOHH erfolgt. Aktives eIF-5A ist ein essenzieller Rev-Kofaktor und damit für den Transport genomischer und unvollständig gespleißter HIV-1 mRNA notwendig. Die Hemmung der DHS oder auch schon der Bildung des DHS Substrats reicht aus, um die HIV-1 Replikation signifikant zu inhibieren. Bislang ungeklärt ist die Rolle der Hydroxylierung von Deoxyhypusin-modifiziertem eIF-5A für die Rev-Funktion. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Verhinderung der DOHH-Funktion durch Inhibition mit spezifischen niedermolekularen Verbindungen und parallel die Depletion des Enzyms mittels RNA Interferenz. Der resultierende Effekt der Verhinderung des zweiten Modifikationsschritts

in der eIF-5A Aktivierung sollte daraufhin funktionell charakterisiert werden. Darüber hinaus sollten neue Inhibitoren der DHS auf ihre antivirale Aktivität und ihre zelluläre Toxizität untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Dissertation sollten neue peptidische antimikrobielle Inhibitoren der bakteriellen Sepsis auf ihre antivirale Aktivität in der HIV-1 und später auch in der HSV-1 bzw. HSV-2 Infektion getestet und ihr Wirkmechanismus charakterisiert werden. Solche Inhibitoren hätten besonders in Hinblick auf die Behandlung und Verhinderung von Koinfektionen großes therapeutisches Potenzial.

4 Material

4.1 Bakterienstämme

Name	Genotyp	Herkunft
BL21 (DE3)	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)	Stratagene (La Jolla, CA)
BL21 (DE3) pLys	F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, λ (DE3), pLysS, Cmr	Promega (Mannheim)
JM101	supE thi-1 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIq Δ M15]	Stratagene (La Jolla, CA)
Stbl3	F- mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(StrR)xyl-5 λ – leu mtl-1	Invitrogen (Karlsruhe)
XL10 Gold	Tetr, Δ (mcrA)183, Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F', proAB, lacIq Δ M15, Tn10, (Tet'), Amy, Camr]a	Stratagene (La Jolla, CA)

4.2 Eukaryotische Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft
293T	Humane, embryonale Nierenzelllinie, exprimiert das große T-Antigen des SV40 Virus	ATCC Nr CRL-11268
BHK-21	Nierenfibroblasten des syrischen Goldhamsters	ATCC Nr. CCL-10
CEM-SS	Humane T4-Lymphoblastoide Zelllinie	NIH Nr. 776
HeLa	Humane epitheliale Cervixkarzinomzelllinie	ATCC Nr. CCL-2
Jurkat 1G5	T-Zelllinie, mit einer stabil integrierten Tat-abhängigen HIV-1 LTR-Luciferase Expressionskassette	(Aguilar-Cordova et al., 1994)
Jurkat TAg	T-Zelllinie, exprimiert konstitutiv das große T-Antigen des SV40 Virus	Dr. Kehlenbach (Göttingen)
PBMC	Mononukleare Zellen des peripheren Blutes	Blutspendezentrale UKE, Hamburg
PM1	Humane Hautzell-T-Lymphom Zelllinie, Subklon von HUT78, infizierbar mit M- und T-tropen HI-Viren	NIH Nr. 3038 (Lusso et al., 1995)
TZM-bl	HeLa Zelllinie, die stabil CD4, CCR5 und CXCR4 exprimiert, enthält HIV-1 LTR getriebene Luciferase und β -Galaktosidase Expressionskassette	NIH Nr. 8129, (Wei et al., 2002)
Vero	immortalisierten Nierenzellen der adulten grünen Meerkatze	ATCC Nr. CCL-81

4.3 Viren

4.3.1 Humane Immundefizienz Viren

HIV-1 BaL	R5-troper HIV-1 Laborstamm, NIH Nr. 510 (Gartner et al., 1986)
HIV-1 NL4-3	X4-troper HIV-1 Laborstamm (Adachi et al., 1986)

4.3.2 Herpes Simplex Viren

HSV-1	HSV-1, Stamm 17 ⁺ stammt von Roger D. Everett (MRC, Glasgow, UK)
HSV-2	HSV-2, Stamm US, wurden von Andreas Sauerbrei und Peter Wutzler (Universität Jena, Germany) zu Verfügung gestellt.

4.4 Medien

4.4.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	10 g/L Bacto-Typton; 5 g/L Bacto-Hefeextrakt; 8 g/L NaCl; 1 g/L Glucose. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf pH 7.2 eingestellt.
Luria-Bertani-Agarplatten (LB-Platten)	15 g Agar wurden in 1 L LB-Medium gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf 55°C wurde 1 mg/mL Ampicillin zugegeben.
Thym-Broth (kompetente Bakterien)	2% (w/v) Bacto-Trypton, 5% (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 0,1 M NaCl, 0,01 M MgCl ₂

4.4.2 Medien für Kultivierung von eukaryotischen Zellen

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium, Biochrom, Berlin)	Zur Kultivierung von 293T, HeLa, und TZM-bl-Zellen; Zugabe von 10% (v/v) FKS, 3,75 mg/mL NaHCO ₃ , 2 mM L-Glutamin, optional 0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin
MEM (Modified Eagle Medium, Biochrom, Berlin)	Zur Kultivierung von Vero Zellen; Zugabe von 10% (v/v) FKS, 10 mM HEPES, 2,25 mg/mL NaHCO ₃ , 2 mM L-Glutamin, 0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin
RPMI-1640 Medium (Gibco BRL, Eggenstein)	Zur Kultivierung von PM1 und CEM-SS Zellen sowie PBMCs; Zugabe von 10% (v/v) FKS (PAN-Biotech), 2 mM L-Glutamin, teilweise 0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin
OptiMEM (Gibco BRL, Eggenstein)	Serumreduziertes Medium zur Transfektion von Zellen

4.4.3 Medienzusätze

DMSO	Sigma (München)
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
NaHCO ₃ , 7,5% (w/v) Fertiglösung	Biochrom (Berlin)
Polybren	Sigma (München)
Trypsin/EDTA	Biochrom (Berlin)
Natriumpyruvat	Biochrom (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin)
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom (Berlin) bzw. PAN Biotech (Aidenbach)

4.5 Oligonukleotide

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

4.5.1.1 Primer und Sonden für PCR und Realtime PCR

Name	Sequenz (5'-3' Richtung)	Funktion
GAPDHs	GTCATCAATGGAAATCCCATCA	Primer und Sonde zur Quantifizierung der GAPDH mRNA Menge
GAPDHas	TGGTTCACACCCATGACGAA	
GAPDH-Sonde	FAM-TCTTCCAGGAGCGAGATCCCTC-TAMRA	
BG#2165s	CGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTC	β-Globin (interne Kontrolle)
BG#2812as	GCAGAATGGTAGCTGGATTGTAGC	
O#M8905s	GAGCAGTATCTCGAGACCTGG	Alu-PCR äußere Primer für M-trope Viren
Alu#SB704as	TGCTGGGATTACAGGCGTGAG	
N#M8938s	GAGCAATCACAAGTAGCAATACAGC	Alu-PCR nested Primer für M-trope Viren
N#M8939as	CCTTG TAGAAAGCTCGGTGTCAG	
DOHs	GGAGCAGGAGGTGGATGC	Primer und Sonde zur Quantifizierung der DOHH mRNA Menge
DOHH Sonde	FAM-ATTGCATGGATCAGCCAGGCCTT-TAMRA	
DOHHRtas	GCCAGCTCGTGCTTGAGC	
DOHHas	GGTCTCGTGCTCATACATGTC	Antisense Primer für RT-PCR von DOHH PCR-Primer für die Klonierung von DOHH, fügen HindIII und XhoI Schnittstellen ein Primer zur Reversen Transkription von mRNA
CLDOHs	ATTTAAAAGCTTGCATGGTGACGGAGCAGGAGGTG	
CIDOHHas	CTGCGCGGGGCCCTCCTAGCTCGAGTTAAAT	
Oligo(dT)	TTTTTTTTTTTTTTT	

4.5.1.2 Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Sequenz (5'-3' Richtung)	Funktion
DHH_1127_Sil_s	GCAGAGCTTTGGCGTCTAATTCAAGAGATTAGACGCCAA AGCTCTGCTTTTTT	Hybridisierung dieser Oligonukleotide ergibt eine shRNA Kasette für den pSilencer-Vektor
DHH_1127_Sil_as	AATTAAAAAAGCAGAGCTTTGGCGTCTAATCTCTTGAATT AGACGCCAAAGCTCTGCGGCC	
DHH_985_Sil_s	GGTGGCTCTGGACATGTATTTCAAGAGAATACATGTCCA GAGCCACCTTTTTT	Hybridisierung dieser Oligonukleotide ergibt eine shRNA Kasette für den pSilencer-Vektor
DHH_985_Sil_as	AATTAAAAAAGGTGGCTCTGGACATGTATTCTCTTGAAT ACATGTCCAGAGCCACCGGCC	
DHH_1127_Sup_s	GATCCCCGCAGAGCTTTGGCGTCTAATTCAAGAGATTAG ACGCCAAAGCTCTGCTTTTTGAAA	Hybridisierung dieser Oligonukleotide ergibt eine shRNA Kasette für den pSUPER-Vektor
DHH_1127_Sup_as	AGCTTTTCCAAAAAGCAGAGCTTTGGCGTCTAATCTCTTG AATTAGACGCCAAAGCTCTGCGGG	
DHH_985_Sup_s	GATCCCCGGTGGCTCTGGACATGTATTTCAAGAGAATAC ATGTCCAGAGCCACCTTTTTGAAA	Hybridisierung dieser Oligonukleotide ergibt eine shRNA Kasette für den pSUPER-Vektor
DHH_985_Sup_as	AGCTTTTCCAAAAAGGTGGCTCTGGACATGTATTCTCTTG AAATACATGTCCAGAGCCACCGGG	

4.5.1.3 Sonstige Nukleinsäuren

DNA-Längenstandard

1 kb-Ladder	New England Biolabs (Ipswich, MA)
100 bp-Ladder	New England Biolabs (Ipswich, MA)
Smart-Ladder	Eurogentec (Köln)
dNTPs	Roche (Mannheim)

4.6 Radioaktivität

[Methyl- ³ H]-Thymidin	Hartmann Analytic (Braunschweig)
[¹⁴ C]-Spermidin	Amersham Biosciences (Freiburg)

4.7 Expressionsplasmide

Name	Beschreibung	Herkunft
pBC12/CMV	Parentaler Expressionsvektor	Cullen, 1986
pcDNA3.1	Parentaler Expressionsvektor	Invitrogen (Karlsruhe)
pSUPER	Für die Expression von shRNA, H1-Promotor	Brummelkamp et al., 2002
pSilencer 1.0-U6	Für die Expression von shRNA, U6-Promotor	Ambion (Darmstadt)
pcTat	pBC12/CMV , Tat-Expressionsplasmid	Malim et al., 1988
pcRev	pBC12/CMV, Rev-Expressionsplasmid	Malim et al., 1988
pGPV-4xCTE	siehe Abbildung 13	Swanson et al., 2004
pGPV-RRE		
pHXB2 Δ Bam	Proviraies Genom von HIV-1 HXB2 mit Mutation in der Rev Exon1 Sequenz	Feinberg et al., 1986
pDM128/RRE	Rev-Reportervektor, exprimiert CAT, CAT-Kassette mit RRE von HIV-1 Spleißstellen flankiert	Hope et al., 1990; Malim et al., 1991
pBC12 / HIV / CAT	Tat-Reporterkonstrukt, exprimiert CAT von HIV-1 LTR	Berger et al., 1988
pRSV-Rev	Kodiert für Rev für die Verpackung von lentiviralen Vektoren, RSV-Promotor	Dull et al., 1998
pDMLg/pRRE	Kodiert für HIV-1 gagpol für die Verpackung von lentiviralen Vektoren	Dull et al., 1998
pCMV-VSV-G	Expression des Hüllproteins von VSV	Beyer et al., 2002
p3DOHH	pcDNA3.1, DOHH Expressionsplasmid	siehe Kapitel 5.1.16
pBC12/CMV/ β Gal	pBC12/CMV, kodiert für β -Galaktosidase	Ruhl et al., 1993
pSEAP	pBC12/CMV, kodiert für sekretierte Alkalische Phosphatase	Berger et al., 1988
pG	Lentiviraler Vektor, pSUPER Kasette über XbaI und XhoI in den pG-Vektor eingefügt. pSilencer-Kassette in BamHI	Dr. Stocking (HPI)
pSV-MoMLVgagpol	Verpackungsplasmid zur Verpackung retroviraler Vektoren, enthält die gagpol Gene des Moloney-Maus Leukämie Virus	Dr. Stocking (HPI)
pNL_BaL(env)	Vollständiges Genom von HIV-1 NL4-3, env Sequenzen aus HIV-1 BaL.	Prof. Landau (NYU)
pNL4-3	Vollständiges Genom von HIV-1 NL4-3	Prof. Landau (NYU)
pCS-X1MT	Proviraies HTLV-I Plasmid	Prof. Derse (Derse et al., 1997)
pet15b-DHS	Bakterielles DHSExpressionsplasmid	Prof. Kaiser (Köln)
pet28a-DOHH	Bakterielles DHSExpressionsplasmid	Prof. Kaiser (Köln)

4.8 Enzyme

4.8.1 Restriktionsnukleasen/Puffer

Restriktionsnukleasen wurden von Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Ipswich, MA) bezogen und in den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen verwendet.

4.8.2 Sonstige Enzyme

Alkalische Kalbsphosphatase	New England Biolabs (Ipswich, MA)
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim)
Phusion® Polymerase	Finnzyme (Espoo, Finnland)
Proteinase K	Sigma (München)
Pwo-Polymerase	Roche (Mannheim)
RNase A	Qiagen (Hilden)
<i>RQ1 RNase-free DNase</i>	Promega (Mannheim)

4.9 Inhibitoren

Sämtliche in dieser Arbeit untersuchten niedermolekularen DOHH-Inhibitoren wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Holzgrabe, Universität Würzburg, synthetisiert (Goebel et al., 2008).

Die getesteten DHS-Inhibitoren wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Meier, Universität Hamburg, synthetisiert (Schröder et al, 2011, unveröffentlichte Daten).

4.10 Antikörper

4.10.1 Primärantikörper

anti- α -Tubulin Maus	Sigma (München) 1:5000
anti-183 (p24-ELISA) Hybridom	NIH (Bethesda, MD)
anti-Kapsid (p24-ELISA) Kaninchen	K. Wiegers, (HPI, Hamburg)
anti-Rhodamin Maus (Klon 11H10, 1:100)	Antikörper-Online (Aachen)

4.10.2 Sekundärantikörper

anti-Kaninchen Ziege Peroxidase (p24 ELISA 1:2000)	Dianova (Hamburg)
anti-Maus Ziege Peroxidase	Dianova (Hamburg)
IRDye 700DX Goat anti-Mouse IgG (H + L)	Licor (Bad Homburg)

IRDye 700DX Goat anti-Rabbit IgG (H + L)	Licor (Bad Homburg)
IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L)	Licor (Bad Homburg)
IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L)	Licor (Bad Homburg)
anti-Maus Ziege 10 nm Kolloidalgold (1:50)	British Biocell International (Cardiff, UK)

Für Westernblotanalysen wurden die Peroxidase-gekoppelten Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Die Fluorochrom gekoppelten Antikörper wurden in der Westernblotanalyse in einer Verdünnung von 1:10.000 verwendet.

DRAQ5 DNA-Färbung (Zellkern) 1:1000	Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
-------------------------------------	----------------------------------

4.11 Reagenzsysteme

5 PRIME 2,5x PCR MasterMix	5 PRIME (Hamburg)
AlamarBlue Assay	AbD Serotec (Düsseldorf)
Biorad Protein Assay (Bradford-Reagenz)	Biorad (München)
CAT-ELISA	Roche (Mannheim)
<i>Dead Cell Apoptosis Kit</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA Minipräparations-Kit	Qiagen (Hilden)
DNA Maxipräparations-Kit	Qiagen (Hilden)
Luciferase Reporter Assay System	Promega (Mannheim)
MTT-Assay	Roche (Mannheim)
<i>QIAmp DNA (Blood) Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Rapid DNA-Ligation-Kit</i>	Roche (Mannheim)
Paltinum® QPCR UDG Master Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>SulfoLink Coupling Gel</i>	Pierce (Bonn)
TriFAST	Peqlab (Erlangen)

4.12 Chemikalien

7-Aminoactinomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
Acrylamid/Bis (29:1)	Biorad (München)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Aprotinin	Biomol (Hamburg)
Bradford Reagenz	BioRad (München)
Bromphenolblau	Sigma (München)
Camptothecin	Sigma (München)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Chlorophenolrot- β -D-Galaktopyranosid	Roche (Mannheim)
Coomassie G250	Fluka (Neu-Ulm)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth (Karlsruhe)
Dextran	Sigma (München)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (München)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (EtBr)	Biomol (Hamburg)
Glutathionsepharose 4B	Amersham Biosciences (Freiburg)
IPTG	Peqlab (Erlangen)
Kälberserumalbumin (BSA)	Sigma (München)
Kanamycin	Roche (Mannheim)
Leupeptin	Biomol (Hamburg)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Liquemin N10.000 (Heparin)	Roche (Mannheim)
Luminol	Sigma (München)
Magermilchpulver	D. und F. Wulf und Co (Hamburg)

Material

Nonidet-P40 (Igepal)	Sigma (München)
NKS (Neugeborenen Kälber-Serum)	Biochrom (Berlin)
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Biorad (München)
para-Cumarinsäure	Sigma (München)
Paranitrophenol	Sigma (München)
Pefabloc	Biomol (Hamburg)
PepstatinA	Biomol (Hamburg)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma (München)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck (Darmstadt)
Polybren	Sigma (München)
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences (Eppelheim)
Propidiumiodid	Sigma (München)
Rekombinantes Interleukin-2	Biomol (Hamburg)
Spermidin	Sigma (München)
Tetramethylbenzidin	Sigma (München)
TransIT LT1	Mirus (Madison, WI)
TurboFect	Fermentas (St. Leon-Rot)

Sonstige verwendete nicht spezifisch aufgeführte chemische Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences (Freiburg), Bayer (Leverkusen), BioRad (München), Roche (Mannheim), Calbiochem (La Jolla, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt) Pharmacia (Uppsala, Schweden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München), Peqlab (Erlangen), Biomol (Hamburg). In der Regel wurde der Reinheitsgrad „zur Analyse“ verwendet.

4.13 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial und Plastikwaren stammten von den Herstellern Greiner (Frickenhäuser), Nunc (Langensfeld), Renner (Dannstadt) und Sarstedt (Nümbrecht). Röntgenfilme wurden von GE Health Care (München) bezogen.

Protran® Nitrocellulosemembran	Schleicher&Schüll (Dassel)
Filterpapier	Schleicher&Schüll (Dassel)
Sterilfilter 0,45 µm / 0,22 µm	Costar (Cambridge, MA USA)
Dialysekammern	PIERCE, Perbio (St. Augustin)
Säulchen für Proteinkonzentrierung	Nanosep 10 K, Pall GmbH (Dreieich)
Whatman 3MM Papier	Whatman (Maidstone)

4.14 Lösungen und Puffer

Aprotinin (1000 x)	5 mg/mL in 50% Glycerin/PBS
Äquilibrierungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl
bakterieller Lysepuffer (DHS/DOHH)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8.0
bakterieller Lysepuffer (eIF-5A)	10 mM PBS pH 7.4, 1 mM DTT, 5mM EDTA, 2,6 mM MnCl ₂ , 26 mM MgCl ₂
Coomassie-Färbelösung	0,5% (w/v) Coomassie Blau R250; 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
DHS-Assaypuffer	0,1 M Glycin-NaOH, pH 9.0
DNA Ladepuffer (5 x)	50% Glycerin; 20 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA; 0,01% Bromphenolblau
DOHH-Assaypuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.4
E1A Lysepuffer	50 mM HEPES-KOH pH 7.5; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) NP-40; Protease-Inhibitoren
FACS-Puffer	2% FKS; 1 mM EDTA in PBS
Faktor Xa Reaktionspuffer	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂
Gel-Entfärber	25% Isopropanol; 10% Essigsäure; 65% H ₂ O
Kristallviolett-Lösung	0,5% (v/v) Kristallviolett-Stammlösung (0,025% (w/v), Kristallviolett in 5% Ethanol) in Wasser
Leupeptin (1000 x)	5 mg/mL in 50% Glycerin/PBS
Lysepuffer Anheftungsassay	0,5% NP-40 in PBS
MNT-Puffer	30 mM MES, 100 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4
Mowiol	0,2 M Tris-HC, pH 8.5; 12% (w/v) Mowiol 4-88; 30% (w/v) Glycerin

Material

NP1-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 1 mM Imidazol, pH 8.0
NP250-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0
NP5-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8.0
p24 ELISA Blockpuffer	10% (v/v) NKS in PBS
p24 ELISA Entwicklungspuffer	0,1 M Natriumacetat pH 6.0, TMB (10 mg/mL DMSO) 1:100 (v/v), 30% H ₂ O ₂ 1:5000
p24 ELISA Waschpuffer	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS
PBS	120 mM NaCl; 17 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7.2
PBS/Heparin	Liquemin N10.000 (1:2000) in PBS
Pefabloc (200 x)	25 mg/mL in 50% Glyzerin/PBS
Pepstatin A (200 x)	1 mg/mL in Methanol
Ponceau S	2% (w/v) Poceau S; 30% (w/v) Trichloressigsäure; 30% (w/v) Sulfosalicylsäure
SDS Laufpuffer	250 mM Tris-HCl; 1,92 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS
SDS Sammelgelpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6.8
SDS Trenngelpuffer	1,875 M Tris-HCl, pH 8.8
SDS-Ladepuffer (6x)	250 mM Tris-HCl pH 8.8; 10% (w/v) SDS; 36% (v/v) Glycerin; 600mM DTT; 0,01% Bromphenolblau
SEAP-Puffer	2M Diethanolamin ACS reagent; 2mM MgCl ₂ ; 20 mM L-Homoarginin
TAE (50x)	2,0 M Tris, 1 M Na-Acetat pH 7.4; 50 mM EDTA
Tbf I	30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl ₂ ; 100 mM KCl; 10 mM CaCl ₂ ; 15% w/v Glyzerin
Tbf II	10 mM MOPS pH 7.0; 75 mM CaCl ₂ ; 10 mM KCl; 15% w/v Glyzerin
TBS (10x)	1,5 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 7.6
Waschpuffer 1 (eIF-5A)	50 mM PBS pH 7.4, 1 mM DTT, 5 mM EDTA
Waschpuffer 2 (eIF-5A)	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA
Western Blot Puffer	250 mM Tris-HCl; 1,92 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS; 20% Methanol
<i>Working buffer</i>	10 mL Z-Puffer, 8 µL 10% SDS; 28 µL β-Mercaptoethanol
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ ; 40 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM KCl; 1 mM MgSO ₄

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien zur Transformation

50 mL Thym-Broth-Medium wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes von einer Stammplatte (10 mM MgSO₄, ohne Antibiotikum) angeimpft und etwa 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 mL Thym-Broth-Medium (ohne Antibiotikum) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5-0,6 bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Der Ansatz wurde anschließend für 20 min bei 4°C inkubiert, 15 min bei 4°C und 3.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 150 mL eiskaltem, sterilem TbfI-Puffer resuspendiert und bei 0°C für 30 min inkubiert. Die Suspension wurde erneut 15 min bei 4°C und 3.000 x g zentrifugiert und die Bakterien in 20 mL 0,1 M TbfII-Puffer aufgenommen. Dieser Ansatz wurde in Aliquots von 200 µL in sterilen 1,5 mL Reaktionsgefäßen bei -80°C aufbewahrt.

5.1.2 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Für die Transformation wurden 200µL kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 0,5 µg Plasmid - DNA, bzw. dem gesamten Ligationsansatz versetzt, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz im Wasserbad 2 min auf 42°C erwärmt (Hitzeschock), anschließend 1 min in einem Eisbad abgekühlt, zu 0,5 mL (Ligationsansatz) oder 1 mL (Plasmid-DNA) LB-Medium (ohne Antibiotikum) gegeben und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 90 min wurden 50 µL der Bakterien auf Antibiotikum-haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Klone wurden auf das Vorhandensein von rekombinanter DNA mit Hilfe der Plasmidisolierung und anschließender Restriktionsanalyse untersucht.

5.1.3 Kultivierung von Bakterien zur Plasmidisolierung

Zur Vermehrung der *in vitro* rekombinierten Plasmide dienten die *E.coli*-Stämme XL10-Gold, JM101 und Stbl3. Alle verwendeten Plasmide enthielten entweder das Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenzgen. Dementsprechend wurden die plasmidtragenden Bakterien auf LB-Agarplatten bzw. in LB-Flüssigmedium mit 100 mg/L Ampicillin oder 30 mg/L Kanamycin kultiviert. 5 mL Übernachtskulturen in LB-Medium dienten als Vorkultur für präparative Plasmidisolierungen. Zur Extraktion größerer DNA-Mengen wurden 500 mL LB-Medium in sterilen Erlenmeyerkolben mit jeweils 5 mL Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C 12-16 h im Schüttelinkubator propagiert. Für die Langzeitlagerung wurden 750 µL der Bakteriensuspension mit 750 µL sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

Die Plasmid Präparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit selektiver Denaturierung und Renaturierung von Plasmid-DNA. Die Isolierung der DNA erfolgte nach den Herstellerangaben des DNA-Mini- und Maxipräparations Kits (Qiagen, Hilden).

5.1.4 DNA-Standardmethoden

- Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen mit einem Beckman DU 640 Spektralphotometer (Beckman Coulter, Krefeld).
- Restriktionsanalysen mit Enzymen von Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Ipswich, MA) nach den Angaben der Hersteller.
- Dephosphorylierungen mit alkalischer Kalbsphosphatase (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.
- Agarose-Gelelektrophorese (Biorad, München).
- Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen mit dem DNA-Gel Extraktionskit bzw. dem PCR-Purifikationskit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.
- Fällung von Nukleinsäuren mit 10% 5 M NaCl und 2,5x Volumen Ethanol; Entfernung von Salzen mit 70% Ethanol.
- Ligationen mit dem Rapid-DNA-Ligation-Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

5.1.5 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Für die Hybridbildung von Oligonukleotiden auf Grund von Basenkomplementarität wurden äquimolare Mengen der Oligonukleotide in einem Gesamtvolumen von 20 μL für 5 min auf 95°C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz bei ausgeschaltetem Wasserbad über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.1.6 Isolierung von RNA

Die gesamtzelluläre-RNA wurde mit Hilfe des TRIFast Reagenz (Peqlab, Erlangen) isoliert. Hierfür wurden die Zellen in 1 mL TRIFast aufgenommen, 5 min bei RT inkubiert und mit 200 μL Chloroform versetzt. Zur vollständigen Phasendurchmischung wurden die Ansätze kräftig geschüttelt und erneut 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 12.000 $\times g$ und 4°C, wurde die obere klare RNA-haltige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß mit 500 μL Isopropanol pipettiert. Nach einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur wurde die gefällte RNA 15 min bei 20.000 $\times g$ und 4°C zentrifugiert und einmal mit 1 mL 80% (v/v) Ethanol gewaschen. Die isolierte RNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 20 μL RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

5.1.7 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit dem *QIAmp DNA (Blood) Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aus $2\text{-}5 \times 10^6$ Zellen isoliert. Zur Maximierung der Konzentration der erhaltenen genomischen DNA im finalen Eluat wurden zur Elution 50 μL Nuklease-freies Wasser verwendet und die Proben bei 4°C gelagert.

5.1.8 Reverse Transkription von mRNA

Zur Untersuchung der Genexpression wurde isolierte mRNA mit der reversen Transkriptase des M-MLV (*moloney murine leukemia virus*, Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben in cDNA überführt. Es wurden 20 μL Reaktionen angesetzt, die 1 μg RNA, 100 U reverse Transkriptase, 100 pmol Oligo(dT) und 20 nmol dNTPs in mitgeliefertem Reaktionspuffer enthielten. Die Verwendung eines Oligo(dT)-Primers ermöglicht die reverse Transkription aller polyadenylierten mRNAs. Dafür wurde folgendes Programmprofil verwendet:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	Vorgang
1	25°C	10 min	Hybridisierung Primer/RNA
1	42°C	90 min	cDNA-Synthese
1	95°C	5 min	Enzyminaktivierung
1	4°C	∞	

Nach der reversen Transkription wurden die Proben zur Fällung mit 250 μL H_2O , 30 μL 5 M NaCl und 700 μL Ethanol versetzt und mindestens 30 min bei -80°C inkubiert. Danach wurde die cDNA 30 min bei 20.000 $\times g$ und 4°C zentrifugiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μL Nuklease-freiem Wasser aufgenommen.

5.1.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient zur spezifischen Amplifikation von DNA-Sequenzen *in vitro*, mit Hilfe von thermostabilen Polymerasen. In einem zyklischen Prozess, der sich aus Denaturierung, *Primer*-Hybridisierung und Elongation zusammensetzt, kommt es zur Amplifizierung der spezifischen DNA in einem PCR *Cycler*, dafür wurde das Gene Amp PCR System 9700 von Applied Biosystems eingesetzt. Ein exemplarisches Programm wird in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Zykluszahl	Temperatur	Dauer	Vorgang
1	95°C	5 min	Initiale Denaturierung
	96°C	30 sec	Denaturierung
20-40	56°C	30 sec	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	2 min	Elongation
1	72°C	10 min	Finale Elongation
	4°C	∞	

Die Hybridisierungstemperatur richtet sich hierbei nach der Schmelztemperatur T_m der verwendeten Primer, die über die Wallace-Regel $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$ abgeschätzt wurde.

Für analytische semiquantitative PCRs wurde die *Taq* Polymerase in einem 2,5x Mastermix (5 Prime, Hamburg), verwendet. Sollte das PCR-Produkt in einen Vektor kloniert werden, wurden die Primer mit Überhängen versehen, die benötigte Restriktionsschnittstellen enthielten. Es wurden Polymerasen mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Korrekturlesefunktion), wie die Pwo-Polymerase (Roche, Mannheim) oder die Phusion-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland), eingesetzt. Die Reaktionszusammensetzungen und Programmprofile wurden den Bedürfnissen der unterschiedlichen Polymerasen nach den Angaben der Hersteller angepasst.

Für PCRs mit genomischer DNA als Vorlage wurden die Denaturierungs- und Hybridisierungszeiten wegen der höheren Komplexität der DNA auf jeweils 1 min verlängert. Enthielt die zu amplifizierende DNA einen hohen Anteil an Guanosin- und Cytidinresten wurde 1 M Betain (N,N,N-Trimethylglycin) oder 5% DMSO zum PCR-Ansatz zugesetzt. Beide Agenzien erleichtern das Aufschmelzen der DNA. DMSO trennt dabei die Basenpaarung, während Betain den Anteil der GC- und AT-Basenpaarung an der Stabilität des DNA-Doppelstrangs ausgleicht.

5.1.10 Semiquantitative *nested*-PCR

Integrierte Provirus-DNA wurde in einer hochspezifischen *nested*-PCR nachgewiesen. Das Prinzip dieser PCR-Variante basiert auf der Anreicherung des gesuchten DNA-Fragments in einer ersten *outer*-PCR mit flankierenden Primern für die Zielregion. Das PCR-Produkt dieses ersten Schrittes dient als *template* für eine zweite *nested*-PCR, in der mit spezifischen Primern das gesuchte Fragment nachgewiesen wird. Der *sense* Primer der *outer*-PCR hybridisierte hier an eine Sequenz im HIV-1 3'-LTR, während der *antisense* Primer komplementär zu der repetitiven Alu-Sequenz war, die im Humangenom vielfach vorkommt. Das Primerpaar für die *nested*-PCR band im HIV-1 3'-LTR. Die *outer*-PCR wurde mit 3 µg genomischer DNA, 100 pmol Primer und dem 2,5x *Taq*-Polymerase Mastermix (5 Prime, Hamburg) in 50 µL angesetzt und nach unten aufgeführtem Programmprofil

durchgeführt. Für die *nested*-PCR wurden 5 µL der *outer*-PCR als *template* verwendet. Das Programm ist in der folgenden Tabelle gezeigt.

<i>outer</i> -PCR			<i>nested</i> -PCR		
1x	95°C	5 min	1x	95°C	5 min
	54°C	2 min		54°C	2 min
	72°C	4 min		72°C	4 min
30x	95°C	1 min	55x	95°C	50 sec
	54°C	1 min		54°C	50 sec
	72°C	3 min		72°C	1 min
1x	72°C	10 min	1x	72°C	10 min
	4°C	∞		4°C	∞

5.1.11 Quantitative *Realtime* PCR

Bei der *Realtime* PCR ist es möglich, die DNA-Ausgangsmenge der eingesetzten Probe zu bestimmen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Einsatz fluoreszierender Reporterfarbstoffe, die eine Verfolgung der Reaktion in Echtzeit (engl. *realtime*) ermöglicht. Die Farbstoffmoleküle interkalieren in die sich bildende doppelsträngige DNA oder werden bei der Elongation freigesetzt, wodurch mit fortschreitender PCR-Reaktion das Fluoreszenzsignal proportional zur DNA-Menge ansteigt. Je nach Wahl der Farbstoffe können diese nicht spezifisch (SYBR®-Green) oder spezifisch (TaqMan™-Sonde) mit dem Produkt interagieren.

Die relative Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten *Threshold Cycle* oder C_t -Wert. Dieser entspricht jenem PCR Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Durch serielle Verdünnung eines Standardplasmids, das die zu amplifizierende Sequenz trägt, und Zuordnung der *template*-Mengen zu ihren entsprechenden C_t -Werten kann eine Standardkurve erstellt werden. Anhand dieser Standardkurve ist wiederum ein Rückschluss von bekannten C_t -Werten auf DNA-Proben unbekannter Konzentration relativ zur Standardkurve möglich.

Aufgrund der höheren Spezifität wurden in dieser Arbeit ausschließlich fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, die zwischen dem verwendeten Primerpaar hybridisiert. Die Sonde enthält am 5'-Ende ein Molekül 6-Carboxyfluorescein (FAM, Donor) und am 3'-Ende ein Molekül Tetramethylrodamin (TAMRA, Akzeptor), das im Ausgangszustand die nach Anregung ausgestrahlte Fluoreszenz von FAM über einen FRET-Effekt (*Förster resonance energy transfer*) absorbiert. Hierdurch ist kein Signal detektierbar, was als „Quenchen“ bezeichnet wird. Wird die Sonde während der Elongation durch die

5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase abgebaut, befinden sich Donor- und Akzeptor-Fluorochrom nicht mehr in ausreichender Nähe für ein Quenchen und ein Fluoreszenzsignal wird messbar.

Für die Reaktionen wurde der *Platinum qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dies erforderte das folgende Zwei-Schritt PCR-Profil, bei dem die Primer-Hybridisierung und die Elongation bei gleicher Temperatur stattfinden, was die Dauer der PCR insgesamt verkürzt. Die Reaktion wurde in einem 7500 Fast Realtime PCR System (Applied Biosystems) im 96-Lochformat durchgeführt.

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	Vorgang
1	95°C	3 min	Initiale Denaturierung
40	96°C	15 sec	Denaturierung
	60°C	30 sec	Hybridisierung und Elongation

5.1.12 Herstellung von pSUPER Konstrukten für die RNA Interferenz (RNAi)

Die Methode der RNAi ermöglicht es, die Expression spezifischer Gene zu inhibieren. Zur Expression von shRNA (*short hairpin RNA*) spezifisch gegen DOHH mRNA wurde das pSUPER Expressionsplasmid von Brummelkamp et al. (2002) verwendet, bei dem die shRNA Transkription von einem H1-Promotor angetrieben wird. Die shRNA-Sequenzen wurden durch Hybridbildung der synthetischen Oligonukleotide DHH_1127_Sup_s und DHH_1127_Sup_as bzw. DHH_985_Sup_s und DHH_985_Sup_as (Kap. 4.5) erhalten, und über die Restriktionsschnittstellen BglII und HindIII in den entsprechend geschnittenen und aufgereinigten pSUPER-Vektor inseriert.

5.1.13 Generierung von pSilencer Konstrukten für die RNAi

Alternativ zu den pSUPER Vektoren wurden kommerzielle pSilencer 1.0-U6 Vektoren (Ambion, Darmstadt) verwendet, um siRNA gegen DOHH mRNA transient zu exprimieren, der zur Transkription der shRNA einen murinen U6-Promotor verwendet. Hierfür wurden die synthetischen Oligonukleotide DHH_1127_Sil_s und DHH_1127_Sil_as bzw. DHH_985_Sil_s und DHH_985_Sil_as hybridisiert und über die Restriktionsschnittstellen ApaI und EcoRI in den entsprechend vorbereiteten Vektor ligiert.

5.1.14 Konstruktion von lentiviralen shRNA-Vektoren

Um die Effizienz der RNAi zu erhöhen, wurden lentivirale Vektoren mit siRNA-Kassetten gegen DOHH spezifische mRNA verwendet. Es wurden vier Vektoren mit zwei unterschiedlichen siRNA-Sequenzen gegen DOHH (pG-SUP_DOHH_985 und pG-SUP_DOHH_1127 sowie pG-Sil_DOHH_985 und pG-SSil_DOHH_1127) und als Kontrolle ein Vektor mit einer siRNA Sequenz gegen Luciferase (pG-

siLuciferase) konstruiert. Dazu wurde die komplette siRNA-Kassette inklusive Promotor aus den vorhandenen pSUPER-Vektoren mittels Restriktionsspaltung mit XbaI und XhoI ausgeschnitten und in den entsprechend vorbereiteten lentiviralen Vektor pG ligiert. Die entsprechenden siRNA-Kassetten aus den pSilencer Vektoren wurden über BamHI in den pG-Vektor inseriert.

5.1.15 Konstruktion von lentiviralen miRNA-Vektoren

Als Alternative zu den auf shRNA-basierenden Vektoren wurden mit Hilfe des *BLOCK-iT Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System* (Invitrogen, Karlsruhe) miRNA exprimierende lentivirale Vektoren konstruiert. Dafür wurden komplementäre Oligonukleotide mit den miRNA Sequenzen hybridisiert und in bereits linearisierte pCDNA6.2-GW/±EmGFP miR Vektoren ligiert. Diese exprimieren eine bicistronische mRNA, die für die entsprechende miRNA und EmGFP als Markergen kodiert. EmGFP konnte durch Restriktionsverdau mit DraI und Religation des Vektors entfernt werden. Weiterhin konnten die miRNA Expressionskassetten verkettet werden, so dass von einer mRNA verschiedene miRNA prozessiert werden können. Dafür wurde eine miRNA-Kassette mit BamHI und XhoI aus dem Ursprungsvektor ausgeschnitten und in den mit BglII und XhoI verdauten Zielvektor eingefügt. Dies ist möglich, da BamHI und BglII nach dem Schneiden identische Nukleotidüberhänge hinterlassen. Aus diesen miRNA Expressionsvektoren wurde durch Gateway-Klonierung nach Angaben des Herstellers die miRNA Kassette über zwei Rekombinations- und Selektionsschritte in den lentiviralen Zielvektor pLenti6/V5-DEST kloniert, der das Blasticidin-Resistenzgen für eine antibiotische Selektionierung enthält.

5.1.16 Generierung eines DOHH-Expressionsvektors

Als Positivkontrolle für die Testung der anti-DOHH Seren wurde das *dohh* Gen aus HeLa Gesamt-RNA Zellextrakten nach Reverser Transkription durch Amplifikation der *dohh* cDNA mit spezifischen Primern gewonnen. Hierfür wurde die Pwo-Polymerase verwendet und dem Ansatz wegen des hohen GC-Anteils des *dohh* Gens 1 M Betain zugesetzt. Die Primer enthielten Überhänge mit Restriktionsschnittstellen für HindIII und XhoI. Hierüber wurde das PCR-Fragment in einen entsprechend gespaltenen pcDNA3.1-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) inseriert.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Suspensionszelllinien PM1, CEM-SS, Jurkat TAg und Jurkat 1G5 wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Als Medium diente RPMI-1640 (Lonza). Bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/mL wurden die Kulturen 1:3 bis 1:10 verdünnt und weiterkultiviert.

5.2.2 Kultivierung von adhärennten Zellen

Die adhärennten Zelllinien HeLa, 293T, TZM-bl, Vero und BHK-21 wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und einer humiden Atmosphäre (95% relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Als Medium diente DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*, Biochrom, Berlin) bzw. für BHK-21 und Vero Zellen MEM (*Modified Eagle Medium*, Biochrom, Berlin). Die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin) vom Kulturflaschenboden abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin/EDTA mit einem 10-fachen Überschuss von auf 37°C temperiertem Kulturmedium inaktiviert und die resuspendierten Zellen in einer Dichte von 10-20% neu ausgesät.

5.2.3 Isolierung und Kultivierung von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*)

Zur Isolierung von PBMCs wurden *Buffy Coats* (50 mL Plasma- und Erythrozyten-freies Blut) aus dem Blutspendezentrum des Universitätsklinikums Eppendorf verwendet. Für die Zellisolierung wurde das Blut zunächst 1:1 mit PBS/Heparin vermischt und in einem Ficoll-Gradienten aufgereinigt. Dafür wurden 15 mL Biocoll (Biochrom, Berlin) mit 30 mL des Blutgemisches überschichtet und 30 min bei 150 x g ohne Bremswirkung am Ende zentrifugiert. Anschließend wurden die PBMCs aus der Interphase aufgenommen, mit 30 mL PBS gewaschen und in RPMI-1640, das mit 30 U/mL rekombinantem IL-2 (rIL-2, Biomol, Hamburg) supplementiert war, aufgenommen. 4x10⁶ Zellen wurden in 35 mm Schalen ausgesät. An jedem dritten Tag wurde das rIL-2 haltige Medium erneuert.

5.2.4 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren wurden 5x10⁶ Zellen/mL in einer vorgekühlten Lösung aus 10% (v/v) DMSO und 90% (v/v) FKS aufgenommen und in Kryoröhrchen (Nunc, Langenselbold) pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden in einer auf 4°C vorgekühlten Kryobox (Stratagene, La Jolla, CA), die ein langsames Einfrieren (1°C/min) ermöglicht, 24 h bei -80°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gehalten.

Die eingefrorenen Zellen wurden möglichst schnell bei 37°C aufgetaut und in vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Zum Entfernen des DMSO wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischem, warmem Kulturmedium aufgenommen und kultiviert.

5.2.5 Transfektion von 293T Zellen mit PEI

293T-Zellen wurden mittels PEI (Polyethylenimin, 1 mg/ml, Polysciences, Eppelheim) transient transfiziert. Bei PEI handelt es sich um ein kationisches Polymer, welches im Komplex mit DNA durch Endozytose in die Zellen aufgenommen wird. Anschließend findet eine Fusion mit zellulären

Lysosomen statt. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes innerhalb der Lysosomen quillt das PEI-Polymer auf, was schließlich zur Zerstörung der Lysosomen und Freisetzung der DNA in der Zelle führt.

Für die Transfektion wurden 35 mm Platten oder 10 cm Zellkulturschalen verwendet. Pro 35 mm wurden am Abend vor der Transfektion 4×10^5 Zellen, pro 10 cm Schale 4×10^6 293T-Zellen in DMEM ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 50-70% konfluent. Vor der Transfektion wurde das Medium der 10 cm Schalen gegen 5 mL frisches Medium ausgetauscht. Das Medium in 35 mm-Platten wurde beibehalten.

In einem sterilen 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden für eine 10 cm Schale 12 µg DNA in 1 mL Opti-MEM resuspendiert, anschließend mit 48 µL PEI versetzt und sofort durch Vortexen gemischt. Für ein 35 mm wurden 2 µg DNA und 8 µL PEI in einem Gesamtvolumen von 200 µL verwendet. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde das Transfektionsgemisch vorsichtig auf die Zellen getropft und diese für 6 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde das Kulturmedium gewechselt (DMEM mit Antibiotika) und die transfizierten Zellen nach 48-72 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ geerntet.

5.2.6 Transfektion von HeLa Zellen mit TurboFect oder TransIT

Für die transiente Expression von Proteinen und Reporterkonstrukten in HeLa Zellen wurden 20 h vor der hierfür durchzuführenden Transfektion 2×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 35 mm Platte in DMEM ohne Antibiotika ausgesät. Die Zellen wurden mit TurboFect (Fermentas, St. Leon-Rot) oder TransIT LT1 (Mirus, Madison, WI) nach Herstellerangaben transfiziert. Standardmäßig erfolgte 6 h nach der Transfektion ein Mediumwechsel in DMEM mit Antibiotika. Nach 48-72 h wurden die Zellen geerntet.

5.2.7 Transfektion von siRNA und esiRNA in HeLa Zellen mit Lipofectamin 2000

Die Transfektion von siRNA und esiRNA wurde mit HeLa Zellen im 24 mm Format durchgeführt. Dazu wurden am Abend vor der Transfektion 1×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät und die Zellen vor der Transfektion für 1 h in DMEM ohne FKS ausgehungert. Pro Vertiefung wurden 100 pmol siRNA oder esiRNA mit 2 µL Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 48 h wurde ein Teil der Zellen für die Überprüfung des DOHH *knockdowns* geerntet, die Zellen passagiert und erneut mit siRNA bzw. esiRNA transfiziert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen geerntet.

5.2.8 Zell-Zell-Fusionsanalyse

Für der Untersuchung der Wirkung der SALP auf die Zell-Zell-Fusion wurden 4×10^5 293T Zellen 1 µg pcTat und 1 µg pNL4-3 Env oder 1 µg parentalem Vektor pBC12 unter Verwendung von PEI transfiziert. Nach 20 h wurden die transfizierten Zellen und 1×10^6 Jurkat 1G5 Luciferase Reporterzellen getrennt voneinander mit 20 µg/mL SALP, Kontrollpeptid oder unbehandelt für 1 h bei 37°C

inkubiert und anschließend für 24 h bei 37°C kokultiviert. Aus den zellulären Lysaten wurde die Luciferase-Aktivität mit dem Luciferase Assay System (Promega, Mannheim) gemessen.

5.2.9 AlamarBlue/MTT Viabilitätsassay

Um zu bestimmen, in welchen Konzentrationen die untersuchten Substanzen toxisch auf die Zellen wirkten, wurde der AlamarBlue Viabilitätsassay (AbD Serotec, Düsseldorf) durchgeführt, der quantitativ die Proliferation der behandelten Zellen durch Farbumschlag bei der Reduktion des Farbindikators Resazurin zu Resorufin anzeigt und somit ein Parameter für die metabolische Aktivität der Zelle darstellt. Hierzu wurden alle 100 µL Zellsuspension mit 20 µL AlamarBlue Lösung versetzt und nach 3h Inkubation im Brutschrank die Extinktion in einem Platten-Spektralphotometer (Versamax, Molecular Devices, Ismaning) bei 570/600 nm bestimmt und behandelte mit unbehandelten Zellen verglichen. Alternativ dazu wurden MTT-Assays (Roche, Mannheim) durchgeführt, die auf einem ähnlichen Prinzip basieren. Hierbei wird das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan reduziert. Zu 100 µL Zellsuspension wurden 10 µL MTT-Lösung pipettiert und die Zellen für 4 h im Brutschrank inkubiert. Die gebildeten Kristalle wurden über Nacht in 100 µL Lösungspuffer (0,01 M HCl, 10% SDS) im Brutschrank gelöst und die Absorption bei 560 nm spektral vermessen.

5.2.10 FACS-basierte Zell-Zyklus-Analyse

Zur Analyse des Einflusses von Inhibitoren auf das Profil der Zellzyklus-Phasen wurde eine Propidiumiodidmarkierung durchgeführt. Hierzu wurden 5×10^5 Zellen einmal mit 5 mL kaltem PBS gewaschen, bei 300 x g und 4°C pelletiert und in 500 µL PBS/0,1% EDTA resuspendiert. Zum Fixieren der Zellen wurde anschließend 5 mL eiskalter 80% Ethanol zugetropft, die Zellen 20 min auf Eis inkubiert und für 48 h bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen auf 4°C erwärmt, bei 300 x g und 4°C pelletiert und mit 5 mL PBS/0,1% EDTA gewaschen. Zur Färbung mit Propidiumiodid (PI, Sigma, München) wurde das Pellet mit 100 µL PI-Lösung versetzt (33 µg/mL PI, 333 µg/mL RNase A (Qiagen, Hilden) in PBS) und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dabei lagert sich PI in DNA ein, während die RNA durch die RNase A abgebaut wird, um falschpositive Signale durch PI Wechselwirkung mit RNA zu minimieren. Das PI-Signal ist proportional zur DNA-Menge und wurde in einem FACS Canto Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) aufgenommen.

5.2.11 FACS-basierte Apoptose-Untersuchung

Mit ausgewählten Substanz-Konzentrationen wurden Apoptose-Tests in PBMCs oder Jurkat T-Zellen durchgeführt. Diese basieren auf der Markierung von Phosphatidylserin mit Annexin V als Indikator für apoptotische Zellen und einer Markierung der DNA unfixierter Zellen mit PI oder 7-AAD (7-Aminoactinomycin, Invitrogen, Karlsruhe) als Indikator für Zellen mit perforierter Plasmamembran,

also toten Zellen. Hierfür wurde der entsprechende *Dead Cell Apoptosis* Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Kontrolle für apoptotische Zellen wurde eine Probe über Nacht mit 10 μM (Jurkat TAg) bzw. 40 μM (PBMCs) des Topoisomerase I Hemmers Camptothecin (Sigma, München) behandelt, was zu DNA Einzel- und Doppelstrangbrüchen und infolgedessen zur Apoptose führt. Als Kontrolle für nekrotische Zellen wurden diese für 2 h mit 10-20% Ethanol behandelt. Die Auswertung erfolgte mit einem FACS Canto Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg).

5.2.12 p24-ELISA

Sowohl die Viruslast im Kulturüberstand infizierter Zellen, als auch die Konzentration von Lentivirusproduktionen wurde durch Bestimmung des p24-Gehaltes ermittelt. Hierfür wurde ein *Sandwich*-ELISA verwendet, bei dem zuerst ein muriner gegen das p24-Capsidprotein gerichteter Antikörper (anti-183) in einer Konzentration von 2 μg /Vertiefung in PBS in einer 96-Loch-MaxiSorp Flachbodenplatte (Nunc, Langenselbold) immobilisiert wurde. Die Kulturplatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 3x mit Waschpuffer (PBS/0,05% [v/v] Tween 20) gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verringern, wurde für 2 h bei 37°C mit 10% (v/v) NKS/PBS inkubiert und danach 3x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die inaktivierten Kulturüberstände in geeigneten Verdünnungen auf die beschichtete ELISA-Platte aufgetragen. Als Standard wurde parallel dazu eine Verdünnungsreihe definierter rekombinanter p24 Kapsidmengen in Duplikaten verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurde die Kulturplatte zum Entfernen von ungebundenem p24-Kapsidprotein erneut 3x gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Kapsids wurde zuerst mit einem zweiten Kapsidantikörper aus Kaninchen (1:1000 verdünnt in Waschpuffer) für 1h bei 37°C inkubiert, 3x gewaschen und danach ebenfalls für 1 h bei 37°C mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper (1:2000 verdünnt in Waschpuffer) inkubiert. Nach den beiden Antikörperinkubationen wurde 3x mit Waschpuffer und einmal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Zugefügtes Tetramethylbenzidin (TMB) in Entwicklungspuffer (0,1 M Natriumacetat pH 6,0, TMB [10 mg/mL DMSO] 1:100 [v/v], 30% H₂O₂ 1:5000) wurde durch die Peroxidase in einen blauen Farbstoff umgesetzt. Nach 5 min wurde diese Reaktion mit 0,5 M Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein gelber Farbumschlag erfolgte, dessen Extinktion bei 450 nm gegen 560 nm im Versamax Mikroplattenleser (Molecular Devices, Ismaning) gemessen wurde. Die p24-Konzentration wurde aus den gemessenen Extinktionswerten mit Hilfe einer Standardkalibriergeraden unter Berücksichtigung der Verdünnung ermittelt.

5.2.13 CAT-ELISA

Die Analyse der CAT-Reporterengenaktivitäten erfolgte mit Hilfe des CAT-ELISA Kits (Roche, Mannheim) aus den Zelllysaten nach Angaben des Herstellers. Die Farbreaktion am Ende dieses Sandwich-ELISAs konnte spektrometrisch bei 405 nm aufgezeichnet werden.

5.2.14 SEAP-Reporterassay

Zur Transfektionskontrolle von sezernierten Reporterprodukten diente SEAP (*Secreted placental alkaline phosphatase*), die in den Kulturüberstand sekretiert wird. Für die Analyse der SEAP-Aktivität wurden 250 µL Überstand für 5 min bei 65°C inkubiert und im Anschluss bei 20.000 x g für 2 min zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 100 µL mit 100 µL 2xSEAP -Puffer versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wird 20 µL des SEAP-Substrates Paranitrophenol (120 mM) zugegeben und der einsetzende Farbumschlag nach gelb bei 405 nm spektrometrisch detektiert.

5.2.15 β-Galaktosidaseassay

Um artifizielle Effekte aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen auszuschließen, wurde neben den CAT-Reporterkonstrukten stets ein Expressionsplasmid für β-Galaktosidase als interne Kontrolle mitgeführt. Zur Analyse der β-Galaktosidase-Aktivität wurden 20 µL Zell-Lysat mit 205 µL Arbeitspuffer und 20 µL CPRG (Chlorophenolrot-β-D-Galaktopyranosid, Roche, Mannheim) 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 Zelllysat H₂O eingesetzt. Der Farbumschlag wurde anschließend spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden.

5.2.16 Luciferaseassay

Die Luciferaseanalyse wurde mit Hilfe des Luciferase Reporter Assay Systems (Promega, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 25 µL (96-Loch-Format) bzw. 500 µL (35 mm Format) RLP Lysepuffer lysiert. Dazu wurden die Platten 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. 96-Loch-Platten konnten daraufhin direkt vermessen werden. Zelllysate aus 35 mm Platten wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert, um die festen Bestandteile zu sedimentieren. Je 10 µL des Überstandes wurden in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte überführt und in ein Centro LB 960 Luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad) eingelegt. Zur Messung wurden pro Vertiefung je 50 µL des Substratpuffers zugefügt und das luminometrische Signal mit einer Verzögerung von 2 sec für 10 sec gemessen. Die Steuerung der Messung sowie die Auswertung der Leuchtreaktion erfolgten über das gerätespezifische Computerprogramm MikroWin2000.

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Für die Gewinnung von Proteinlysate für Westernblot-Analysen wurden adhärenente Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen bevor sie anschließend in 500 µL PBS mit Hilfe eines Gummischabers von der Platte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt wurden. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (5 min bei 500 x g und 4°C) wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Zellpellet entweder bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Zur Zellyse wurden je nach Zellmenge 50 - 300 µL E1A-Puffer mit Proteaseinhibitoren zugegeben, die Zellen kurz resuspendiert, und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Proteinlösung zur Scherung der genomischen DNA 3x mit 10 Impulsen sonifiziert (Branson Sonifier B12, Danbury, USA) und anschließend 15 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand (Lysat) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

5.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration des Gesamtzellextraktes wurde nach der Bradford Methode bestimmt (Bradford, 1976). Dafür wurden 2 µL der Proteinlösung zu 1 mL Bradford Reagenz (Biorad, München, 1:5 mit Wasser verdünnt) pipettiert. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Als Nullwert diente die Absorption von verdünntem Bradford Reagenz mit 2 µL E1A-Lysis-puffer. Mit Hilfe einer vorher ermittelten BSA-Kalibrierungsgerade konnte die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden.

5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Die Gele wurden in Mini-Protean Gelkammern (Biorad, München) hergestellt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 20 mA pro Gel. Die Proteinlösungen wurden vor der Auftrennung mit 6x Laemmli-Ladepuffer versetzt und zur Denaturierung für 5 min bei 95°C erhitzt.

5.3.4 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Färbung der Gele erfolgte mindestens 15 min unter leichtem Schwenken in der Coomassie-Färbelösung. Anschließend wurden die gefärbten Gele mehrmals mit Gel-Fixierlösung behandelt und schließlich für 1h mit Wärme bei 70°C auf einem Gelrockner getrocknet.

5.3.5 Westernblot

Die Expression von endogenen und überexprimierten Proteinen wurde mit Hilfe von Westernblotanalysen nachgewiesen. Nach Trennung der zu analysierenden Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine durch Semi-Dry-Blot (Biorad, München) auf eine Protran Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen. Der Transfer wurde durch Färbung der Membran in Ponceau S-Färbelösung kontrolliert. Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Membran in 5% Magermilchpulver/TBS-T für 30 min geschwenkt. Die Primärantikörper wurden in 5% Magermilchpulver/TBS-T verdünnt und über Nacht mit der Membran bei 4°C leicht geschwenkt. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 3x 10 min mit TBS-T gewaschen. Es folgte 1 h Inkubation mit dem Sekundärantikörper (konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase oder IRDye Infrarot-Farbstoffen), der ebenfalls in 5% Magermilchpulver/TBS-T verdünnt war. Dann wurde wieder 3x 10 min mit TBS-T gewaschen. Für die Peroxidase-Licht-Reaktion wurden die beiden ECL-Entwicklerlösungen (Pierce, Bonn) 1:1 gemischt und 1 min mit der Membran inkubiert. Mit der auftretenden Chemilumineszenz wurde anschließend ein Röntgenfilm belichtet und an einem Agfa Classic E.O.S. Entwickler sichtbar gemacht. Alternativ wurden die Signale der mit IRDye gekoppelten Sekundärantikörper (Licor, Bad Homburg) mit dem Licor Odyssey Imaging System visualisiert und quantifiziert. Die Membran wurde nach erneutem Absättigen in Milchpulverlösung für die Inkubation mit weiteren Antikörpern wieder verwendet.

5.3.6 Affinitätschromatographische Aufreinigung eines Antikörpers gegen humane DOHH

Aus den Antisera von Kaninchen, die mit Peptiden der humanen DOHH inokuliert wurden, sollten spezifische Antikörper affinitätschromatographisch angereichert werden. Hierfür wurde das SulfoLink Coupling Gel (Pierce, Bonn) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip basiert darauf, dass die für die Immunisierung der Kaninchen verwendeten Peptide über einen N-terminalen Cysteinrest durch eine Disulfidbrücke an das Gel gekoppelt werden. Freie Bindungsstellen werden mit reinem Cystein geblockt und das so präparierte Gel mit dem Antiserum inkubiert und anschließend gewaschen. Die gebundenen Antikörper werden mittels pH-Sprung von der Säule eluiert und die Konzentration der Elutionsfraktionen mit einem Bradford-Tüpfeltest (90 µL 1:5 verdünnte Bradford-Lösung + 10 µL Eluat) abgeschätzt. Positive Fraktionen werden vereinigt, über Nacht gegen PBS eluiert, mit 50% Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

5.3.7 Expression und Aufreinigung von humanem eIF-5A

Zur Reinigung von GST-eIF-5A-Fusionsprotein wurden *Escherichia coli* BL21 (DE3) mit pGEX-eIF-5A Expressionsplasmiden transformiert. 50 mL LB-Flüssigmedium mit 100 µg/mL Ampicillin wurden mit einer frisch transformierten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag mit LB Medium 1:10 verdünnt, weiterkultiviert und bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 zur Expression von GST-eIF-5A mit 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) versetzt. Nach 4-stündiger Expression bei 37°C wurden die Bakterien für

15 min bei 3.000 x g und 4°C pelletiert, in 40 mL Lysepuffer (10 mM PBS pH 7.4, 1 mM DTT, 5mM EDTA, 2,6 mM MnCl₂, 26 mM MgCl₂) mit 0,5 µg/mL DNase und Proteaseinhibitoren (0,1 mM PMSF, 2 µg/mL Leupeptin, 2 µg/mL Aprotinin) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 3x für 10 sek auf Stufe 4-5 sonifiziert (Branson Sonifier B12, Danbury, USA). Dem Lysat wurde 1% TritonX-100 zugefügt und die festen Bestandteile durch Zentrifugation für 15 min bei 13.000 x g und 4°C abgetrennt. Das Lysat wurde auf 1mL Glutathionsepharose 4B (Amersham Biosciences, Freiburg), die vorher mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5 / 500 mM NaCl äquilibriert wurde, gegeben und 1 Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, wobei die GST-Fusionsproteine an das Glutathion gebunden wurden. Danach wurde die Glutathionsepharose mit dem Lysat in eine Chromatographiesäule überführt. Daraufhin wurde die Sepharose mit 100 mL Waschpuffer 1 (50 mM PBS pH 7.4, 1 mM DTT, 5 mM EDTA) und anschließend mit 150 mL Waschpuffer 2 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA) gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden mit Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM reduziertes Glutathion) eluiert. Der Überschuss an Glutathion führt dabei zu einer Verlagerung der Bindung des GST-Proteins von der Glutathionsepharose an das freie Glutathion, so dass die gebundenen Fusionsproteine wieder in Lösung vorliegen. Die einzelnen Eluat-Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung kontrolliert, geeignete Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen Faktor Xa Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) dialysiert. Mit der Bradford-Methode wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Zur Abspaltung des GST-Proteins wurde 2,5 µL Faktor Xa (50 mU/µL, Sigma, München) pro mg GST-eIF-5A eingesetzt. Die Spaltung wurde für 16 h bei RT durchgeführt und das GST-Spaltprodukt aus dem Reaktionsansatz durch Inkubation mit Glutathionsepharose über Nacht gebunden. Nach Zentrifugation von 5 min bei 1.000 rpm wurde die Sepharose abgetrennt. Die Reinheit des verbliebenen eIF-5A wurde mittels SDS-PAGE ermittelt und das Protein über Nacht gegen den Assaypuffer der DHS Reaktion (0,1 M Glycin-NaOH, pH 9.0) dialysiert. Eine abschließende Konzentration mit Centricon Säulen (Millipore, Schwalbach) ergab eine finale Konzentration von 0,88 µg/µL eIF-5A. Kleine Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

5.3.8 Expression und Aufreinigung von humaner DHS

Für die rekombinante Aufreinigung von DHS wurde das gefrorene Pellet einer 25 mL Kultur von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS verwendet, die zuvor mit pet15b-DHS transformiert, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und mit 0,5 mM IPTG die DHS-Expression für 4 h bei 37°C induziert wurden. Der pet15b Vektor (Novagen, Nottingham, UK) enthält eine N-terminale 6xHis-Sequenz und einen bakteriellen T7-Promotor. Das Pellet wurde in 630 µL Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) resuspendiert, 80 µL Lysozym (10 mg/mL) und 3 µL Benzonase (25 U/µL) aufgenommen und die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min sonifiziert

(60 Zyklen bei 80% Intensität) und für 30 min bei 12.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Zwischenzeitlich wurde eine Nickel-NTA *spin column* (Qiagen, Hilden) mit 600 µL NPI-1 Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 mM Imidazol, pH 8.0) äquilibriert und bei 3.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Daraufhin wurde 600 µL Lysat auf die Säule gegeben und 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Von dem Eingangslysate und den Durchläufen wurden jeweils 10 µL abgenommen und auf ein analytisches 12% SDS-Gel geladen. Die Nickel-NTA Säule wurde nun zweimal mit 600 µL NPI-5 Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8.0) gewaschen und jeweils 2 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Die Elution erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 300 µL NPI-250 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0) und Zentrifugation für je 2 min bei 3.000 rpm.

Für die DHS-katalysierte Modifikation von eIF-5A musste der Puffer des Eluates der Nickel-NTA Säule gewechselt werden. Dies wurde über eine Puffer-Austausch-Chromatographie mit Illustra NAP-Säulen (Qiagen, Hilden) erreicht. Hierfür wurde die Säule zunächst mit 10 mL DHS-Assaypuffer (0,1 M Glycin-NaOH Puffer, pH 9.5) äquilibriert und anschließend vorsichtig 0,5 mL des DHS enthaltenden Eluates der Nickel-NTA Aufreinigung auf das Gelbett aufgetragen, in das Gel einlaufen lassen und mit 1 mL DHS-Assaypuffer wieder eluiert. Die Konzentration wurde nach Bradford bestimmt und betrug am Ende 37 ng/µL His-DHS.

5.3.9 Expression und Aufreinigung von humaner DOHH

Für die rekombinante Aufreinigung von DHS wurde das gefrorene Pellet einer 25 mL Kultur von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS verwendet, die zuvor mit pet28a-DOHH transformiert, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und mit 0,5 mM IPTG die DHS-Expression für 4 h bei 37°C induziert wurden. Der pet28a Vektor (Novagen, Nottingham, UK) enthält eine N-terminale und eine C-terminale 6xHis-Sequenz sowie einen bakteriellen T7-Promotor. Für die Aufreinigung der DOHH wurde die N-terminale Histidin-Sequenz gewählt. Die Lyse, Nickel-NTA-Aufreinigung und Puffer-Austausch-Chromatographie erfolgte wie für die DHS beschrieben, mit der Ausnahme, dass der DOHH-Assaypuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) für die Umpufferung verwendet wurde. Als finale Konzentration ergab die Bestimmung nach Bradford einen Wert von 23 ng/µL His-DOHH.

5.3.10 DHS Aktivitätsassay

Die Analyse der DHS-Aktivität in Gegenwart von potenziellen Inhibitoren der DHS wurden *in vitro* mit rekombinant aufgereinigten Proteinen und radioaktiv markiertem Spermidin durchgeführt. Der so markierte Aminobutylrest wird in der Reaktion auf den Lys⁵⁰-Rest von eIF-5A übertragen, das auf einen Filter immobilisiert und auf die verbliebene Radioaktivität vermessen wird. In einem Reaktionsansatz wurden 2 µg eIF-5A, 1 µg DHS, 2 µCi [¹⁴C]-markiertes Spermidin, 1 mM NAD⁺, 1 mM DTT und

50 µg/mL BSA in 300 mM Glycin-NaOH pH 9.0 in einem Volumen von 200 µL für 1 h bei 37°C allein oder in Anwesenheit der DHS-Inhibitoren inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µL unmarkiertem Spermidin (20 mM) gestoppt und über trockene GSWP02500 Filter (Millipore, Schwalbach) filtriert, die vorher für 1 h mit 20 mM Spermidin geblockt wurden. Die Filter wurden an der Luft getrocknet und in Szintillationsröhrchen überführt, mit 4 mL Szintillationslösung überschichtet und das [¹⁴C]-Signal in einem Beckman Coulter LS65000 Szintillationszähler detektiert.

5.3.11 DOHH Aktivitätsassay

Für den DOHH Aktivitätsassay musste zunächst das Substrat der DOHH, Deoxyhypusin-modifiziertes eIF-5A in einer DHS-Reaktion hergestellt und isoliert werden. Dafür wurde die Reaktion wie oben beschrieben in einem Reaktionsvolumen von 200 µL zusammengesetzt. Nur wurden hier 83 µg eIF-5A, 2,6 µg DHS und 40 µM nicht markiertes Spermidin verwendet und die Reaktion bei 37°C über Nacht durchgeführt. Das eIF-5A Zwischenprodukt wurde in zwei aufeinanderfolgenden Größenausschlusschromatographien isoliert. Dafür wurden zunächst eine 100 kDa Microcon- und danach eine 30 kDa Microcon-Säule von Amicon (Millipore, Schwalbach) verwendet. Der DHS-Reaktionsansatz wurde komplett in die 100 kDa Säule überführt, 12 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zur Elution wurden 100 µL H₂O in die Säule pipettiert und für 30 sec inkubiert. Anschließend wurde die Säule invertiert und der Inhalt für 3 min bei 1.000 x g und 4°C in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Mit der 30 kDa Säule wurde auf die gleiche Weise verfahren und das Ergebnis in einem 12% SDS-Gel überprüft. Die Konzentration des Eluats betrug 1,27 µg/µL Deoxyhypusin-modifiziertes eIF-5A (Dhp-eIF-5A). Für die DOHH-Reaktion wurden pro Ansatz 12,5 µg Dhp-eIF-5A, 3 µg His-DOHH, je 1 mM NAD⁺ und DTT in DOHH Assaypuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) in 150 µL Gesamtvolumen eingesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden dabei drei Reaktionen angesetzt: komplett, komplett mit JK8-2 als Inhibitor und eine Reaktion ohne DOHH und ohne Inhibitor. Das Hypusin-modifizierte eIF-5A wurde daraufhin wie oben beschrieben über Größenausschlusschromatographie isoliert und für 24 h bei 110°C in 6 M HCl hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde über eine Amberlite CG-210 Kationenaustausch-Chromatographie-Säule gereinigt. Hierfür wurde die Säule nacheinander mit je 10 mL 2 M NaOH, H₂O, 6 M HCl und 2x mit H₂O äquilibriert und anschließend die Probe aufgetragen. Die Säule wurde mit 5x 1 mL H₂O gewaschen und die Aminosäuren mit 2x 1 mL 7 M NH₄OH und anschließend 500 µL H₂O eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert und die Peptide mit Hilfe des *AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit* (Waters, Eschborn) mit 6-Aminochinoly-N-hydroxysuccinimidyl-carbamat (AQC) in eine für die UPLC-Analyse gängige Form überführt. Die Firma Waters wurde daraufhin mit der UPLC-Analyse der derivatisierten Aminosäuren beauftragt. Als Standard für die Messung wurde, neben einer Mischung sämtlicher natürlicher Aminosäuren, gereinigtes Deoxyhypusin (Dhp) verwendet, da das Endprodukt Hypusin nicht

verfügbar ist. Von der gemessenen Menge an Dhp aus den DOHH-Reaktionen kann so auf die Aktivität der DOHH geschlossen werden.

5.4 Mikroskopie

5.4.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung der Verteilung von Pep19-2.5 wurde dieses mit einem N-terminalen NBD-Rest (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol) versehen und 1 h bei 37°C mit auf Deckgläschen gewachsenen TZM-bl Zellen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mehrfach mit PBS gewaschen, mit 3% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und die Membran mit dem lipophilen Farbstoff Dil (Molecular Probes) gefärbt. Zellkerne wurden durch Behandlung mit Draq5 (Cell Signaling, Frankfurt a. M.) sichtbar gemacht, die Zellen daraufhin in Mowiol eingebettet und bei 4°C gelagert. Die Aufnahmen erfolgten an einem Zeiss CLSM510 Meta Konfokalmikroskop. Exemplarisch wurden z-Stapel einzelner Zellen aufgezeichnet und mit der 3D-Rekonstruktion der Bitplane Imaris 6.4.2 Software prozessiert.

5.4.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Direkte Darstellungen von Pep19-2.5 konnten durch korrelative Elektronenmikroskopie (EM) gewonnen werden. Hierfür wurde eine 20 µg/mL konzentrierte Peptidlösung in kapillare Mikroröhrchen eingeschlossen und mit 2% PFA fixiert. Für das Aussehen von Pep19-2.5 auf Zellen wurde 2×10^5 TZM-bl Zellen in 35 mm IBIDI Schälchen mit optischem Boden und Rastergitter ausgesät und mit 20 µg/mL einer N-terminal Rhodamin-markierten Variante von Pep19-2.5 für 1 h bei 37°C behandelt oder als unbehandelte Kontrolle eingesetzt. Die Verwendung des Rhodamin-Peptids und des Rasters im Boden der IBIDI Schale ermöglichte das Lokalisieren markierter Zellen im Fluoreszenzmikroskop und das spätere zielgerichtete Schneiden dieser Zellen für die EM-Aufnahmen. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 2,5% Glutaraldehyd (GA) fixiert. Alternativ wurden TZM-bl Zellen mit Rho-Pep19-2.5 wie oben inkubiert, gewaschen und mit einem monoklonalen anti-Rhodamin Mausantikörper (Klon 11H10, 1:100, Antikörper-Online, Aachen) gefärbt, gewaschen und schließlich mit einem sekundären Ziege anti-Maus Antikörper behandelt, der mit 10 nm kolloidalem Gold markiert war. Nach erneutem Waschen wurden diese Zellen ebenfalls mit 2,5% GA fixiert. Die folgenden Schritte wurden von Barbara Holstermann, FG Elektronenmikroskopie, am HPI durchgeführt. Die fixierten Proben wurden in einem EPON Harz (Carl Roth, Karlsruhe) eingebettet und für ultra-dünne Schnitte prozessiert. Die Schnitte wurden mit 2% Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. EM Aufnahmen wurden an einem Philips CM 120 TEM bei 80 kV unter Verwendung einer Gatan Multiscan 794 Kamera durchgeführt.

5.5 Virologische Methoden

5.5.1 Produktion von HIV-1 Partikeln

Infektiöse HIV-1 Partikel wurden durch transiente Transfektion von 293T Zellen mit den entsprechenden proviralen Plasmiden mittels PEI gewonnen. Dafür wurden 4×10^6 293T Zellen in 10 mL am Abend vor der Transfektion in 10 cm Schalen ausgesät. Von den Plasmiden pNL-BaL(env) und pNL4-3 wurden je 12 µg mit 48 µL PEI (Polysciences, Eppelheim) in 1,2 mL Opti-MEM (Gibco, Eggenstein) vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Inzwischen wurde das Kulturmedium gegen 5 mL frisches DMEM ohne Antibiotika ausgetauscht, der Transfektionscocktail tropfenweise hinzugegeben und die Zellen für 8 h bei 37°C inkubiert, bevor erneut das Medium durch 5 mL frisches Medium ersetzt wurde. Drei Tage nach Transfektion wurden die virushaltigen Kulturüberstände durch 0,22 µm Sterilfilter (Millipore, Schwalbach) passiert, aliquotiert, bei -80°C gelagert und die Virusmenge im p24 Antigen-ELISA bestimmt.

5.5.2 Produktion von pseudotypisierten retroviralen Partikeln

Für die Transduktion von Zellen mit shRNA bzw. miRNA Expressionskassetten wurden retro- bzw. lentivirale Vektoren verwendet, die zusammen mit Verpackungsplasmiden in 293T Zellen kotransfiziert wurden. Für die Verpackung kamen bei den 29mer shRNA tragenden retroviralen Vektoren die *gagpol* Gene des Moloney-Maus Leukämie-Virus zum Einsatz (pSV-MoMLVgagpol), während für lentivirale Konstrukte (miRNA, Mission shRNA) die *gagpol* Gene aus HIV-1 (pDMLg/pRRE) zusammen mit einem Expressionsplasmid für Rev (pRSV-Rev) verwendet wurden (Dull et al., 1998). Sowohl retro- als auch lentivirale Partikel wurden mit dem Hüllprotein des Vesikular Stomatitis Virus, VSV-G (pCMV-VSV-G), pseudotypisiert (Beyer et al., 2002). Hierdurch ist eine Transduktion nahezu aller Zelltypen möglich.

Für die Transfektion wurden 4×10^6 am Vorabend in 10 cm Schalen ausgesäte 293T Zellen mit jeweils 6 µg viralem Vektor, 3 µg *gagpol* Plasmid, 1,5 µg VSV-G Vektor sowie im Falle der lentiviralen Vektoren 1,5 µg Rev Plasmid kotransfiziert. Die DNA wurde zusammen mit 48 µL PEI (Herstellung lentiviraler Partikel) bzw. 42 µL PEI (Herstellung retroviraler Partikel) in 1 mL Opti-MEM angesetzt, der Transfektionsmix nach 10 min bei RT tropfenweise auf Zellen mit 5 mL Antibiotika-freiem DMEM pipettiert und für 8 h inkubiert. Drei Tage später wurde der zellfreie Überstand geerntet, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.5.3 Infektion adhärenter und Suspensionszelllinien mit HIV-1

Die Infektion von adhärenenten Zellen erfolgte durch Inkubation von 1-5 ng p24 des verwendeten HIV-Stamms für 3-5 h bei 37°C in Abwesenheit von Polybren (Sigma, München). Danach wurde das virushaltige Medium gegen frisches Kulturmedium ersetzt.

Suspensionszellen wurden 5 min bei 1.200 rpm pelletiert, das Medium dekantiert und je nach Zellmenge in 100-500 µL RPMI resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 1-5 ng des entsprechenden HIV-Stamms versetzt und für 3-5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde durch zweimaliges Waschen mit 30 mL PBS residuales Virus entfernt und die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen.

5.5.4 Transduktion von adhärennten Zelllinien mit lentiviralen Vektoren

Adhärennte Zellen wurden subkonfluent in 35 mm Schalen transduziert, indem sie mit 1 mL Virusüberstand und 2 µL Polybren (Sigma, München) 90 min bei 2.000 rpm spinokuliert und anschließend weitere 4 h bei 37°C inkubiert wurden. Daraufhin wurden die Zellen über Nacht in frischem DMEM kultiviert und, je nach verwendetem Vektor 24 h später die Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum begonnen oder nach 48 h auf GFP Expression analysiert und gegebenenfalls durchflusszytometrisch auf GFP-positive Zellen angereichert.

5.5.5 Luciferase-Reporter Infektionsassay

Die Wirkung der SALP auf frühe Ereignisse im HIV-1 Lebenszyklus wurde mit TZM-bl Reporterzellen durchgeführt. 10^4 Zellen wurden pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte ausgesät und am folgenden Tag mit unterschiedlichen Konzentrationen an SALP oder Kontrollpeptid für 1 h bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben infiziert und die Luciferase-Aktivität 24 h später mit dem *Luciferase Assay System* (Promega, Mannheim) aus den Lysaten bestimmt.

5.5.6 HIV-1 Anheftungsassay

Die Analyse des Einflusses der SALP auf die Anheftung von HIV-1 Partikeln an ihre Zielzellen erfolgte mit konfluent ausgesäten TZM-bl Zellen in 35 mm Schalen (Saphire et al., 1999). Diese wurden für 1 h bei 37°C mit 20 µg/mL SALP, Kontrollpeptid oder Medium allein inkubiert und danach auf 4°C gekühlt. Je Schale wurden 20 ng p24 HIV-1 BaL für 30 min mit den Zellen bei 4°C inkubiert und anschließend wurden durch fünfmaliges Waschen mit kaltem PBS nicht gebundene Viruspartikel entfernt. Die Zellen wurden in 500 µL 0,5% NP-40/PBS 20 min bei 4°C lysiert, abgeschabt und 5 min bei 14.000 rpm und 4°C pelletiert. Aus dem zellfreien Lysat wurde die p24 Antigenmenge in einem ELISA bestimmt.

5.5.7 Produktion von HSV-1 und HSV-2 Partikeln

HSV-1 und HSV-2 Partikel wurden wie bereits beschrieben hergestellt (Sodeik et al., 1997). Dafür wurden BHK-21 Zellen bei 37°C bis zur Konfluenz kultiviert und mit einer Multiplizität der Infektion (MOI, *multiplicity of infection*) von 0,1 pfu/Zelle in 5 mL RPMI je 175 cm² Flasche für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden 25 mL MEM hinzugefügt und nach drei Tagen der virushaltige

Kulturüberstand gesammelt. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zellen und Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 4.500 x g für 10 min entfernt und die Viruspartikel aus dem Überstand in einem JA-25.50 Rotor (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA) bei 17.000 x g für 70 min pelletiert. Das Viruspellet wurde vorsichtig in MNT-Puffer aufgenommen. Die Suspension aus 20 Flaschen wurde auf einen linearen 10-40% (w/v) Sukrosegradienten in MNT Puffer aufgetragen und in einem Beckman SW28 Rotor bei 40.000 x g für 40 min zentrifugiert. Die virus-haltige Bande in der Mitte des Gradienten wurde durch Lichtstreuung detektiert, isoliert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Alle Experimente wurden mit Gradienten-gereinigtem Virus durchgeführt.

5.5.8 Bestimmung von HSV Plaque-Titern

Die Plaque-Titer wurden wie zuvor beschrieben bestimmt (Döhner et al., 2002). Hierfür wurden Vero Zellen konfluent in 35 mm Schalen ausgesät und mit 10-fach Virusverdünnungen in RPMI mit 0,2% (w/v) BSA, 20 mM HEPES, pH7.0 für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurde das Inokulum entfernt und die Zellen mit 25 µg/mL vereinigten humanen IgGs (Sigma) in MEM überlagert. Die Zellen wurden für weitere 2 Tage bei 37°C kultiviert und in absolutem Methanol (-20°C) für 2-3 min fixiert. Die Zellen wurden luftgetrocknet, mit 1 mL Kristallviolett für 10 min angefärbt und nach Trocknung der Zellen die Plaques der Virusverdünnung gezählt, bei der die Plaques vereinzelt waren. Der Titer wird als *plaque forming units* pro mL ausgedrückt (pfu/mL). Die erhaltenen Virustiter lagen für HSV-1 bei $1,3 \times 10^9$ pfu/mL und für HSV-2 bei $3,7 \times 10^7$ pfu/mL.

5.5.9 Produktion von tritiierten HSV-1 Partikeln

Für die Untersuchung der Anheftung an und des Eintritts in Zielzellen wurden tritiierte HSV-1 Partikel hergestellt. Dafür wurden drei 175 cm² Flaschen konfluent gewachsener BHK-21 Zellen mit einer MOI von 5 pfu/Zelle in RPMI infiziert. Zwei Stunden nach Infektion wurde das Inokulum entfernt und durch MEM mit 5 mCi [Methyl-³H]-Thymidin (Hartmann Analytic, Braunschweig, Germany) ersetzt. Nach zwei Tagen wurden die Viruspartikel aus dem Kulturüberstand wie zuvor beschrieben geerntet. Die Virionen wurden in MNT-Puffer resuspendiert, durch Zentrifugation bei 30.000 x g für 38 min in einem Beckman SW60 Rotor über einen linearen 10-40% (w/v) Sukrosegradienten in MNT-Puffer aufgereinigt. Die virushaltigen Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.5.10 Infektion von Vero Zellen mit HSV-1 und HSV-2

Für die HSV-1 und HSV-2 Infektion wurden Vero Zellen verwendet, die in 23 mm Kulturschalen konfluent ausgesät wurden. Sie wurden vor der Infektion für 1 h bei 37°C mit 20 µg/mL SALP oder Kontrollpeptid behandelt bzw. nicht behandelt und anschließend auf 4°C gekühlt. Die Infektion

erfolgte durch Inkubation mit den aufgeführten MOI an HSV-1 oder HSV-2 in Gegenwart der Peptide für 2 h bei 4°C, woraufhin die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 18 h bei 37°C inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Zeiss 200M Axiovert dokumentiert, bevor sie lysiert und die Gesamtproteinextrakte in einem Westernblot untersucht wurden.

5.5.11 HSV-1 Anheftungs- und Eintrittsassay

Der Einfluss von SALP auf Anheftung und Eintritt von tritiierten HSV-1 Partikeln wurde durch Infektion von Vero Zellen bestimmt, die für 1 h bei 37°C mit 20 µg/mL bzw. den angegebenen Konzentrationen an SALP oder Kontrollpeptid behandelt wurden. Als weitere Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die Zellen auf 4°C gekühlt und für 2 h auf Eis mit den tritiierten HSV-1 Partikeln inkubiert. Für den Anheftungsassay wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen und geerntet. Für die Untersuchung des Viruseintritts wurden die Zellen hiernach für 1 h bei 37°C inkubiert, um die Fusion der gebundenen Viruspartikel mit der Zelle zu ermöglichen. Gebundene, aber nicht fusionierte Viruspartikel wurden durch Behandlung mit 2 mg/mL Proteinase K für 1 h auf Eis entfernt und die Behandlung mit 1 mM des spezifischen Proteaseinhibitors Pefabloc gestoppt. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen geerntet. Die Tritiumaktivität wurde in einem Beckman Coulter LS6500 Szintillationszähler gemessen.

6 Ergebnisse

6.1 Inhibition der Hypusin-Modifikation von eIF-5A

6.1.1 Inhibition der Hydroxylierung von Deoxyhypusin-modifiziertem eIF-5A

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) trägt in seiner aktiven Form die Aminosäure Hypusin, eine Modifikation des Lysin⁵⁰-Restes, die in zwei Schritten von den Enzymen Deoxyhypusinsynthase (DHS) und Deoxyhypusinhydroxylase (DOHH) katalysiert wird. Der erste Schritt der Hypusin-modifikation, die durch die DHS katalysierte Reaktion, ist für den Rev-abhängigen Export unvollständig gespleißter RNAs des feline Immundefizienz Virus (FIV) und des humanen Immundefizienz Virus HIV-1 essenziell (Hart et al., 2002; Hauber et al., 2005). Die Inhibition der DHS führt zur effizienten Hemmung der HIV-1 Replikation (Hauber et al., 2005). Bereits die Verhinderung der Synthese des DHS-Substrates Spermidin durch Hemmung der dafür verantwortlichen S-Adenosylmethionin-Decarboxylase resultiert in einer starken Inhibition der HIV-1 Vermehrung (Schäfer et al., 2006). Auch die Inhibition der DOHH kann die HIV-1 Replikation unterbinden (Clement et al., 2002; Dong et al., 2005; Saeftel et al., 2006; Goebel et al., 2008; Hoque et al., 2009). In Hefe konnte gezeigt werden, dass DOHH-Null Stämme ein normales Wachstum zeigten, während DHS für das Hefewachstum absolut essenziell ist (Sasaki et al., 1996; Park et al., 2006). Die DOHH im Speziellen und die Unterbindung der Hypusin-Modifikation im Allgemeinen stellt deshalb eine potenziell vielversprechende neue Strategie zur antiretroviralen Therapie dar. So resultierte die Adressierung viraler Zielstrukturen in der Therapie oftmals in der Generierung von *Escape*-Virusmutanten durch Anpassung an den Selektionsdruck. Wirtspoteine hingegen, die für den viralen Lebenszyklus essenziell sind, können nicht durch virale Evolution beeinflusst werden (Lederman, 1995; Lederman et al., 2006a). Es muss dabei jedoch sichergestellt werden, dass die Wirtszellfunktion nicht beeinträchtigt wird.

Die bisher beschriebenen Inhibitoren der DOHH zeigten zelltoxische Eigenschaften und führten zu Zell-Zyklus-Arresten (Hanuske-Abel et al., 1994). Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der Tatsache, dass es sich bei diesen Verbindungen um Eisenchelatoren handelt, die eine Komplexierung der zentralen Eisenionen der DOHH zum Ziel haben, aber möglicherweise auch die Funktion anderer zellulärer eisenhaltiger Proteine beeinträchtigen. Bis heute liegt noch keine Kristallstruktur der humanen DOHH vor, so dass die bisherigen strukturellen Untersuchungen auf Sequenz- und Homologievergleichen mit verwandten Monooxygenasen und Reduktasen basieren (Park et al., 2006; Vu et al., 2009). Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass die inhibitorische Wirkung der bisher verwendeten Verbindungen statt durch direkte Inhibition der DOHH auf die Beeinflussung anderer Proteine oder Signalkaskaden zurückzuführen ist. Damit ist weiterhin unklar, ob die

Hydroxylierung von eIF-5A durch die DOHH essenziell für die Funktion von eIF-5A beim Rev-abhängigen Transport viraler RNA ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand zweier Ansätze der Einfluss der Hydroxylierung durch die DOHH auf die eIF-5A Funktion und damit auf die Replikation von HIV-1 untersucht. Zum einen wurde versucht, die DOHH mit verschiedenen Methoden der RNA Interferenz (RNAi) zu depletieren, zum anderen wurden neue, durch rationales Design erhaltene Inhibitoren für die DOHH untersucht.

6.1.1.1 Inhibition der humanen DOHH durch niedermolekulare Verbindungen

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Holzgrabe (Universität Würzburg) wurden neue Leitverbindungen charakterisiert, deren Syntheseprinzip auf Strukturverwandtschaften bereits beschriebener DOHH Inhibitoren basiert. In Abbildung 8 sind drei der bisher beschriebenen Inhibitoren dargestellt. Allen gemein ist ein stickstoffhaltiger Sechsring (Pyridinon, Pyridon, Piperidin), der mit Alkyl- und Sauerstoffsubstituenten derivatisiert ist. Dieses Grundprinzip wurde aufgegriffen und weiterentwickelt. Um die Spezifität für die humane DOHH weiter zu erhöhen, wurden Verbindungen mit weiteren, räumlich anspruchsvolleren Substituenten hergestellt. Die Strukturen von drei der sieben in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen, JK8-2, EHW437 und TG118, sind in Abbildung 9 wiedergegeben. Die Strukturen für die anderen vier Verbindungen sind nicht abgebildet, da sie keine antivirale Aktivität zeigten.

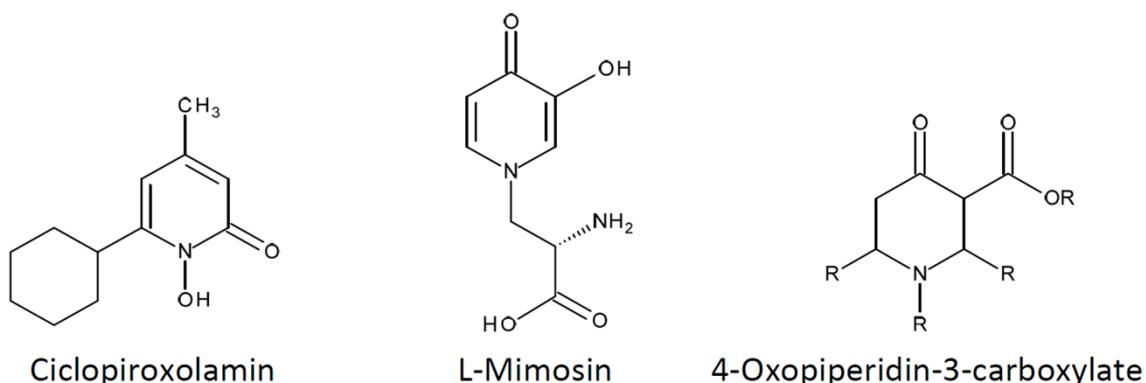


Abbildung 8: Beispiele für bereits beschriebene DOHH Inhibitoren mit postulierten Eisen-chelatisierenden Eigenschaften.

Ermittlung der maximalen subtoxischen Konzentration der Inhibitoren

Vor der funktionellen Charakterisierung der potenziellen DOHH Inhibitoren wurden deren maximale subtoxische Konzentrationen in PM1 Zellen bestimmt. Dafür wurden die Zellen über zwei Wochen mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle kultiviert. Im Abstand von drei bis vier Tagen wurde die Zellviabilität mit Hilfe des AlamarBlue Assays gemessen, die Zellen passagiert und das Kulturmedium inklusive der Wirkstoffe erneuert.

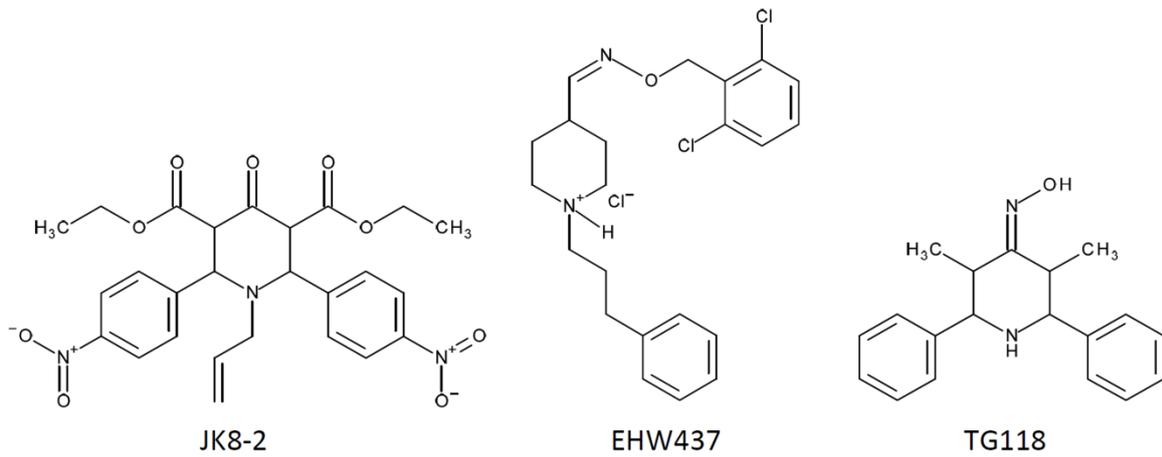


Abbildung 9: Neusynthetisierte Verbindungen zur DOHH-Hemmung.

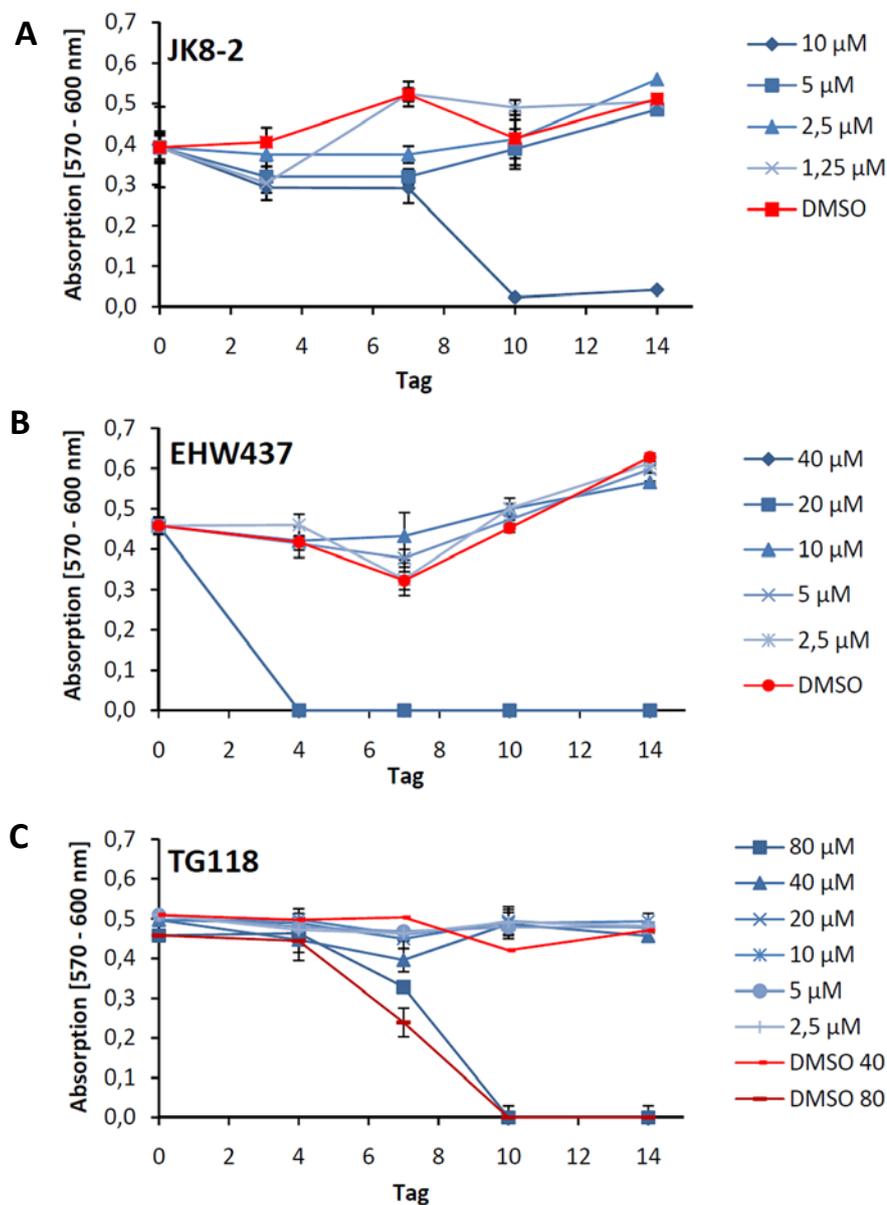


Abbildung 10: Bestimmung der maximal subtoxischen Konzentration von JK8-2 (A), EHW437 (B) und TG118 (C) in PM1 Zellen mit Hilfe des AlamarBlue Assays. PM1 Zellen wurden in Medium mit den angegebenen Konzentrationen der Verbindungen inkubiert. Am Tag einer jeden Probenentnahme für den Viabilitätsassay wurde zudem das Medium gewechselt und frischer Wirkstoff hinzugefügt.

Die maximal tolerierten Konzentrationen waren bei JK8-2 5 μM und bei EHW437 10 μM . Bei der Verbindung TG118 wurde die Toxizität durch die Menge an DMSO determiniert, da die Viabilität der PM1 Zellen bei 80 μM TG118 auch in DMSO behandelten Zellen absank (Abbildung 10). Für weitere Experimente wurde 20 μM TG118 als höchste Konzentration eingesetzt.

Inhibition von HIV-1

Für die Testung der antiviralen Aktivität der potenziellen DOHH Inhibitoren wurden PM1 Zellen mit dem replikationskompetenten HIV-1 Laborstamm BaL infiziert und anschließend in Medium mit verschiedenen Konzentration der Verbindungen kultiviert. Nach drei, sieben und zehn Tagen wurde die Viruspartikelproduktion im Zellkulturüberstand mit Hilfe eines p24 Antigen-ELISAs bestimmt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue Assay kontrolliert. Die erhaltenen Werte wurden in Relation zur Lösungsmittelkontrolle gesetzt (Abbildung 11A).

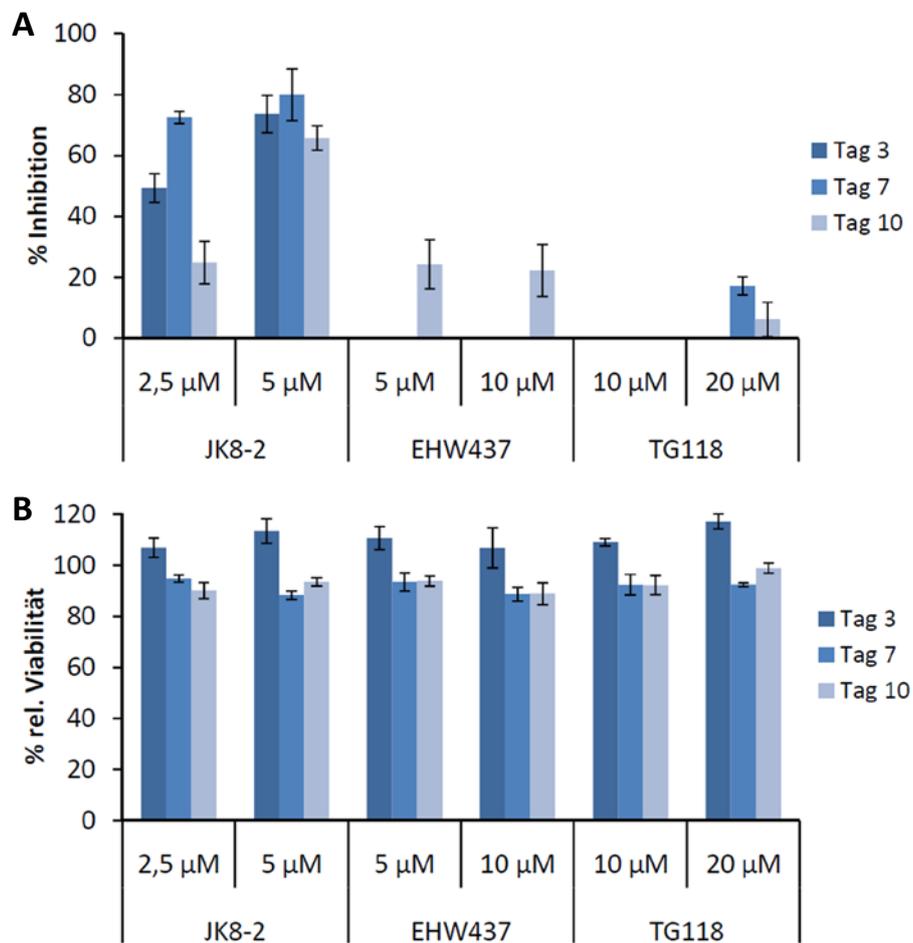


Abbildung 11: Inhibition der Replikation von HIV_{BaL} in PM1 Zellen (A). Zellviabilität der PM1 Zellen nach Behandlung mit den angegebenen Verbindungen (B). 1×10^7 PM1 Zellen wurden mit 5 ng p24 HIV-1 BaL infiziert. 3 h nach Infektion wurde das Medium gewechselt und durch Medium mit entsprechendem Wirkstoff ersetzt. An den Tagen 3, 7 und 10 wurden die Viruslast im Zellkulturüberstand mittels p24-ELISA und die Zellviabilität per AlamarBlue Assay bestimmt.

Während EHW437 und TG118 die HIV-1 Replikation geringfügig hemmten, zeigte sich bei den mit JK8-2 behandelten Zellen eine 65-80% Verminderung der sekretierten Menge an Viruspartikeln bei 5 μ M JK8-2. Bei 2,5 μ M verlief die Hemmung der Replikation bis Tag 7 ähnlich effizient (50-70%), nahm jedoch an Tag 10 deutlich ab. Die eingesetzten Konzentrationen wurden von den PM1 Zellen zu jedem Zeitpunkt gut toleriert (Abbildung 11B).

Einfluss von JK8-2 auf die Rev-Funktion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass JK8-2 in der Lage ist die Replikation von HIV-1 zu hemmen, sollte nun überprüft werden, ob tatsächlich die Funktion von Rev beeinträchtigt wird. Hierfür wurden verschiedene Reporterassays durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob die Behandlung mit JK8-2 einen Effekt auf den Rev-abhängigen oder Rev-unabhängigen Export ungespleißter mRNA besitzt.

Dafür wurden HeLa Zellen für eine Woche mit JK8-2 präinkubiert und mit GPV (Gag-Pol-Vif) Reporter-Konstrukten transfiziert, die entweder das HIV-1 *Rev-Response-Element* (RRE) oder das *Constitutive Transport Element* (CTE) aus dem Mason-Pfizer-Monkey Virus (MPMV) als RNA-Exportelement tragen (Abbildung 12A). Die mRNA des Letzteren wird, wie die große Mehrheit der zellulären mRNA, Rev-unabhängig über den regulären TAP Exportweg transportiert und enthält das CTE in vier aufeinander folgenden Wiederholungen, was die Transporteffizienz gegenüber einer einzigen CTE-Kopie deutlich steigert (Swanson et al., 2004). Diese Konstrukte enthalten zudem HIV-1 Spleißstellen und bilden Virus-ähnliche Partikel (VLP, *virus like particles*). VLPs sind Vesikel, die sich von der Plasmamembran abschnüren und ein HIV-Kapsid beinhalten, jedoch keine viralen Hüllproteine tragen, keine genomische RNA enthalten und somit nicht infektiös sind. Zusammen mit diesen Konstrukten wurde das Rev-Expressionsplasmid sowie ein Expressionsplasmid für die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) als interne Kontrolle kotransfiziert.

Nach 48 Stunden wurden zellfreie Überstände geerntet und die Partikelmenge mittels p24 Antigen-ELISA sowie der SEAP-Gehalt bestimmt. Die Zellen wurden zudem im AlamarBlue Assay auf ihre Lebensfähigkeit getestet. Aus Abbildung 12B geht hervor, dass die Inkubation mit JK8-2 weder einen Einfluss auf den Rev-abhängigen noch auf den Rev-unabhängigen mRNA-Export hat.

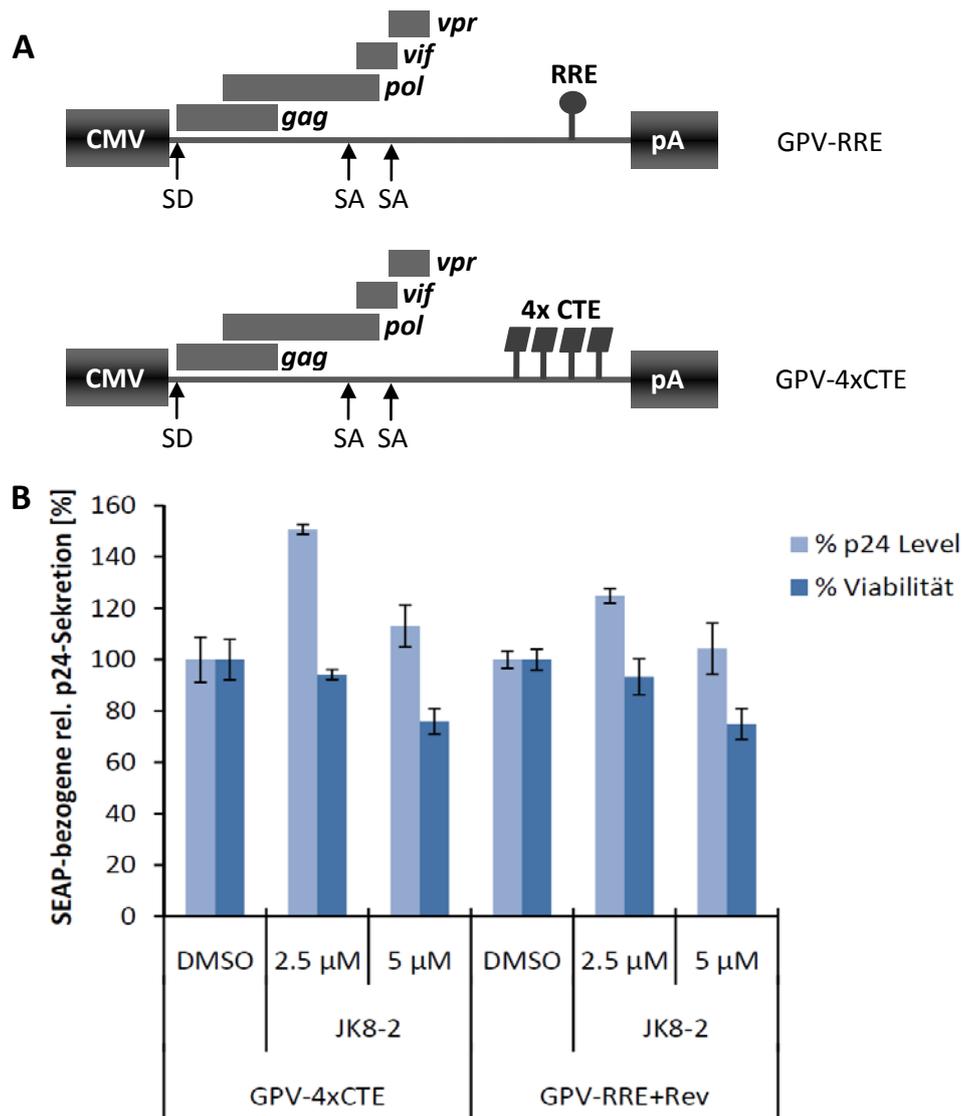


Abbildung 12: Untersuchung des Einflusses der Behandlung mit JK8-2 auf den RNA-Transport. (A) Schematische Darstellung der verwendeten HIV-1 Gag-Pol-Vif (GPV) Konstrukte. Die Transkription der Spleißdonor (SD) und Spleißakzeptor (SA) enthaltenden mRNA wird von einem CMV-IE Promotor reguliert. (B) Nach einer 7-tägigen Vorbehandlung mit JK8-2 oder DMSO wurden HeLa Zellen mit Expressionsplasmiden von entweder GPV-4xCTE oder GPV-RRE und Rev kotransfiziert sowie mit pSEAP als interne Kontrolle und für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die p24 und SEAP Mengen im Überstand gemessen und die Zellviabilität geprüft.

In einem unabhängigen Reporterassay wurde eine mögliche Wirkung auf die Rev-Transaktivierung analysiert. Dafür wurden JK8-2 vorbehandelte HeLa Zellen mit dem proviralen Rev-defizienten Gesamt-HIV-1 Klon HXB2 Δ Bam sowie Rev- und SEAP-Expressionsplasmiden kotransfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellkulturüberstände geerntet, um Viruslast und SEAP-Konzentration zu bestimmen. Dabei wurden die Zellen ebenfalls auf ihre Viabilität getestet. In Abbildung 13 ist eine um etwa 20% verminderte Menge an sekretierten Viruspartikeln bei JK8-2 behandelten Zellen erkennbar. Diese Inhibition ist jedoch weit weniger deutlich, verglichen mit der Inhibition der Virusreplikation in PM1 Zellen von 80% (Abbildung 7A).

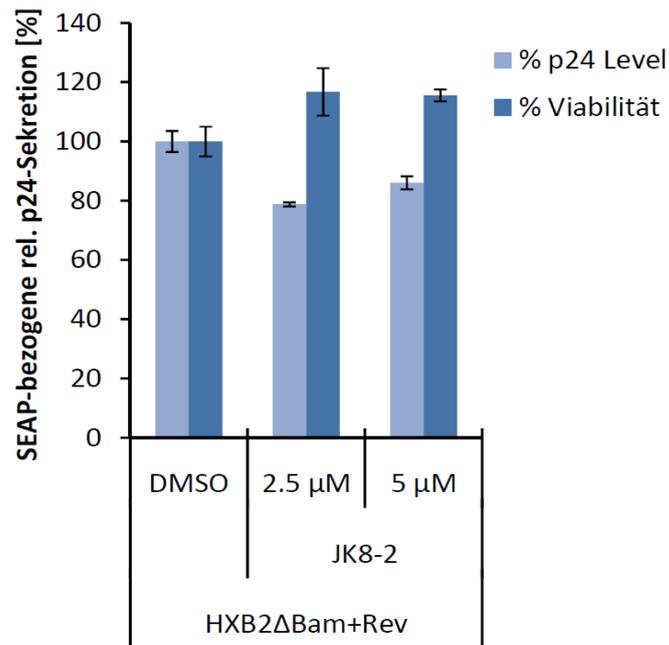


Abbildung 13: Analyse der Rev-Transaktivierung in JK8-2 behandelten Zellen. HeLa Zellen wurden für eine Woche mit JK8-2 oder DMSO präinkubiert und anschließend mit HXB2 Δ Bam und Rev sowie SEAP als Transfektionskontrolle kotransfiziert. Nach 48 h wurden die p24 Mengen der Zellkulturüberstände im ELISA gemessen und auf die gefundenen SEAP-Level normiert. Zusätzlich wurde die Zellviabilität untersucht.

DOHH Spezifitätsassay

Um schließlich die Spezifität von JK8-2 gegenüber der humanen DOHH zu analysieren, wurde in Kooperation mit Frau Prof. Kaiser von der Fachhochschule Köln *in vitro* ein enzymatischer Assay durchgeführt. Dafür wurden zunächst alle beteiligten Proteine, eIF-5A, DHS und DOHH rekombinant in Bakterien exprimiert und chromatographisch aufgereinigt. Das humane eIF-5A wurde mit einem N-terminalen Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsprotein in Bakterien exprimiert. Dies ermöglicht die Reinigung des Proteins über Glutathion-S-Sepharose und die spätere Abtrennung von GST durch die Serin-Endopeptidase Faktor Xa (Abbildung 14).

Sowohl DHS als auch DOHH wurden mit einem 6-fach Histidin-Epitop versehen, ebenfalls bakteriell exprimiert, und mittels Nickel-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abbildung 15).

Zunächst wurde die DHS katalysierte Reaktion simuliert. Dafür wurde die rekombinante DHS zusammen mit rekombinantem eIF-5A, Spermidin, und NAD⁺ bei 37°C inkubiert. Die dabei erhaltene Deoxyhypusin-tragende eIF-5A-Zwischenstufe wurde über Größenausschlusschromatographie isoliert (Abbildung 16) und anschließend für die DOHH Reaktion verwendet.

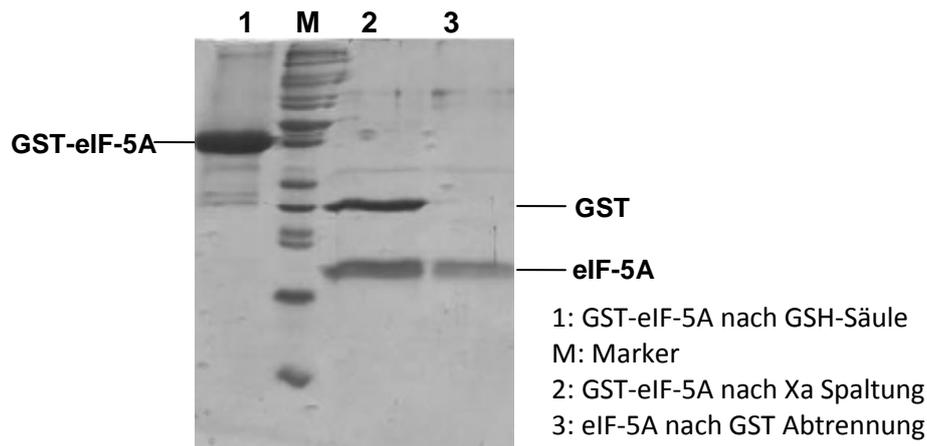


Abbildung 14: Bakterielle Expression und Aufreinigung von rekombinantem eIF-5A. Ein GST-eIF-5A Fusionsprotein wurde aus transformierten *E.coli* BL21 (DE3) (Stratagene) über eine Glutathion-Sepharose Matrix aufgereinigt und gegen Faktor Xa Reaktionspuffer dialysiert (Spur 1). GST wurde anschließend proteolytisch mit Faktor Xa abgespalten (Spur 2). Freies GST wurde durch Inkubation mit Glutathion-Sepharose abgetrennt und das reine eIF-5A (Spur3) mit Centricon-Säulen (Millipore) aufkonzentriert. Die Endkonzentration an eIF-5A betrug $0,88 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

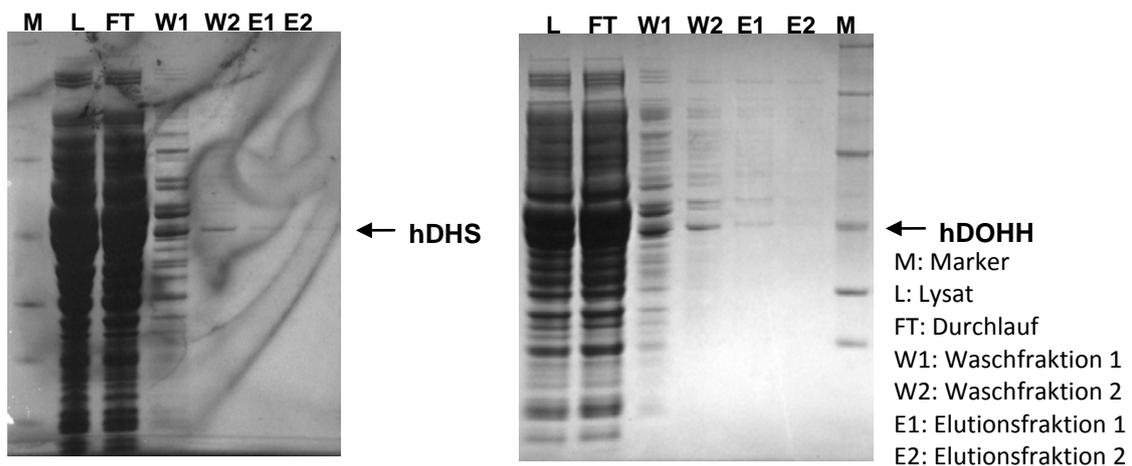


Abbildung 15: Bakterielle Expression und Aufreinigung von rekombinanter DHS und DOHH. Mit einem N-terminalen 6x Histidin Fusionspeptid markierte DHS und DOHH wurden rekombinant in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS (Stratagene) exprimiert, an Nickel-NTA Säulen (Qiagen) gebunden und nach zwei Waschschrritten mit 250 mM Imidazolpuffer eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12% SDS-PAGE Gel aufgetragen. Die Endkonzentrationen betragen für die DHS $37 \text{ ng}/\mu\text{L}$ und für die DOHH $23 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

In der DOHH Reaktion wurden rekombinante DOHH, Deoxyhypusin-modifiziertes eIF-5A, NAD^+ und DTT bei 37°C inkubiert. Vollständig modifiziertes eIF-5A wurde anschließend durch erneute Größenausschlusschromatographie isoliert und für 24 Stunden in Salzsäure in die einzelnen Aminosäuren hydrolysiert. Diese wurden mit einer Kationen-Austauscher Chromatographie weiter gereinigt und anschließend lyophilisiert. Um die Peptide in eine für die UPLC-Analyse gängige Form zu überführen, wurde das *AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit* (Waters) verwendet und die Peptide mit 6-Amino-chinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamat (AQC) derivatisiert. Die Firma Waters (Eschborn) wurde daraufhin mit der UPLC-Analyse der derivatisierten Aminosäuren beauftragt.

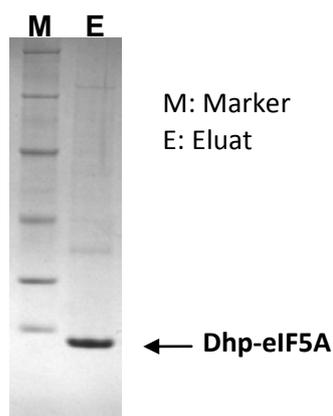


Abbildung 16: Isolierung des Deoxyhypusin-modifizierten eIF-5A für die DOHH-Reaktion. Nach der DHS-katalysierten Reaktion wurde das Deoxyhypusin(Dhp)-modifizierte Produkt zunächst über eine Microcon 100 und anschließend über eine Microcon 30 Ultrafiltrationssäule (beide Amicon) isoliert und auf ein 12% SDS-PAGE Gel aufgetragen.

Da das Endprodukt Hypusin als gereinigte Aminosäure nicht vorlag, wurde als Standard für die Messung neben einer Mischung natürlicher unmodifizierter Aminosäuren auch gereinigtes Deoxyhypusin (Dhp) verwendet. Von der gemessenen Menge an Dhp aus den DOHH-Reaktionen kann so auf die Aktivität der DOHH geschlossen werden. Im Vergleich zur Kontrolle ohne DOHH wird eine Verminderung der Dhp-Menge erwartet, da das vorhandene Dhp durch die DOHH zu Hypusin hydroxyliert wird. Unter Einsatz eines DOHH-Inhibitors wäre demnach ein höherer Dhp-Wert als ohne Inhibitor zu erwarten. Die Ergebnisse der Messung sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Insgesamt wiesen die erhaltenen Mengen für Dhp ein ähnliches Niveau auf. Der Wert für die Kontrollreaktion ohne DOHH, bei der die höchste Dhp-Menge erwartet wurde, war allerdings am niedrigsten. Trotz deutlicher Inhibition der HIV-1 Replikation konnte keine eindeutige Spezifität von JK8-2 für DOHH und eindeutig kein Einfluss auf die Rev-Funktion festgestellt werden. Die Verbindung scheint daher auf anderer Ebene in der HIV-1 Replikation einzugreifen.

Tabelle 1: Auswertung der UPLC-Detektion von Deoxyhypusin nach dem DOHH *in vitro* Aktivitätsassay.

Ansatz	Retentionszeit [min]	Deoxyhypusin [ng/ μ L]
Ohne JK8-2	7,443	0,144
Mit JK8-2	7,443	0,169
Ohne DOHH	7,318	0,133

Eingrenzung des Wirkmechanismus von JK8-2 hinsichtlich der HIV-1 Replikation

Zur näheren Eingrenzung der Funktionsweise von JK8-2 wurde die TZM-bl Reporterzelllinie verwendet, mit welcher frühe Schritte des HIV-1 Lebenszyklus untersucht werden können. TZM-bl sind eine von HeLa Zellen abgeleitete Zelllinie, die durch mehrfache stabile retrovirale Transduktion die für die HIV-1 Infektion notwendigen Oberflächenrezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 exprimieren.

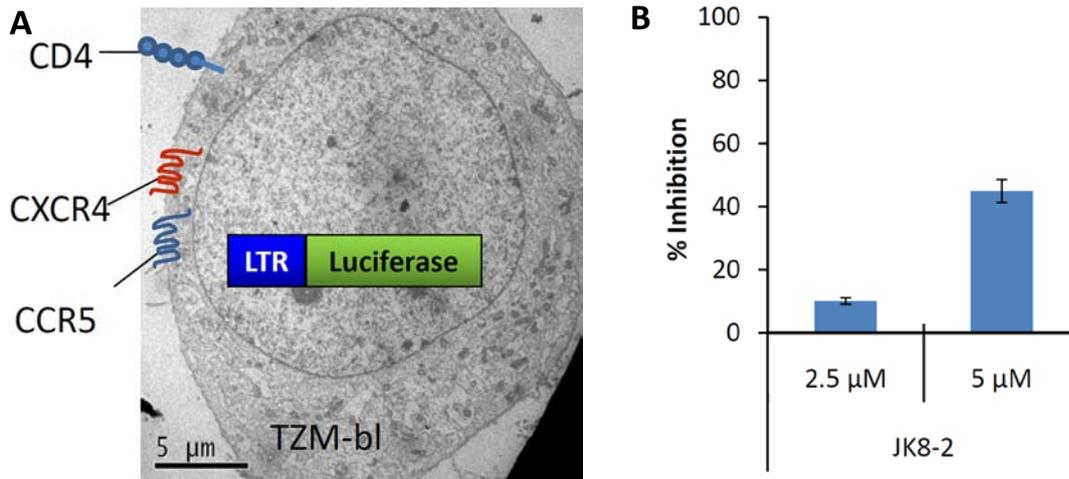


Abbildung 17: Inhibition von frühen Schritten im HIV-Lebenszyklus. (A) Schematische Darstellung der Besonderheiten der von HeLa Zellen derivatisierten Zelllinie TZM-bl. (B) 10^4 TZM-bl Zellen wurden für 1 h mit JK8-2 oder DMSO inkubiert und danach mit 5 ng p24 HIV-1 BaL infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseexpression luminometrisch detektiert. Gezeigt ist die Inhibition der Luciferaseexpression bezogen auf die DMSO-Kontrolle.

Nach erfolgreicher Infektion werden die Reportergene Luciferase und β -Galaktosidase durch die Tat-Transaktivierung von HIV-1 LTR-Promotoren exprimiert. In einem Luciferaseassay kann von der Menge umgesetzten Luciferins auf das Ausmaß der Infektion zurückgeschlossen werden. Für den Versuchsansatz wurden TZM-bl Zellen mit 2,5 und 5 μM JK8-2 für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit 5 ng p24 HIV-1 BaL pro 1×10^4 Zellen infiziert. Zwei Tage danach wurde die Luciferaseaktivität bestimmt.

Tatsächlich war die Infektionsintensität bei 5 μM JK8-2 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle um annähernd die Hälfte vermindert (Abbildung 17), was darauf schließen lässt, dass die Inhibition durch JK8-2 zu einem frühen Schritt des HIV-1 Lebenszyklus, noch vor oder während der Tat-vermittelten Transkription des Luciferasegens, erfolgen muss.

Schließlich sollte untersucht werden, ob JK8-2 eventuell die Integration der revers transkribierten viralen DNA verhindern kann. Dafür wurden PM1 Zellen für 1 h bei 37°C mit 5 μM JK8-2 behandelt und danach mit 2 ng p24 HIV-1 BaL infiziert. Drei Tage später wurde die genomische DNA dieser Zellen isoliert und in einer *nested* PCR integrierte provirale HIV-1 DNA nachgewiesen. In der ersten PCR wird ein Primer verwendet, der im HIV-1 3'-LTR hybridisiert, während der zweite Primer eine sogenannte Alu-Sequenz bindet. Alu-Sequenzen sind repetitive Sequenzen von circa 300 bp Länge und machen über 10% des menschlichen Genoms aus (Batzer und Deininger, 2002). Damit sind sie mit ungefähr einer Million Kopien im Genom vertreten und machen die Integration des HIV-1 Provirus in ihrer Nähe hochwahrscheinlich. Somit werden in der ersten PCR Fragmente unterschiedlicher Länge angereichert und als *template* für die zweite PCR verwendet. Die Primer der zweiten PCR binden beide im HIV-1 LTR stromabwärts des ersten LTR-Primers. Für eine semi-

quantitative Auswertbarkeit der erhaltenen Bandenintensität diene zum Vergleich ein Fragment des zellulären β -Globingens (Abbildung 18). In der Tat wiesen die mit JK8-2 behandelten Zellen eine abgeschwächte Integration als die Kontrollzellen auf. Hieraus kann abgeleitet werden, dass JK8-2 entweder direkt die Integration der viralen DNA in das Wirtszellgenom oder einen Schritt davor inhibiert.

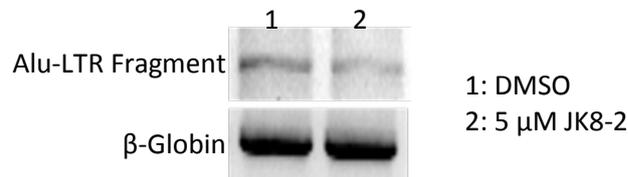


Abbildung 18: Hemmung der Integration von HIV-1_{BaL} durch JK8-2 in PM1 Zellen. PM1 Zellen wurden für 1 h mit JK8-2 oder DMSO behandelt, in Medium mit JK8-2 mit 2 ng HIV-1 BaL für 3 h infiziert und für drei Tage in JK8-2 enthaltendem Medium kultiviert. Daraufhin wurde die genomische DNA isoliert und mit je 3 μ g davon eine *nested* Alu-PCR mit zwei Primerpaaren durchgeführt, die in repetitiven Alu-Sequenzen und im HIV-1 LTR binden. Als konstitutive Kontrolle diente eine PCR mit Primern für β -Globin. Aus den PCR-Ansätzen wurden gleiche Volumina auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

Zusammengefasst haben die Studien mit den unter rationalen Gesichtspunkten entwickelten potenziellen DOHH Inhibitoren ergeben, dass die einzige Verbindung, die in der Lage ist die HIV-1 Replikation zu hemmen, JK8-2, keinen Einfluss auf die Rev-Transaktivierung bzw. den Rev-vermittelten RNA Transport besitzt. Die Hemmung der viralen Replikation ist vielmehr auf eine direkte Wirkung auf die Integration direkt bzw. auf einen vorher stattfindenden Schritt im HIV-1 Lebenszyklus zurückführbar.

6.1.1.2 Inhibition der humanen DOHH durch RNA Interferenz

Die Bedeutung der Hydroxylierung von Deoxyhypusin für die HIV-1 Replikation konnte mangels eines spezifischen Inhibitors der DOHH nicht geklärt werden. Daher sollte die DOHH nun mittels RNA Interferenz (RNAi) depletiert werden. Das Prinzip der RNAi ist in Abbildung 19 veranschaulicht. Es basiert darauf, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) in eukaryotischen Zellen von Dicer, einem Mitglied der RNaseIII-Familie dsRNA-spezifischer Endonukleasen, erkannt und in kurze dsRNA Fragmente prozessiert wird. Diese besitzen einen 2 nt langen 3'-Überhang und werden als siRNA (*small interfering RNA*) bezeichnet. Das Argonautprotein Slicer erkennt siRNA und initiiert die Bildung des Ribonukleoproteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*). RISC vermittelt die Dissoziation der dsRNA und integriert den RNA-Strang mit dem thermodynamisch stabileren 5'-Ende in den Komplex. Der mit einer einzelsträngigen RNA beladene RISC bindet sequenzspezifisch die komplementäre Ziel-mRNA, welche daraufhin von Slicer in der Mitte der siRNA Sequenz gespalten und von der Zelle abgebaut wird. Dies hat zur Folge, dass das von dieser mRNA kodierte Protein nicht translatiert wird (zusammengefasst in Siomi und Siomi, 2009).

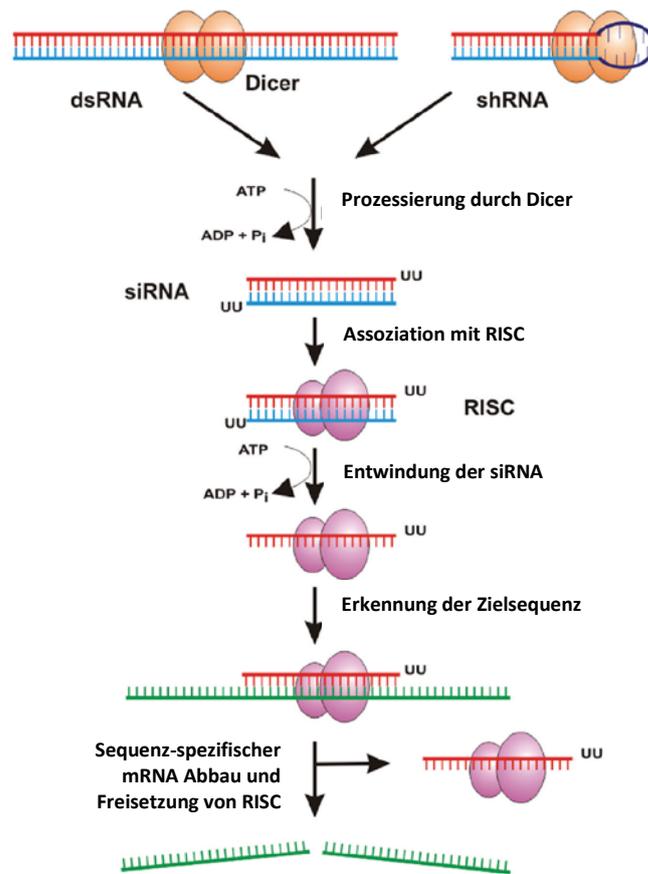


Abbildung 19: Veranschaulichung des Ablaufs der RNA Interferenz (modifiziert nach Rutz und Scheffold, 2004).

Knockdown von DOHH mittels siRNA

Für die Depletion von DOHH wurden zunächst verschiedene siRNA entworfen. Eine besondere Herausforderung stellte dabei die anspruchsvolle *dohh* Nukleotidsequenz mit mehr als 70% GC-Anteil, was die Auswahl von geeigneten Sequenzbereichen für die RNAi beschränkte.

Nach Testung verschiedener Algorithmen für die siRNA-Sequenzberechnung und verschiedener siRNA Systeme (Ambion Silencer, Invitrogen *stealth* siRNA), bei denen kein Effekt auf die *dohh* RNA-Level beobachtet werden konnte, wurden siRNA Sequenzen identifiziert (Invitrogen, siRNA), die nach zweifacher sequenzieller Transfektion von HeLa Zellen an Tag 0 und Tag 2 eine Abnahme der *dohh* mRNA vermitteln (Abbildung 20B). Die Zielsequenzen der beiden aktiven siRNAs liegen im offenen Leserahmen (siDHH895) oder im 3'-UTR (siDHH1127).

Nach vier Tagen zeigte siDHH1127 die höchste Aktivität. Normiert wurden die DOHH mRNA-Level auf die Menge an GAPDH Transkripten.

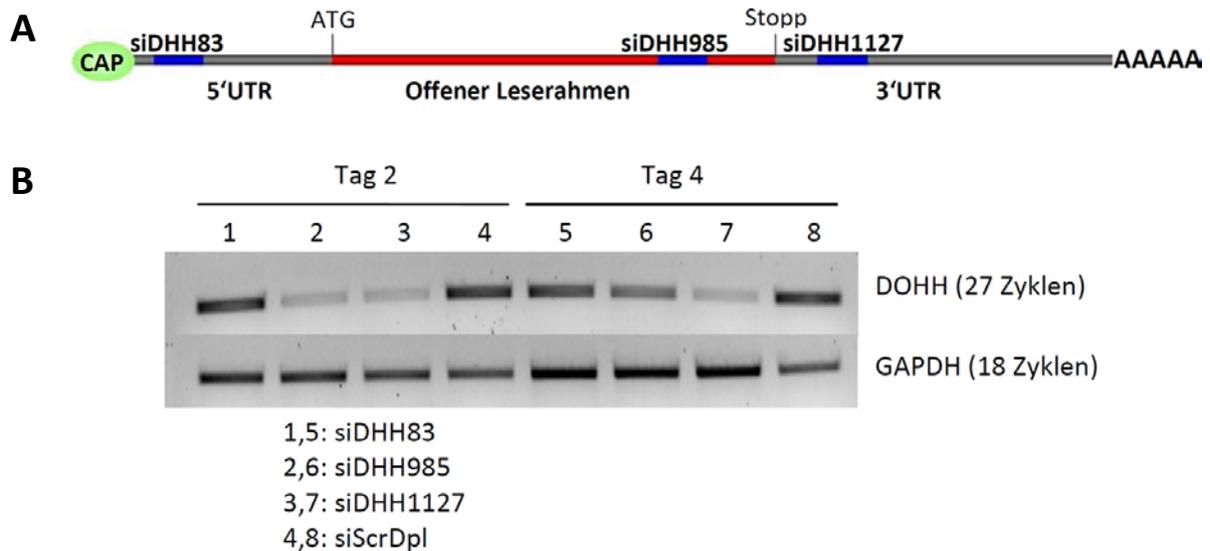


Abbildung 20: DOHH Knockdown durch Transfektion verschiedener siRNA. (A) Schematische Darstellung der *dohh* mRNA mit den Bindebereichen der drei eingesetzten siRNA (blau). (B) HeLa Zellen wurden mit spezifischen siRNA gegen *dohh* oder Kontroll-siRNA an den Tagen 0 und 2 transfiziert. An Tag 2 und 4 wurde jeweils Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und PCR mit spezifischen Primern gegen DOHH und GAPDH als Ladekontrolle durchgeführt. Auf ein 1% Agarosegel wurden gleiche Volumina der PCR-Ansätze aufgetragen.

Etablierung eines monoklonalen Antikörpers gegen DOHH

Da bislang kein kommerzieller DOHH-spezifischer Antikörper verfügbar ist, wurden zum Nachweis des DOHH *knockdowns* auf Proteinebene polyklonale Kaninchenantikörper in Auftrag gegeben. Hierfür wurden zwei geeignete Epitope ausgewählt und jeweils zwei Kaninchen pro Epitop immunisiert.

Für die Kontrolle der Antiseren wurde die DOHH-Sequenz aus HeLa Zellen in einen p3-Vektor (Invitrogen) ligiert und in HeLa Zellen überexprimiert. Die Gesamtzelllysate von untransfizierten und mit p3DOHH transfizierten Zellen wurden nebeneinander auf einem SDS-PAGE Gel aufgetragen und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese wurden mit den vier erhaltenen Seren einer Westernblot-Analyse unterzogen (Abbildung 21). Serum 2 zeigte ein distinktes Signal sowohl für überexprimierte als auch endogene DOHH bei vergleichbar niedrigem Hintergrund. Daher wurde es per Affinitätschromatographie einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen. Hierfür wurde das Peptid 1 über ein N-terminales Cystein an eine SulfoLink Matrix (Pierce) gekoppelt und mit dem Serum inkubiert. Nach einigen Waschschritten wurden die peptidgebundenden Antikörper eluiert und die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt vereint. Der so angereicherte Antikörper wurde wiederum gegen die oben genannten Lysate getestet (Abbildung 22), wodurch eine Verminderung der Hintergrundsignale erzielt werden konnte.

A DOHH-Proteinsequenz:

MVTEQEVDAL **GQTLVDPKQP** **LQAR**FRALFT LRGLGGPGAI AWISQAFDDD
 SALLKHELAY CLGQMQDARA IPMLVDVLQD TRQEPMVRHE AGEALGAIGD
 PEVLEILKQY SSDPVIEVAE TCQLAVRRLE WLQQHGGGEPAGPYLS**VDPA**
PPAEERDVGR LREALLDESR PLFERYRAMF ALRNAGGEEA ALALAEGLHC
 GSALFRHEVG YVLGQLQHEA AVPQLAAALA RCTENPMVRH ECAEALGAIA
 RPACLAALQA HADDPERVVR ESCEVALDMY EHETGRAFQY ADGLEQLRGA
 PS

B

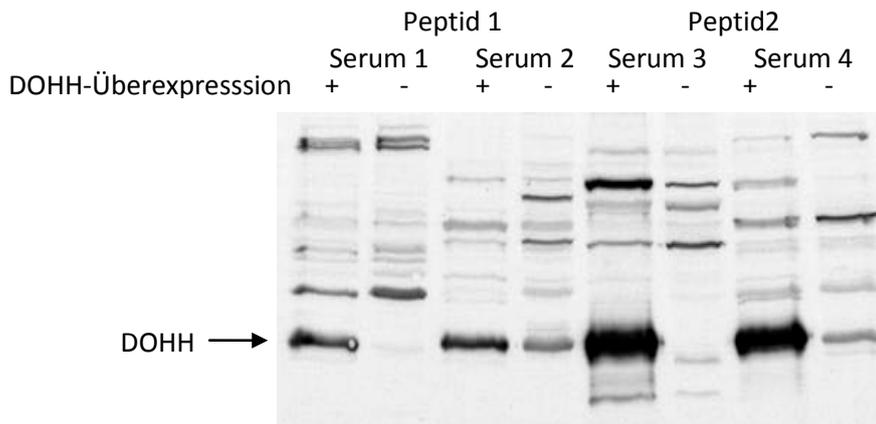


Abbildung 21: DOHH Antiseren aus Peptid-immunisierten Kaninchen. (A) DOHH Proteinsequenz. Die verwendeten 14 Aminosäuren langen Peptiddepote sind blau eingefärbt. (B) Immunoblot von HeLa Zelllysaten. Die Zellen wurden zuvor mit oder ohne dem p3DOHH Expressionsplasmid transfiziert und mit vier Kaninchen-anti-DOHH Seren detektiert. Als Sekundärantikörper diente ein gegen Kaninchen gerichteter Ziegenantikörper mit gekoppelter Peroxidase.



Abbildung 22: Affinitätsgereinigter α -DOHH Antikörper aus Serum 2.

Knockdown von DOHH mit shRNA stabil transfizierten HeLa Zellen

Um eine stabile Expression der aktiven siRNA (siDOHH1127, siDOHH985) zu erzielen, wurden Sequenzen für äquivalente shRNA in pSUPER (Brummelkamp et al., 2002) und pSilencer Vektoren (Ambion) ligiert, aus denen die shRNA Expressionskassetten in lentivirale pG-Vektoren überführt wurden (siehe Kapitel 5.1.12 bis 5.1.14). Diese exprimieren nach erfolgter Transduktion GFP als Marker. Die lentiviralen Partikel wurden bei der Produktion in 293T Zellen mit dem Hüllprotein aus dem Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV-G) pseudotypisiert. Auf diese Weise sind die Lentiviruspartikel in der Lage, verschiedene Zelltypen zu infizieren. Für den *knockdown* von DOHH wurden erneut HeLa

Zellen transduziert. Aufgrund einer sehr guten Transduktionsrate von über 80% war eine FACS-Sortierung nicht notwendig. Daher wurde nach einer Woche der Kultivierung der shRNA exprimierenden Zellen die Gesamtproteinextrakte hergestellt und im Western Blot mit dem monoklonalen DOHH Antikörper auf die DOHH Expression untersucht. Es konnte jedoch auf Proteinebene kein siRNA-vermittelter *knockdown* von DOHH festgestellt werden (Abbildung 23).

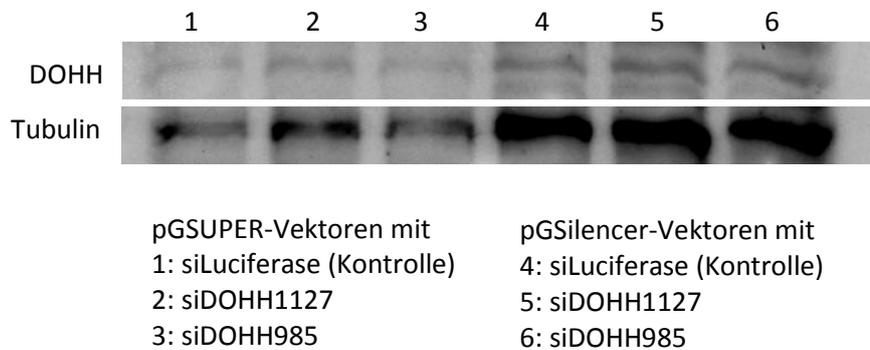


Abbildung 23: Versuch des *knockdown* von DOHH in stabil transfizierten HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden mit lentiviralen pG-Vektoren transduziert, die für shRNA im pSUPER bzw. im pSilencer Hintergrund kodieren. Nach einer Woche wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt, gleiche Mengen über ein 12% SDS-PAGE-Gel separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. DOHH und Tubulin als Ladekontrolle wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert und mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern visualisiert.

Einsatz von miRNA für *knockdown* von DOHH

Bislang wurden insgesamt 13 verschiedene siRNA, *stealth* siRNA (Daten nicht gezeigt), lentiviral transduzierte shRNA, retroviral transduzierte 29mer shRNA sowie antisense RNA und esiRNA (Daten nicht gezeigt) gegen die *dohh* mRNA getestet, wobei keine zu einem signifikanten *knockdown* der DOHH auf Proteinebene führte.

Als nächste Option wurden micro RNAs (miRNA) für die RNA Interferenz untersucht. Diese bieten gegenüber Vektor-exprimierten shRNAs den Vorteil, dass deren Transkription wie die der mRNA von RNA-Polymerase II Promotoren gesteuert wird, welche eine höhere Aktivität als RNA-Polymerase III Promotoren besitzen. Zudem ermöglicht dieser Ansatz die Expression polycistronischer RNA, die entweder für eine gewünschte miRNA und ein Markerprotein oder für mehrere hintereinander geschaltete miRNAs kodiert. Für das BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System von Invitrogen wurden vier passende miRNA Sequenzen entworfen, zunächst in Expressionsvektoren ligiert und von diesen über Rekombinations-basierte Gateway-Klonierung in den finalen lentiviralen Vektor eingebracht. Als Selektionsmarker vermittelten diese Vektoren eine Resistenz gegen das Antibiotikum Blasticidin. Die lentiviralen Partikel wurden ebenfalls mit VSV-G pseudotypisiert, HeLa Zellen mit den Virus-haltigen Überständen transduziert und mit Blasticidin selektioniert. Nach 14 Tagen wurde die Gesamt-RNA aus den stabilen Zelllinien isoliert, revers transkribiert und in einer quantitativen *Realtime* Analyse die *dohh* mRNA Menge relativ zur exprimierten GAPDH mRNA Menge

gemessen. Wie in Abbildung 24 gezeigt, konnte für die miRNA miR-282 und miR-787 ein 60-70% *knockdown* festgestellt werden. Auf Proteinebene konnte mit miR-282 ein *knockdown* von 50% erzielt werden. Die Effizienz dieses Effektes konnte noch weiter gesteigert werden, nachdem die beiden wirksamsten miRNAs hintereinander in einen Vektor inseriert wurden. In stabilen HeLa Zellen, die mit lentiviralen Partikeln dieses Konstruktes transduziert wurden, konnte die DOHH Expression um 70% reduziert werden. (Abbildung 25).

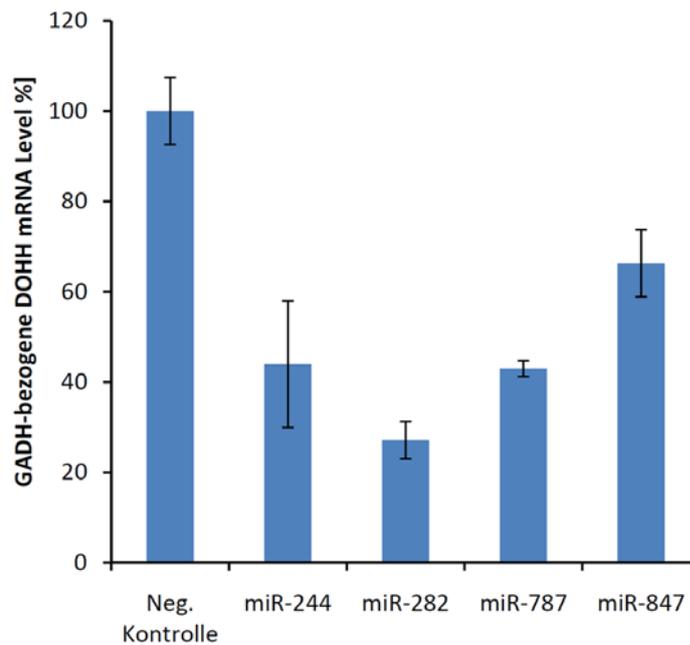


Abbildung 24: Stabiler *knockdown* von *dohh* mRNA mit spezifischen miRNAs. HeLa Zellen wurden mit lentiviralen Vektoren transduziert, die für verschiedene gegen die *dohh* mRNA gerichtete miRNAs kodierten und den Zellen eine Blasticidinresistenz verliehen. Nach antibiotischer Selektionierung wurde aus den verbliebenen Zellen die Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und in einer quantitativen *Realtime* RT-PCR analysiert. Die Werte wurde mit den Mengen der GAPDH mRNA normiert und der mRNA Level der Negativkontrolle auf 100% festgelegt.

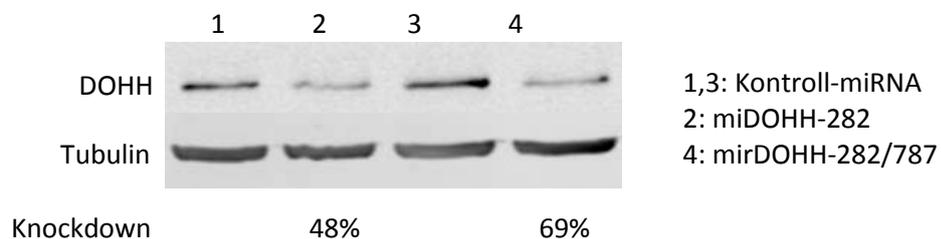


Abbildung 25: Stabiler *knockdown* von DOHH mit spezifischen miRNAs. Immunoblot von stabilen miRNAs exprimierenden HeLa Zellen. Die Proteinextrakte wurden über ein SDS-PAGE Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit Antikörpern gegen DOHH und Tubulin als Ladekontrolle im Westernblot nachgewiesen. Die spezifischen Banden wurden mit IRDye markierten Sekundärantikörpern detektiert und mit dem LI-COR Odyssey Imaging System visualisiert. Bezogen auf die Tubulinexpression und die Kontroll-miRNA konnte der DOHH *knockdown* quantifiziert werden.

DOHH *knockdown* mit shDOHH (Sigma)

Auf der Suche nach einem *knockdown* von mehr als 70% wurde parallel zu den Experimenten mit miRNA ein Set von fünf lentiviralen Vektoren bezogen, die gegen DOHH gerichtete shDOHH exprimierten (Sigma Mission shRNA). Diese Vektoren vermitteln nach Transduktion eine Puromycin-resistenz. HeLa Zellen wurden mit VSV-G pseudotypisierten lentiviralen Partikeln transduziert und positive Zellen antibiotisch selektiert. Bei der Überprüfung der mRNA- und Protein-Mengen zeigte sich, dass shDOHH 3 allein in der Lage war, die mRNA um über 50% zu reduzieren und die DOHH Proteinexpression um 70% zu senken (Abbildung 26).

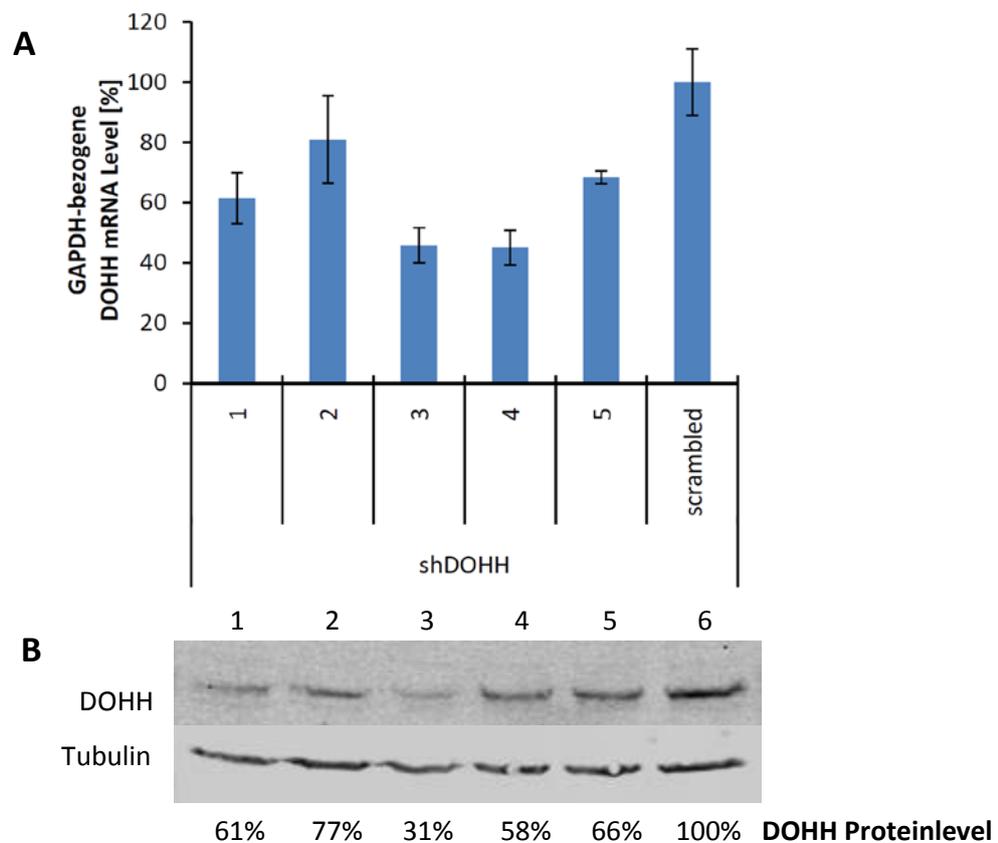


Abbildung 26: Knockdown von DOHH in transduzierten HeLa Zellen mittels lentiviraler shDOHH-Vektoren (Sigma Mission shRNA). HeLa Zellen wurden mit fünf shDOHH und einer Kontroll-shRNA exprimierenden lentiviralen Vektoren transduziert und mit Puromycin selektiert. Die resultierenden stabilen Zellen wurden auf mRNA-Ebene (A) und Proteinebene (B+C) auf DOHH Expression untersucht. Die shDOHH 3 war in der Lage das DOHH Proteinniveau abzusenken, wie in der Quantifizierung des Western Blots an einem LI-COR Odyssey gezeigt werden konnte (C).

Funktionelle Charakterisierung von DOHH-*knockdown* Zellen

Mit diesen shDOHH 3-Zellen wurden anschließend funktionelle Assays durchgeführt, um der Frage nachzugehen, ob ein DOHH *knockdown* von 70% die Rev-Transaktivierung bzw. den Rev-vermittelten Transport viraler RNA beeinflusst. Hierzu wurden die stabilen Zellen und eine entsprechende Kontrollzelllinie mit dem proviralen HIV-1 Konstrukt HXB2 Δ Bam mit oder ohne Rev sowie mit SEAP

als Transfektionskontrolle kotransfiziert. Nach 48 h wurden in dem zellfreien Kulturüberstand p24 mittels ELISA und SEAP-Aktivität nachgewiesen. Die p24 Level wurden auf die jeweilige SEAP-Expression normiert. Wie in Abbildung 27 gezeigt, hatte der *knockdown* jedoch keinen messbaren Einfluss auf die p24 Sekretion und daher auch nicht auf die Rev-Transaktivierung.

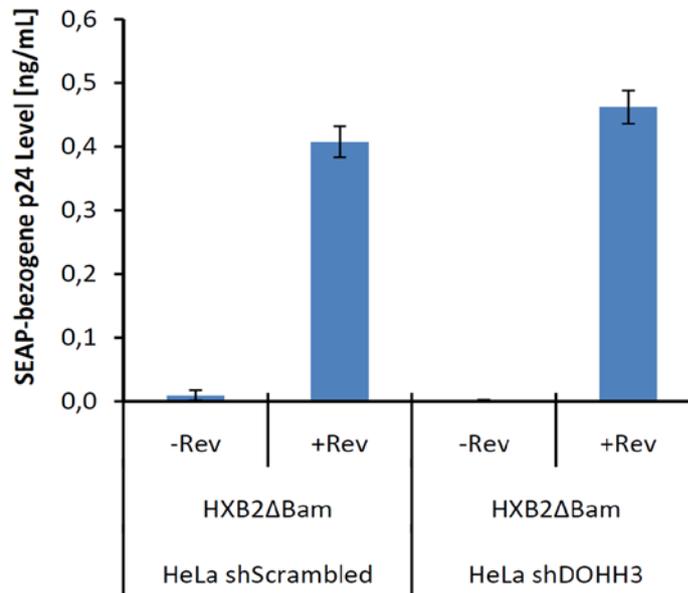


Abbildung 27: Knockdown von DOHH hat keinen Einfluss auf die Rev-Transaktivierung. HeLa Zellen, die stabil shDOHH3 oder Kontroll-shRNA (scrambled) exprimieren, wurden mit den Rev-defizienten proviralen Reporter-konstrukten HXB2ΔBam mit und ohne Rev kontransfiziert. Als interne Kontrolle diente SEAP. 48 h nach Transfektion wurden die Viruspartikel des Zellkulturüberstandes im p24 Antigen-ELISA gemessen und die erhaltenen Werte auf die ermittelten SEAP-Aktivitäten bezogen.

Zur Testung eines möglichen Einflusses auf den nukleozytoplasmatischen Transport intronhaltiger RNA wurden die *knockdown* Zelllinien mit den bereits zuvor beschriebenen GPV-Vektoren, mit oder ohne Rev sowie SEAP als Transfektionskontrolle transfiziert. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den p24-Mengen des Überstandes von Kontroll- und shDOHH Zellen festgestellt werden (Abbildung 28).

Abschließend wurde untersucht, wie sich der beobachtete *knockdown* in shDOHH-Zellen in der Infektion auswirkt. Da HeLa Zellen nicht die für HIV-1 Wildtyp Infektion notwendigen Rezeptoren exprimieren, wurden *env*-defiziente HIV-1 NL4-3 Viruskonstrukte verwendet, die bei der Produktion von Viruspartikeln mit dem Hüllglykoprotein des Vesikular Stomatitis Virus, VSV-G, pseudotypisiert worden waren. Kontroll- und DOHH-*knockdown*-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen dieses Virus infiziert und für 8 Tage kultiviert. Auch in diesem Ansatz konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen shDOHH- und Kontrollzellen festgestellt werden (Abbildung 29).

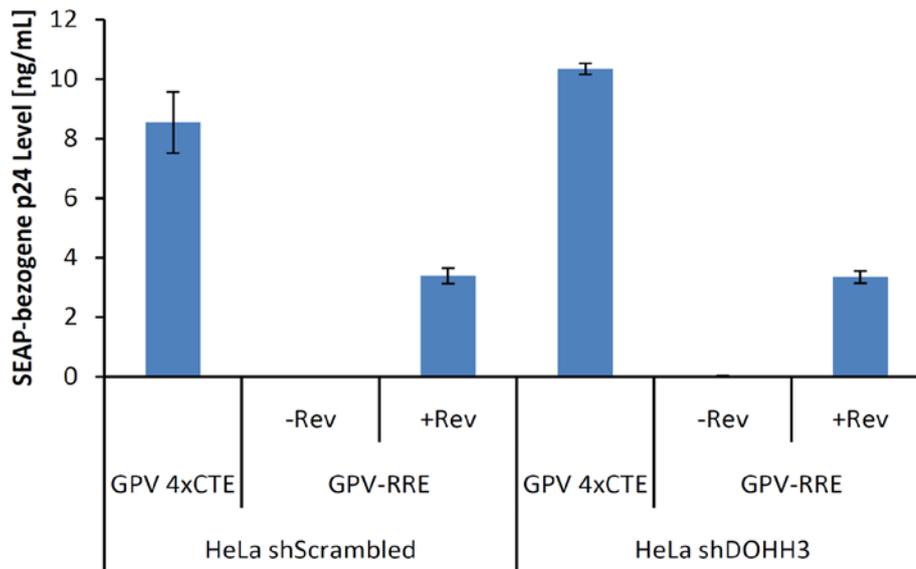


Abbildung 28: Knockdown von DOHH hat keinen Einfluss auf Rev-abhängigen und -unabhängigen RNA-Transport. Stabil shDOHH3 oder scrambled-shRNA exprimierende HeLa Zellen wurden mit GPV 4xCTE oder GPV-RRE Reporterkonstrukten mit und ohne Rev transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde ein SEAP Expressionsplasmid kotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Kapsidmenge und die SEAP-Aktivität des Zellkulturüberstandes detektiert. Gezeigt sind die SEAP-bereinigten p24-Mengen.

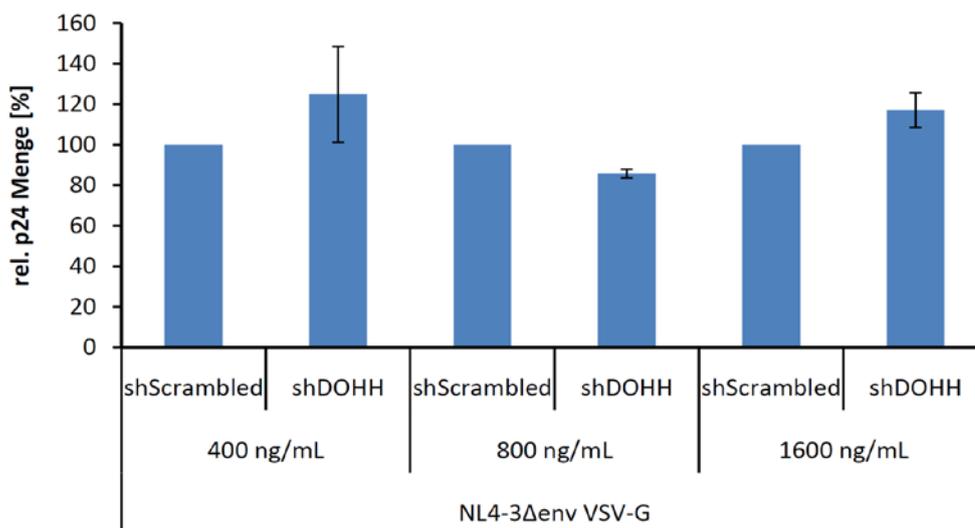


Abbildung 29: Knockdown von DOHH hat zeigt keine Auswirkung auf die Produktion von Viruspartikeln in infizierten Zellen. DOHH-knockdown Zellen und scrambled-shRNA exprimierende Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen eines VSV-G pseudotypisierten Env-defizienten proviralen HIV-1 Konstruktes infiziert und nach 8 Tagen die freigesetzte Viruspartikelmenge im Zellkulturüberstand im p24 Antigen-ELISA bestimmt. Dabei wurden die p24-Level der jeweiligen Kontrollzellen auf 100% festgesetzt.

Da die DOHH Expression nicht vollkommen unterdrückt werden konnte, gibt es prinzipiell zwei Erklärungsmöglichkeiten für diese Ergebnisse. Entweder reicht die verbliebene Menge an DOHH aus, um eIF-5A ausreichend zu hydroxylieren und damit zu aktivieren, oder die Hydroxylierung von Deoxyhypusin hat keinen Einfluss auf eIF-5A Funktion als Kofaktor für die Rev-vermittelte Transaktivierung bzw. den mRNA Export aus dem Kern.

6.1.2 Inhibition der humanen DHS mit niedermolekularen Verbindungen

Die DHS katalysiert den ersten Schritt der Hypusinmodifikation von eIF-5A, welcher essenziell für den Rev-abhängigen Transport von viraler RNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma und damit für die Replikation von HIV-1 ist, wie frühere Studien unter anderem aus unserer Arbeitsgruppe zeigten (Lee et al., 1995; Hauber et al., 2005). Die dabei verwendeten kompetitiven Inhibitoren sind in Abbildung 30 im Vergleich zu dem DHS Substrat Spermidin aufgeführt. GC7 weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Spermidin auf und konnte in einem ternären Komplex zusammen mit dem DHS Tetramer und dem Kofaktor NADH kristallisiert werden. In diesem Kristall lagerte sich GC7 wie erwartet in der Spermidin-Bindungstasche an (Umland et al., 2004). Die Behandlung von Zellen mit GC7 führt allerdings zum Wachstumsarrest in CHO Zellen (Lee et al., 1995), unterdrückt die Differenzierung und führte zur Induktion von Apoptose in Keratinocyten (Lee et al., 2009). Dagegen ist ein weiterer Inhibitor, CNI-1493, räumlich anspruchsvoller, trägt jedoch vier Guanidiniumgruppen, von denen eine auch in GC7 vorkommt. Als Wirkmechanismus von CNI-1493 wird derzeit ein Blockierung des Zugangs zur Spermidin-Bindungsstelle und eine Verhinderung der DHS-eIF-5A Interaktion diskutiert (Klinke et al., unveröffentlichte Daten). Bei der Verwendung von CNI-1493 konnten keine toxischen Nebenwirkungen festgestellt werden. Es wurde weder das Zellzyklusprofil verändert, noch trat eine vermehrte Induktion von Apoptose in für HIV-1 relevanten T-Zellen auf. Weiterhin konnte eine dramatische Beeinträchtigung des HIV-1 Replikationszyklus sogar dann erreicht werden, wenn die Synthese des Substrats Spermidin inhibiert wird (Schäfer et al., 2006). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass diese Strategie zur Hemmung der Bildung von Deoxyhypusin-modifiziertem eIF-5A für die antivirale Therapie weiterhin vielversprechend ist. Besonders unterstrichen wird dies durch die Tatsache, dass in den letztgenannten Studien auch multiresistente HIV-1 Isolate inhibiert werden konnten.

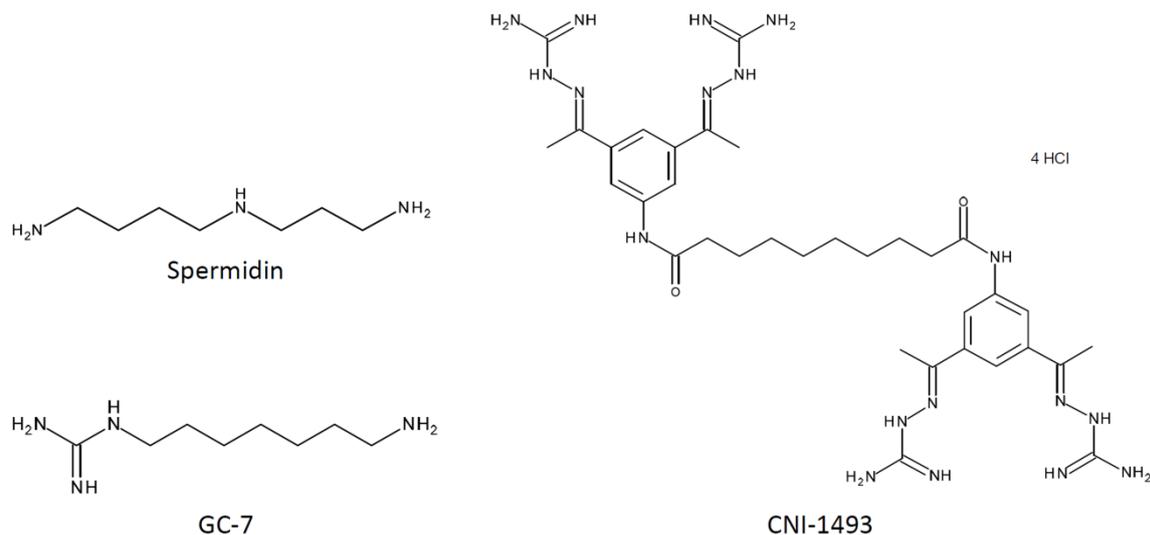


Abbildung 30: Strukturen des Substrates der DHS, Spermidin und der beiden bisher beschriebenen DHS-Inhibitoren GC-7 und CNI-1493.

In einem vom BMBF im Rahmenprogramm „Innovative Therapien“ geförderten Konsortium mit dem Titel „Combating Drug Resistance“ sollten neue Inhibitoren für die DHS entwickelt werden. Dafür wurden zunächst von Dr. Sebastián Klinke aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hilgenfeld (Universität Lübeck) Kristallstrukturen der DHS mit höherer als bereits publizierter Auflösung (Umland et al., 2004) angefertigt, was eine genauere Betrachtung des aktiven Zentrums ermöglichte. Diese dienten als Vorlage für die bioinformatische Berechnung neuer Verbindungen durch Adrian Kolodzik aus der Arbeitsgruppe von Prof. Rarey (Universität Hamburg). Eigens für diesen Zweck entwickelte Algorithmen berücksichtigten die besonderen räumlichen und elektrostatischen Verhältnisse der aktiven Tasche eines DHS-Tetramers. Eine Auswahl von möglichen Strukturen, die zudem unter den Gesichtspunkten der theoretisch vergleichbaren Bindungsstärke zu GC7 und einer einfachen Synthetisierbarkeit selektiert wurden, synthetisierte Markus Schröder aus der Arbeitsgruppe von Prof. Meier (Universität Hamburg). Diese Verbindungen, in Abbildung 31 dargestellt, wurden anschließend im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Zelltoxizität und antivirale Aktivität getestet.

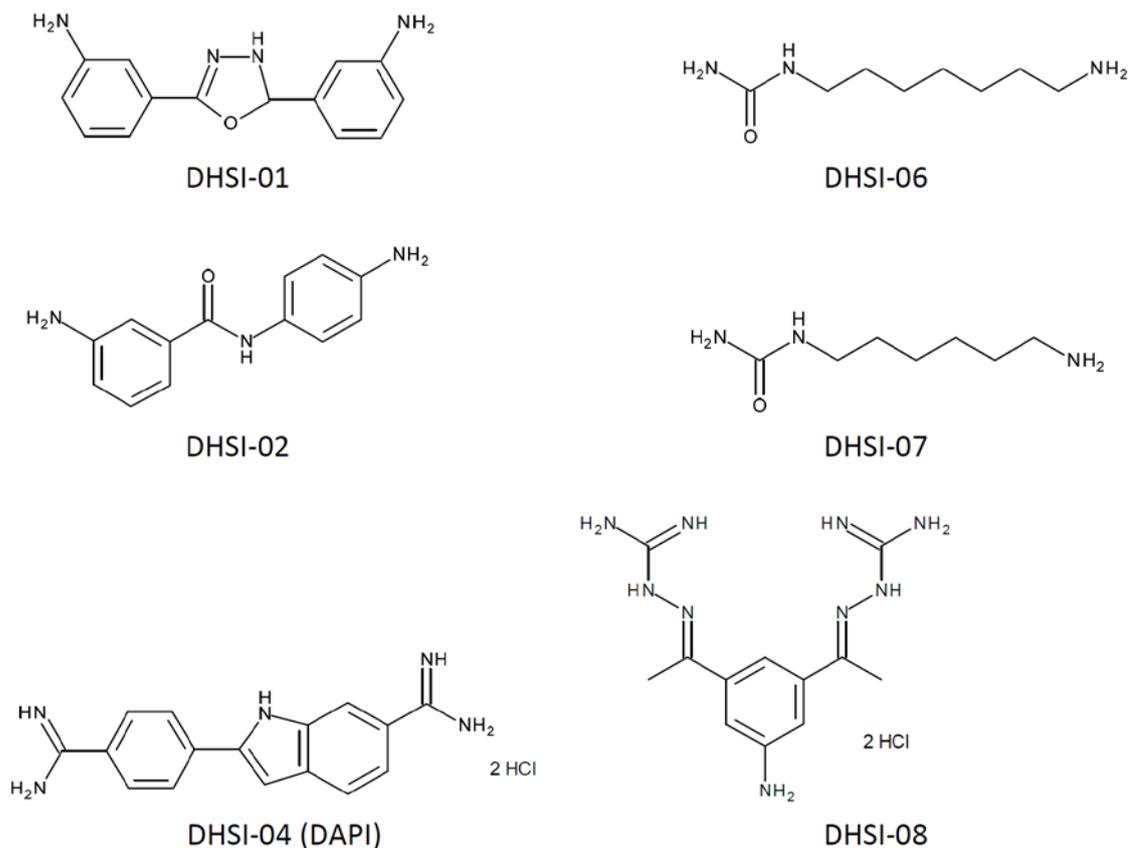


Abbildung 31: In dieser Arbeit untersuchte Verbindungen mit potenziell inhibitorischer Wirkung gegen DHS.

6.1.2.1 Bestimmung der zellulären Toxizität der potenziellen DHS-Inhibitoren

Bevor die DHSI (Deoxyhypusin-Synthase Inhibitoren) auf ihre antivirale Aktivität getestet wurden, sollte zunächst die potenzielle zelluläre Toxizität dieser Verbindungen in einem für klinische Studien relevanten Konzentrationsspektrum untersucht werden. Hierfür wurden PM1 Zellen über eine Dauer von 18 Tagen mit unterschiedlichen Konzentrationen der DHSI kultiviert, wobei die Verbindungen an jedem dritten Tag frisch zugesetzt wurden. Als Kontrollen dienten DMSO, das Lösungsmittel der Verbindungen DHSI-01, -02, -04, -06 und -07, sowie reines Medium als Kontrolle für den in Wasser gelösten DHSI-08. Bei jeder frischen Zugabe von DHSI wurden die Zellen passagiert und mit Hilfe des AlamarBlue Assays auf ihre metabolische Viabilität getestet. Von allen Verbindungen zeigte nur DHSI-04 ab einer Konzentration von 8 μM eine starke Abnahme der Viabilität am Tag 6 (Abbildung 32).

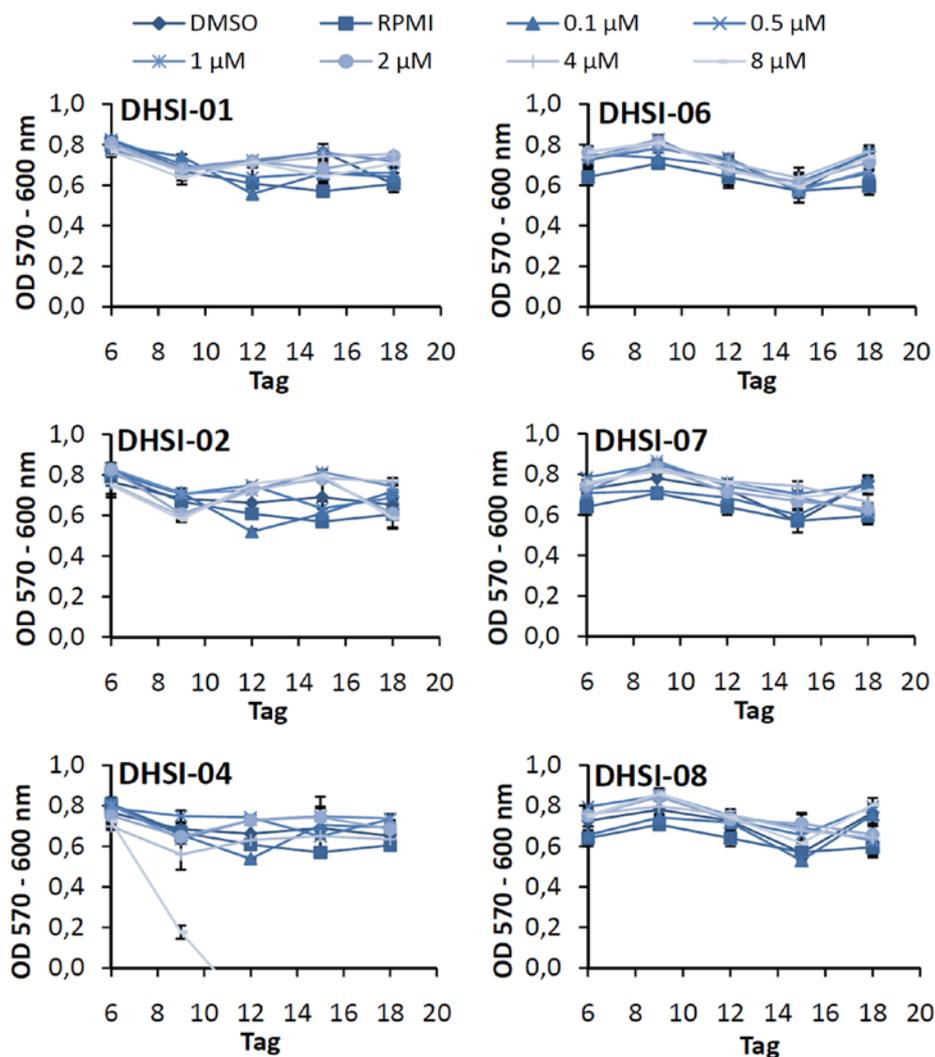


Abbildung 32: Metabole Toxizität der DHSI im AlamarBlue Assay. PM1 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Verbindungen oder der äquivalenten Menge an DMSO für 18 Tage inkubiert. An jedem dritten Tag wurde das Medium gewechselt, frische DHSI hinzugegeben und ein AlamarBlue Assay durchgeführt.

In der nächsten Studie wurde ermittelt, ob die verschiedenen DHSI-Verbindungen einen Einfluss auf das Zellzyklusmuster der PM1 Zellen haben. Dafür wurden diese wie oben für 12 Tage mit den Verbindungen inkubiert, mit Ethanol fixiert und mit dem DNA-Interkalator Propidiumiodid (PI) gefärbt. Durch die Fixierung werden die Zellmembranen durchlässig für PI und das in der FACS-Analyse gemessene Signal ist proportional zur DNA-Menge. Entsprechend dem Proliferationsverhalten der Zellen befinden sich die meisten Zellen, d.h. ca. 60%, in der postmitotischen G1 Phase mit diploidem Chromosomensatz. Etwa ein Viertel der Zellen befinden sich in der S-Phase und 10-20% der Zellen in der G2-Phase.

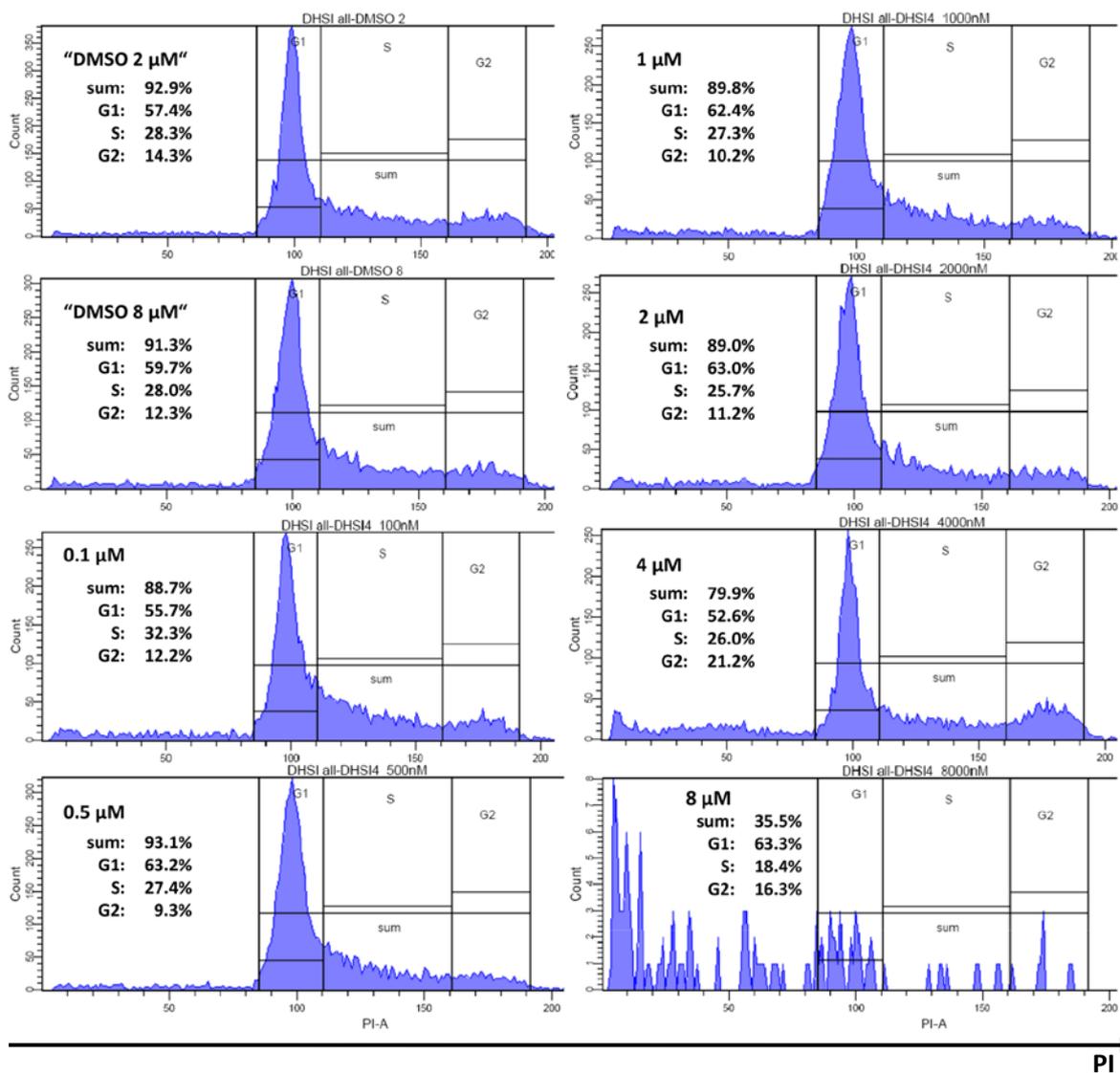


Abbildung 33: Zellzyklusanalyse von PM1 Zellen nach DHSI-04 Behandlung. PM1 Zellen wurden für 12 Tage mit verschiedenen Konzentrationen DHSI-04 oder DMSO inkubiert, anschließend mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Die Messung erfolgte an einem FACS Canto (BD Biosciences).

Die Ergebnisse für DHSI-04 sind exemplarisch in Abbildung 33 wiedergegeben. Für alle Konzentrationen bis auf 8 µM ist die Verteilung der Zellzyklusphasen mit denen der beiden DMSO Kontrollen vergleichbar. In Kulturen, die mit 8 µM DHSI-04 behandelt wurden, waren nach 12 Tagen

nicht mehr ausreichend Zellen vorhanden, um ein ganzes Spektrum aufzuzeichnen. Die anderen DHSI zeigten in allen Konzentrationen keine Abweichung vom Zellzyklusmuster verglichen mit den DMSO-Kontrollen (Daten nicht gezeigt).

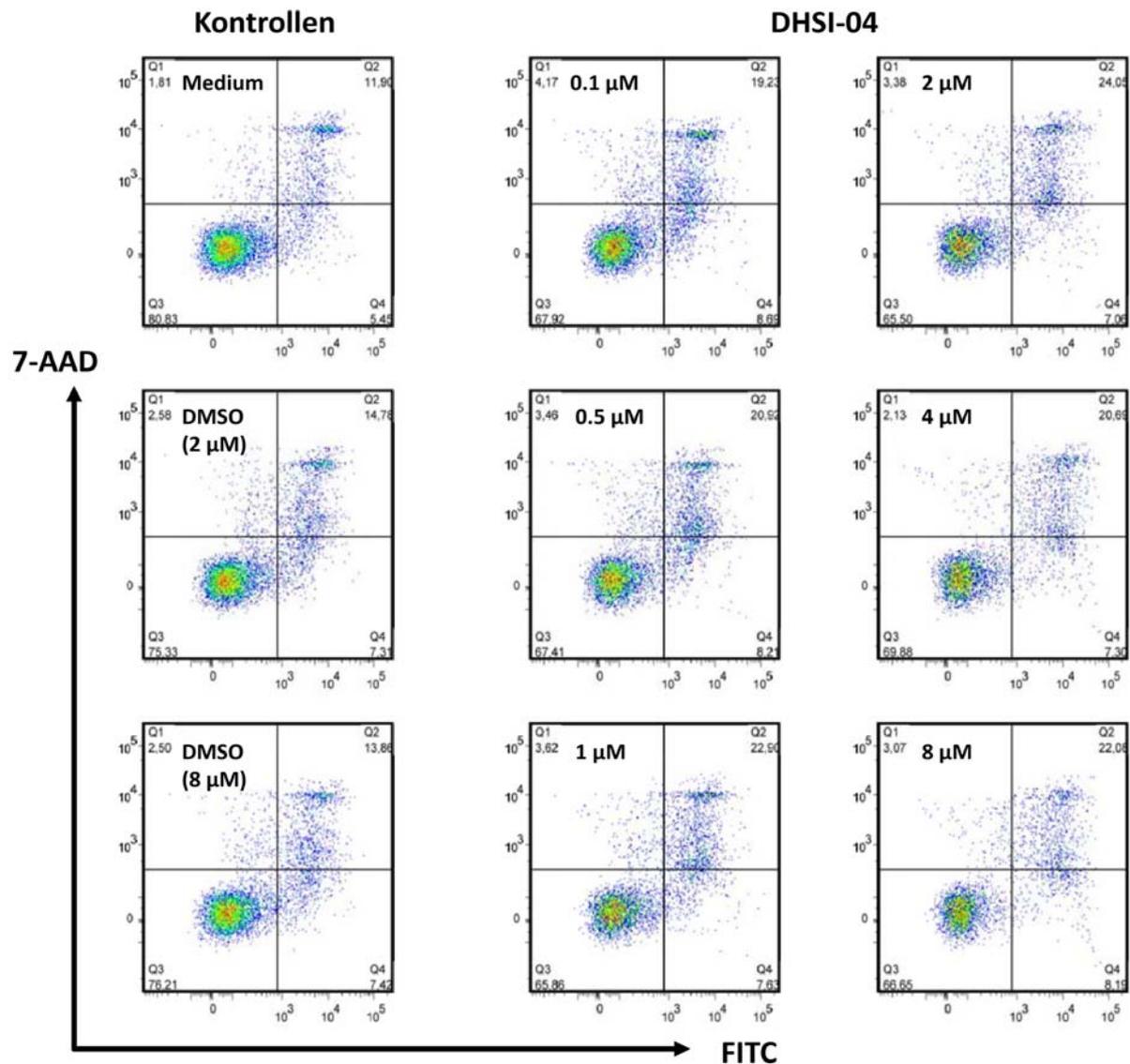


Abbildung 34: Einfluss der DHSI-04 auf die Induktion von Apoptose. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes aus gesunden Spendern wurden für 12 Tage mit DHSI behandelt und anschließend mit AnnexinV-FITC und PI gefärbt. Die Messung erfolgte durchflusszytometrisch.

In einem dritten Toxizitätstest sollte gezeigt werden, ob die Behandlung mit DHSI verstärkt Apoptose induziert. Hierfür wurden primäre mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) aus Spenderblut isoliert und für 12 Tage mit den Verbindungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem AnnexinV und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) gefärbt und zytometrisch analysiert. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin (PS), das bei apoptotischen Zellen an der Membranaußenseite präsentiert wird, während PS bei gesunden Zellen in das Zytoplasma weist. 7-AAD interkaliert wie PI mit der DNA und ist in diesem Fall

ein Indikator für Zellen mit beschädigter Membranintegrität, also toten (Quadrant Q1, nur 7-AAD positiv) oder spät-apoptotische Zellen (Quadrant Q2, 7-AAD und FITC positiv). Entsprechend befinden sich die unmarkierten gesunden Zellen in Quadrant Q3 und die frühen apoptotischen Zellen in Quadrant Q4. In Abbildung 34 sind exemplarisch die Diagramme für DHSI-04 gezeigt. Die Werte der mit dieser Verbindung behandelten primären Zellen waren mit dem DMSO Kontrollen vergleichbar. Anders als bei PM1 Zellen tolerierten die PBMCs eine Konzentration von 8 μM DHSI-04.

6.1.2.2 Antivirale Aktivität der Inhibitoren

Nachdem der Einfluss der verschiedenen DHSI auf den Metabolismus, den Zellzyklus und die Induktion von Apoptose ausgeschlossen werden konnte, wurde nun die potenzielle antivirale Aktivität der Verbindungen untersucht. Hierfür wurden PM1 Zellen mit HIV-1 BaL und CEM-SS Zellen mit HIV-1 NL4-3 infiziert.

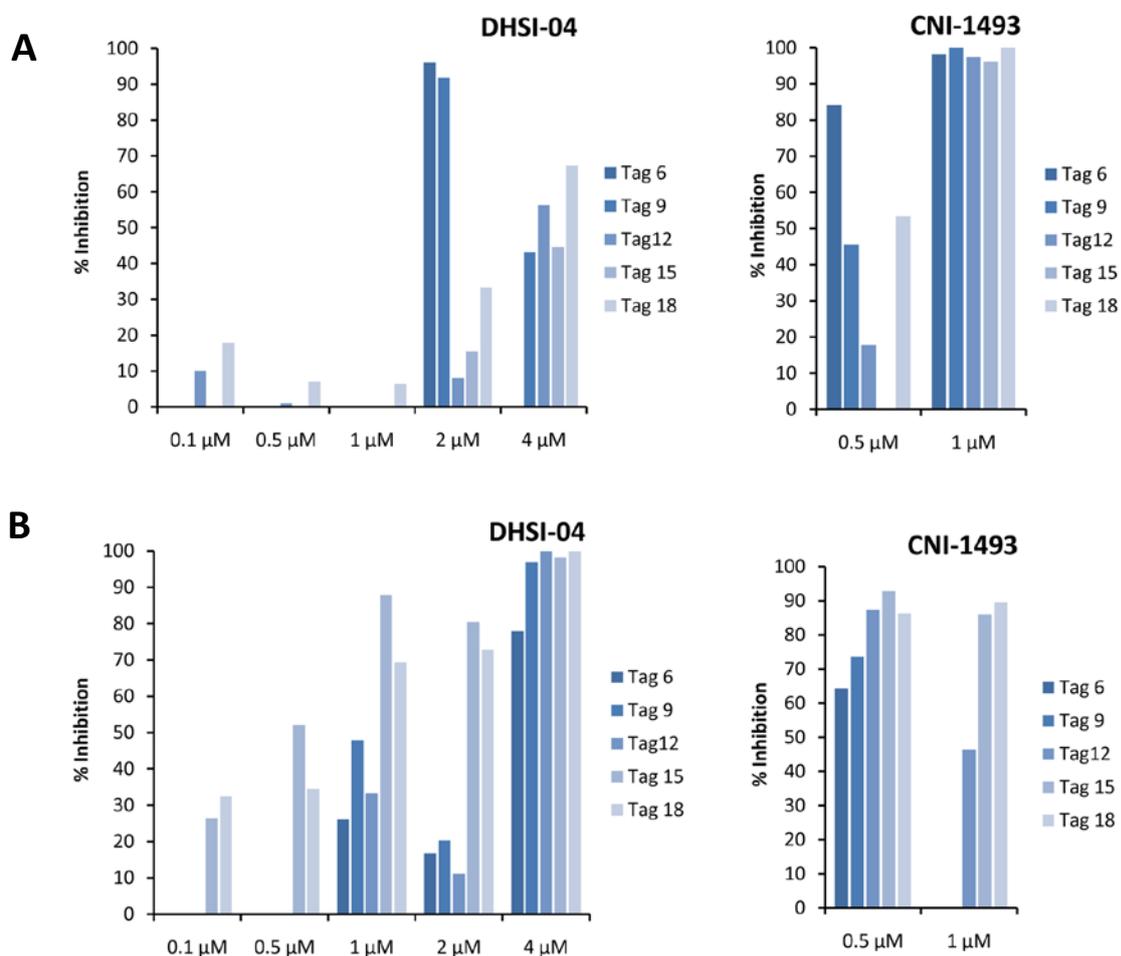


Abbildung 35: Antivirale Aktivität von DHSI-04 im Vergleich zu CNI-1493. CEM-SS Zellen wurden mit HIV-1 NL4-3 (A) und PM1 Zellen mit HIV-1 BaL (B) infiziert und gleich darauf in Wirkstoff-haltigem Medium kultiviert. An jedem dritten Tag von Tag 6 bis Tag 18 wurde die Viruslast mittels p24-ELISA im zellfreien Zellkulturüberstand ermittelt und ins Verhältnis zu den Lösungsmittelkontrollen gesetzt

Direkt nach der Infektion wurden die Zellen für 18 Tage mit den DHSI kultiviert. An jedem dritten Tag wurde die Viruslast im Zellkulturüberstand mittels p24 ELISA und die Viabilität der Zellen im AlamarBlue Assay bestimmt. Des Weiteren wurde das Medium gewechselt und frische DHSI hinzugefügt. In Abbildung 35 sind die Ergebnisse für die Inhibition der HIV-1 Replikation für DHSI-04 im Vergleich zu den Daten des etablierten Inhibitors CNI-1493 dargestellt, der als Positivkontrolle diente. Dabei wurde die Inhibition in den Lösungsmittel- bzw. Mediumkontrollen auf 0% gesetzt. CNI-1493 zeigt in der HIV-1 BaL Infektion bei der aktiven Konzentration von 1 μM eine inhibitorische Wirkung von annähernd 100%. Das T-trope HIV-1 NL4-3 wird ab Tag 12 zu 90% inhibiert. Die niedrigere Konzentration von 0,5 μM wirkte hier besser. Der Inhibitor DHSI-04 hemmt die HIV-1 BaL Replikation mit einer Konzentration von 4 μM ähnlich gut wie die Positivkontrolle. HIV-1 NL4-3 wurde jedoch lediglich zu ca. 50% inhibiert. Alle anderen DHSI zeigten in beiden Versuchsansätzen keine Virushemmung (Daten nicht gezeigt).

6.1.2.3 Spezifität der Inhibition: DHS *in vitro* Assay

Als verbliebener Inhibitor wurden nun DHS-Spezifitätsassays mit DHSI-04 im direkten Vergleich zu CNI-1493 und mit DMSO als Kontrolle durchgeführt. Die Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, die in diesem *in vitro* Ansatz wesentlich höher waren als in den zellbasierten Versuchen. Zunächst wurden eIF-5A und DHS, wie unter Kapitel 5.3.7 und 5.3.8 beschrieben, rekombinant aus Bakterien aufgereinigt.

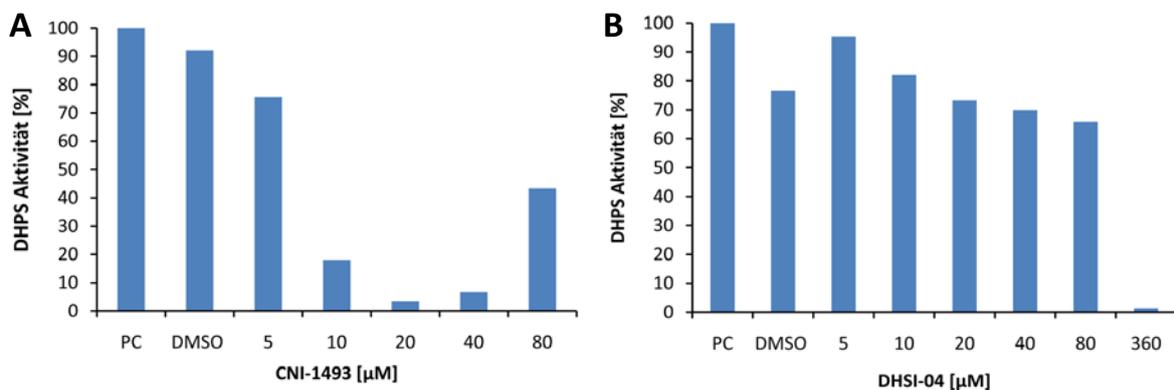


Abbildung 36: DHSI-04 inhibiert die DHS-Enzymreaktion *in vitro* erst bei hohen Konzentrationen. Die *in vitro* DHS Reaktion wurde mit rekombinant aufgereinigtem eIF-5A und DHS bei pH 9 in Gegenwart der Substrate NAD^+ und ^{14}C -markiertem Spermidin sowie der Inhibitoren CNI-1493 (A) und DHSI-04 (B) in den angegebenen Konzentrationen für 1 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine an eine Membran gebunden und die Substrate durch extensives Waschen entfernt. Die Aktivität wurde in einem Szintillationszähler detektiert und auf die Aktivität der Reaktion ohne Inhibitor bezogen.

Die Enzymreaktion wurde in Gegenwart des Koenzyms NAD^+ und dem [^{14}C]-markierten Substrat Spermidin durchgeführt und die Proteine anschließend an eine mit unmarkiertem Spermidin geblockte Membran gebunden. Der Einbau des [^{14}C]-markierten Aminobutylrestes wurde in einem Szintillationszähler überprüft. Wie erwartet, konnte für CNI-1493 eine Dosis-abhängige Inhibition des

DHS Reaktion nachgewiesen werden (Abbildung 36). Die maximale Inhibition lag bei einer Wirkstoffkonzentration von 20 μM . Bei DHSI-04 war dieser Dosis-abhängige Effekt sehr viel geringer ausgeprägt. Erst bei einer Konzentration von 360 μM zeigte sich eine annähernd vollständige Inhibition der Enzymreaktion.

6.1.2.4 Funktionelle Charakterisierung von DHSI-04

Die DHS-Reaktion konnte erst bei sehr hohen Konzentrationen an DHSI-04 *in vitro* inhibiert werden. Dies warf die Frage auf, ob es sich bei DHSI-04 tatsächlich um einen spezifischen Inhibitor der DHS handelt. Um diese Frage weiter zu untersuchen, wurden funktionelle Assays in HeLa Zellen durchgeführt. Es zeigte sich zunächst im Viabilitätsassay, dass HeLa Zellen bereits bei einwöchiger Behandlung mit 4 μM DHSI-04 abstarben (Abbildung 37A). Für neun Tage vorbehandelte HeLa Zellen wurden entweder mit dem proviralen HIV-1 Reporterkonstrukt HXB2 ΔBam mit und ohne Rev transfiziert oder mit den Konstrukten GPV-RRE mit und ohne Rev sowie GPV-4xCTE, bei dem die RNA Rev-unabhängig über den zellulären TAP mRNA Exportweg in das Zytoplasma transportiert wird. Als Transfektionskontrolle wurde jeweils SEAP kotransfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Mengen an p24 (ELISA) und SEAP im Zellkulturüberstand bestimmt.

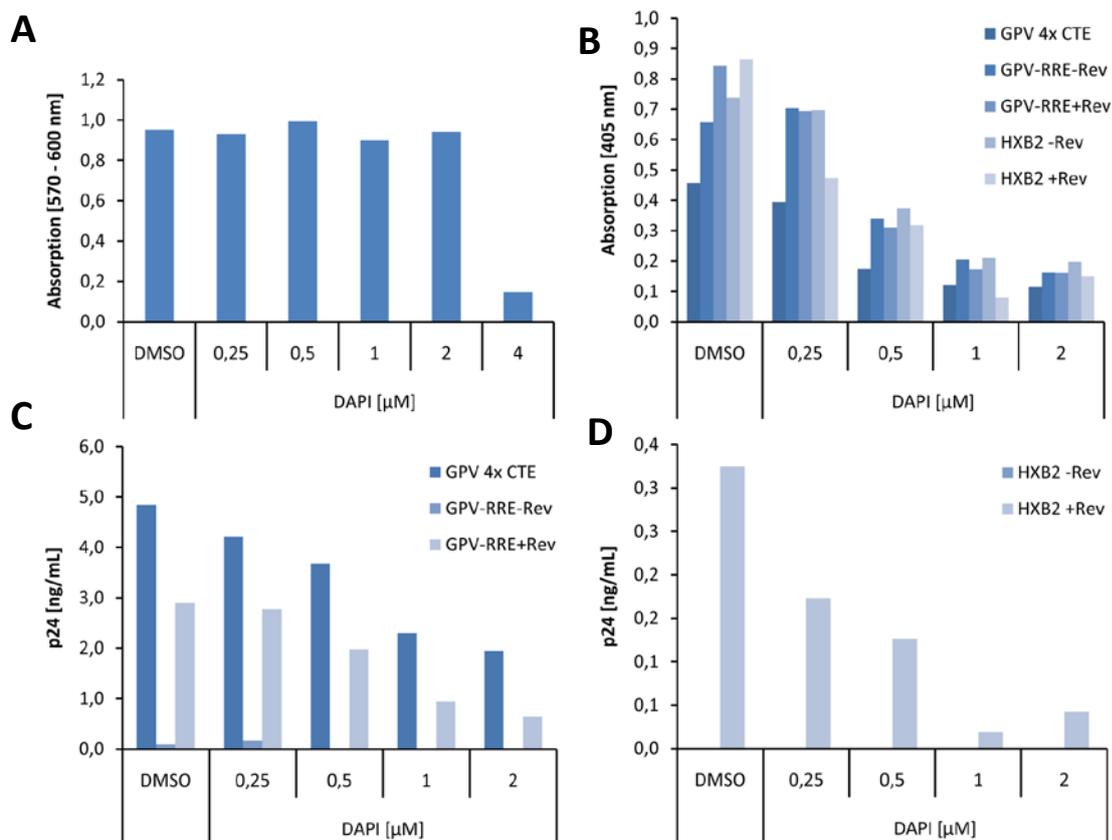


Abbildung 37: Behandlung von HeLa Zellen mit DHSI-04 (DAPI). Auswirkungen auf die Viabilität (A), die Sekretion von SEAP (B), den Rev-unabhängigen und abhängigen Transport (C) und die Rev-Transaktivierung (D).

Wie in Abbildung 37C und D gezeigt, verminderte sich die Sekretion von p24 in beiden Reporter-assays unter Verwendung der Rev-abhängig transportierten Reporter-mRNAs Dosis-abhängig. Allerdings galt dies auch für das GPV-4xCTE Konstrukt und ebenso für die Sekretion von SEAP (Abbildung 37B). Werden die Ergebnisse aus dem p24 ELISA mit den SEAP-Aktivitäten in Relation gesetzt, wird der Unterschied in der Partikelsekretion von behandelten zu unbehandelten Zellen aufgehoben. In der Transfektion mit den GPV-Konstrukten resultiert daraus ein apparenter Anstieg der p24 Menge bei höheren DHSI-04 Konzentrationen.

Bei DHSI-04 handelt es sich um den in der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Kernfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), der bevorzugt in AT-reichen Regionen in der kleinen Furche der DNA interkaliert (Morikawa et al., 1981). Auch wenn die Verbindung in einer Konzentration eingesetzt wurde, die in den Toxizitätsstudien keine Beeinträchtigung der zellulären Lebensfähigkeit gezeigt hat, wäre eine Behinderung des Transkriptionsvorgangs denkbar. Besonders deutlich scheint der Einfluss bei transient transfizierten Plasmiden zu sein, die episomal und nicht verpackt im Kern vorliegen, während der Effekt auf das chromosomal vorliegende provirale HIV-1 Genom erst bei höheren DAPI Konzentrationen auftritt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass bei dieser ersten Auswahl an potenziellen Inhibitoren der DHS, die im Rahmen des Konsortiums „*Combating Drug Resistance*“ in einem rationalen Ansatz entworfen wurden, keine Verbindung in der Lage war, das Enzym spezifisch in ähnlicher Intensität wie CNI-1493 zu hemmen. Es sind daher weitere Optimierungen bei den Berechnungen der Bindungsverhältnisse und auch neue Überlegungen für die Anforderungen an die entwickelten Strukturen vorzunehmen.

6.2 Synthetische antimikrobielle Peptide als Inhibitoren der HIV und HSV Replikation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden als weitere Leitstrukturen in der antiviralen Therapie verschiedene Peptide auf ihre potenziell inhibitorische Wirkung in der HIV-1 und HSV-1/-2 Infektion untersucht. Diese Peptide wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Klaus Brandenburg (Forschungszentrum Borstel) unter dem rationalen Gesichtspunkt entworfen, Lipopolysaccharid (LPS) zu binden.

LPS ist ein integraler Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und besteht aus drei Teilen: dem O-Antigen, der Kernregion und dem Lipid A oder Endotoxin (Lüderitz et al., 1973). Das O-Antigen ist ein Polysaccharid, das je nach Bakterienart verschieden ist und zu deren Unterscheidung genutzt werden kann. Die Kernregion stellt ein Oligosaccharid dar, das häufig Phosphorylierungen und/oder andere Modifikationen aufweisen kann. Das an die Kernregion gebundene Lipid A bildet den Anker in der bakteriellen Membran und besteht aus einem phosphorylierten Glukosamin-Disaccharid, an das sechs Fettsäurereste gekoppelt sind. LPS wird bei der bakteriellen Zellteilung fortwährend abgegeben und besonders beim Absterben der Bakterien, z. B. als Folge eines Angriffs durch das Immunsystem, massiv freigesetzt. Dies führt durch die Bindung von LPS über Lipid A an den *toll-like* Rezeptor 4 (TLR-4) zur Aktivierung der angeborenen Immunabwehr und resultiert in der Ausschüttung von Zytokinen, was zur weiteren Aktivierung des Immunsystems beiträgt. Dieser Effekt kann durch die Behandlung mit Breitband-Antibiotika noch verstärkt werden, da es eine weitere Freisetzung von LPS zur Folge hat. Im schlimmsten Fall führt dies zu einem septischen Schock, dem in Deutschland rund 60.000 Menschen pro Jahr erliegen.

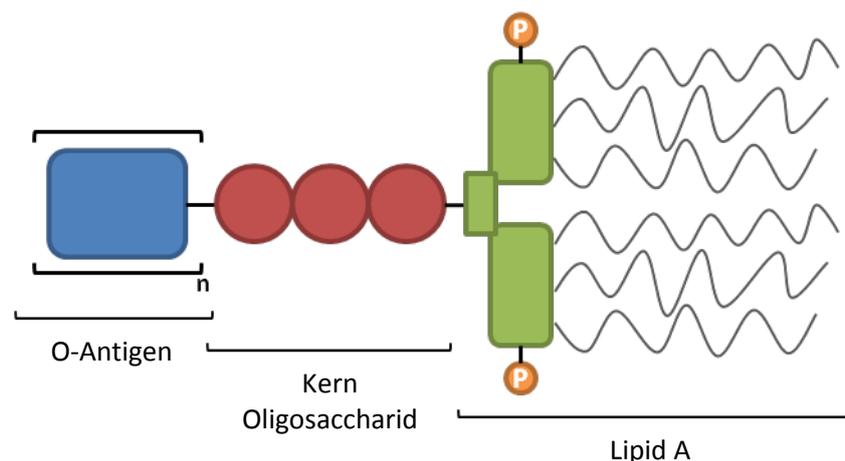


Abbildung 38: Schematische Darstellung von Lipopolysaccharid.

Natürlich vorkommende Gen-kodierte antimikrobielle Peptide (AMP) werden von allen Lebewesen als Teil einer evolutionär hochkonservierten Komponente der angeborenen Immunabwehr eingesetzt. Als übergeordnetes Aufbauprinzip besitzen sie nicht mehr als 60 Aminosäuren, sind insgesamt positiv geladen und amphiphil (Zasloff, 2002). AMP richten sich dabei nicht ausschließlich gegen

Gram-positive und -negative Bakterien (Brogden, 2005), sondern haben ein ausgesprochen breites Wirkspektrum gegenüber Mikroorganismen wie Fungi (Aerts et al., 2008), Mycoplasmen (Kuwano et al., 2006) und auch Viren (Klotman und Chang, 2006). Zu der Gruppe der Letzteren zählen vor allem die sogenannten Defensine (Ganz et al., 1985), für die eine antivirale Aktivität gegen verschiedene umhüllte Viren beschrieben wurde, unter anderem auch gegen HIV-1, HSV oder VSV. AMP stellen damit eine vielversprechende Basis für die Entwicklung neuer Therapeutika dar.

Die hier untersuchten antimikrobiellen Peptide sind 19-20 Aminosäure lang, kationisch und aufgrund eines hydrophoben C-Terminus amphiphil (Tabelle 2). Dadurch sind sie in der Lage, den Lipid A-Teil von LPS zu binden und die Interaktion mit dem TLR-4 sowie die Zytokinfreisetzung zu inhibieren. Dadurch kann ein septischer Schock im Mausmodell verhindert werden (Gutsmann et al., 2010). Aufgrund ihrer Eigenschaften wurden sie SALP getauft, *synthetic anti-lipopolysaccharide peptides*.

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Peptide. Neutrale Aminosäuren sind grün, kationische blau, hydrophobe gelb und anionische rot dargestellt.

Name	Sequenz	Molmasse [Da]
Pep19-2.5	GCKKYRRFRWKF KG FWFWG	2711
Pep19-4	GKKYRRFRWKF KG WFWFG	2750
Pep19-5	GKKYRRFRWKF RKGR FWFWG	2608
Pep19-8	GRRYKKFRWKF GR WFWFG	2636
Pep19-2c	GCKKYRRFRWKF KG FWFWCG	2814
Kontrollpeptid	CPAQRKEETF KKYRA	1855

Die in dieser Arbeit näher untersuchten und auf ihren Wirkmechanismus charakterisierten SALP sind in Tabelle 2 aufgeführt. Das verwendete Kontrollpeptid ist etwas kürzer, ebenfalls insgesamt positiv geladen, enthält jedoch weniger hydrophobe Aminosäurereste und zudem zwei negativ geladene Glutaminsäurereste.

6.2.1 Analyse der zellulären Toxizität

Zunächst wurde der Einfluss der untersuchten Peptide auf die Lebensfähigkeit relevanter Zelllinien getestet. Für die adhärenenten Zelllinien TZM-bl und Vero sowie die T-Zelllinie Jurkat TAg wurde die Wirkung der Peptide auf den Zellmetabolismus im AlamarBlue bzw. im MTT Assay untersucht (Abbildung 39). Für TZM-bl und Vero Zellen wurden Verdünnungsreihen der Peptide Pep19-2.5, Pep19-4 und des Kontrollpeptids in Kulturmedium von 2,5 - 80 µg/mL angesetzt und die Zellen für drei Tage darin kultiviert. Bei den TZM-bl Zellen zeigte sich im AlamarBlue Assay eine Verminderung des Reduktionspotenzials der Zellen ab einer Konzentration von 40 µg/mL für Pep19-2.5 und ab 80 µg/mL für Pep19-4. Bei der Behandlung mit Kontrollpeptid wurden alle Konzentrationen ohne

Toxizität toleriert. Dies war auch bei Vero Zellen der Fall. Diese zeigten lediglich bei 80 µg/mL Pep19-2.5 eine leichte Verminderung der Viabilität. Um die folgenden Versuche einheitlich zu gestalten, wurde, wenn nicht anderes angegeben, die maximale subtoxische Konzentration von 20 µg/mL für alle Peptide verwendet.

Die T-Zelllinie Jurkat TAG wurde für 10 Tage mit 20 µg/mL der Peptide kultiviert. An Tag drei und sieben wurden das Medium gewechselt und dabei frisches Peptid hinzugefügt. Am zehnten Tag wurde ein möglicher Einfluss auf die Zellviabilität sowohl im MTT als auch im AlamarBlue Assay untersucht (Abbildung 39C und D). Dabei konnte kein ausgeprägter Unterschied zwischen Peptid-behandelten und unbehandelten Kontrollzellen festgestellt werden.

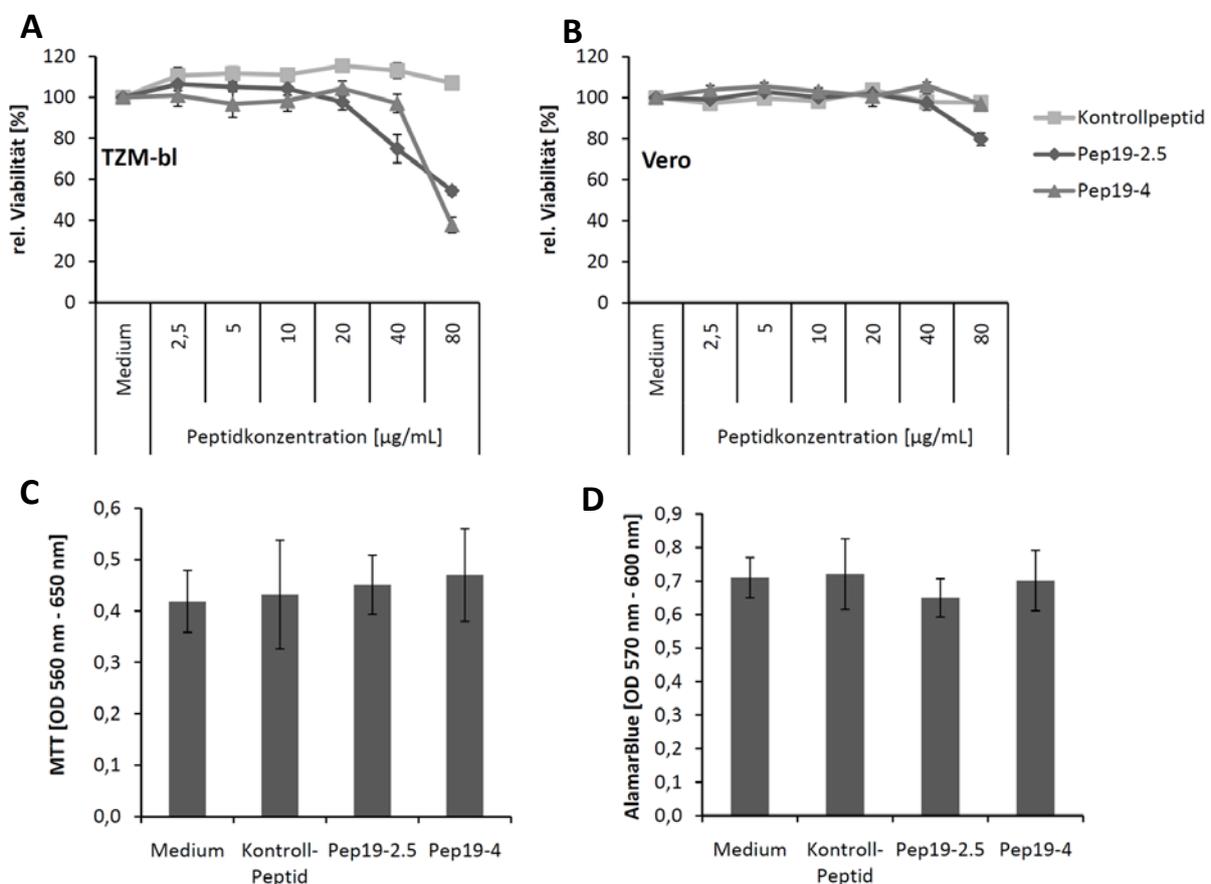


Abbildung 39: Bestimmung des Einflusses der SALP auf den Zellmetabolismus. TZM-bl (A) und Vero (B) Zellen wurden für 3 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen der Peptide inkubiert und anschließend die Zellviabilität im AlamarBlue Assay bestimmt. Jurkat TAG Zellen wurden für 10 Tage mit 20 µg/mL der angegebenen Peptide behandelt und im MTT (C) oder AlamarBlue Assay (D) auf einen möglichen Effekt der Behandlung auf den Zellmetabolismus untersucht.

Darüber hinaus wurden die für 10 Tage in Peptid-haltigem Medium kultivierten T-Zellen auf eine eventuelle Induktion von Apoptose sowie auf einen möglichen Effekt auf die Zellzyklusprogression analysiert. Für den Apoptose Assay wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und AnnexinV-APC gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen. Die Peptidbehandlung führt jedoch nicht zur Veränderung des Apoptosemusters der kultivierten Zellen (Abbildung 40A).

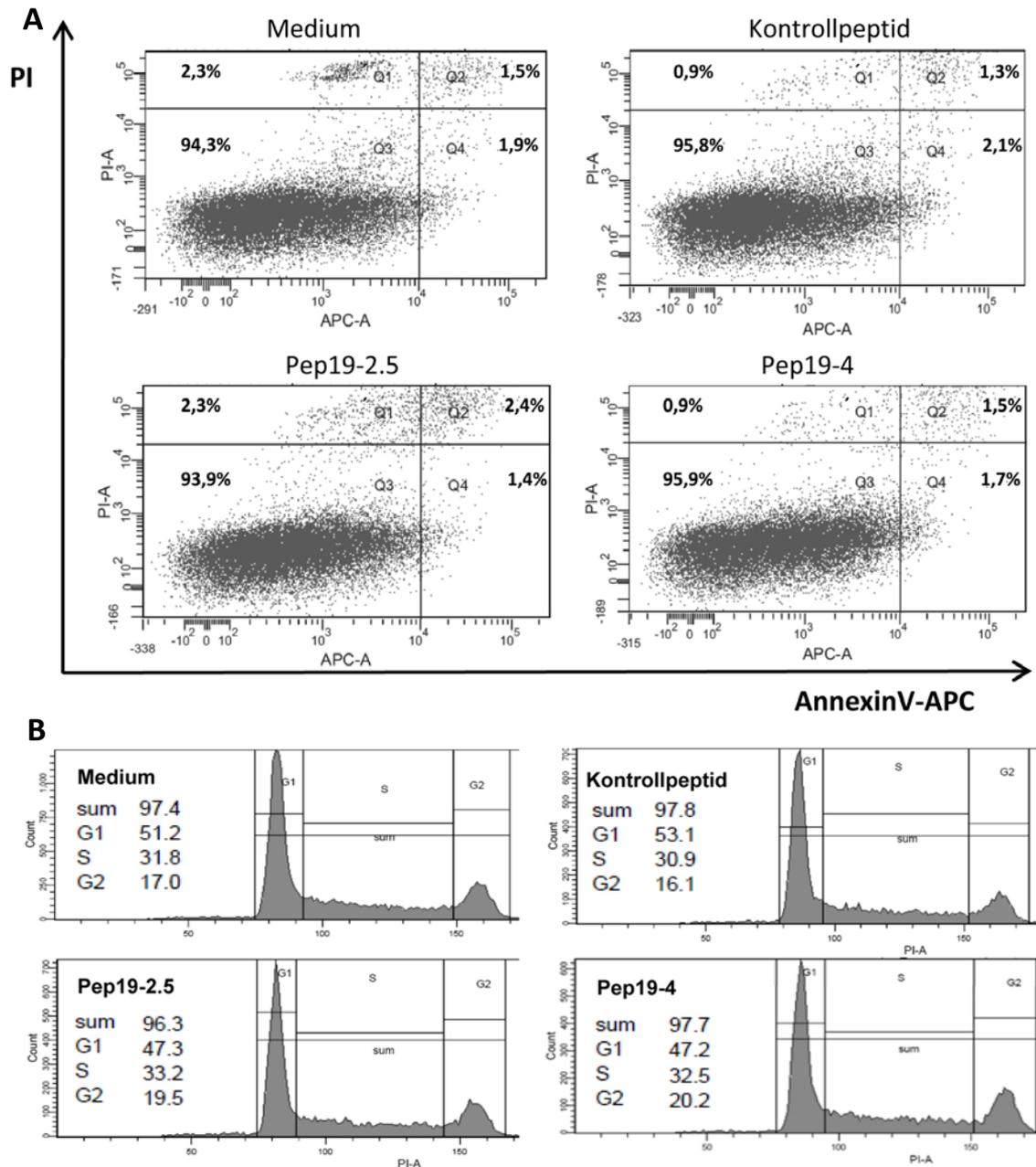


Abbildung 40: Einfluss der SALP auf Apoptoseverhalten und Zellzyklusprogression. Jurkat TAg Zellen wurden für 12 Tage mit 20 µg/mL der genannten Peptide inkubiert. An jedem dritten Tag wurde das Medium gewechselt und frisches Peptid zugegeben. (A) Die Zellen wurden anschließend mit Propidiumiodid (PI) und AnnexinV-APC angefärbt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurde die Verteilung der Zellen bestimmt (oben links: tote Zellen, oben rechts: spät-apoptotische Zellen, unten links, lebende Zellen, unten rechts: früh-apoptotische Zellen). (B) Alternativ wurden die Zellen für eine Anfärbung der DNA mit PI mit Ethanol fixiert und permeabilisiert. Die Verteilung der Zellen wurde mittels FACS gemessen.

Auch in der Zellzyklus-Analyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und mit Peptid inkubierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 40B). Abschließend kann festgestellt werden, dass die untersuchten SALP bei einer Konzentration von 20 µg/mL weder einen negativen Einfluss auf den Zellmetabolismus, noch auf das Apoptoseverhalten oder das Zellzyklusmuster zeigen.

6.2.2 Inhibition der HIV-1 Replikation

Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung der SALP in der HIV-Infektion wurden in PM1 Zellen durchgeführt. Dies ist eine T-Zelllinie mit der Besonderheit, dass sie im Gegensatz zu vielen anderen T-Zelllinien den HIV-1 Korezeptor CCR5 exprimiert. Dadurch ist sie mit R5-tropen HIV-Stämmen infizierbar, welche besonders häufig für die Primärinfektion beim Menschen verantwortlich sind.

Zu Beginn wurden Triplikate von 2×10^8 PM1 Zellen mit 3 ng p24 des R5-tropen HIV-1 Stamms BaL für 3 h bei 37°C infiziert, anschließend mit PBS gewaschen und Peptid-haltigem Medium bei einer Konzentration von 20 µg/mL für 12 Tage kultiviert. An jedem dritten Tag wurde die Viruslast im zellfreien Kulturüberstand mittels p24 ELISA bestimmt und die Zellviabilität im AlamarBlue Assay gemessen. Die Zellen wurden zudem passagiert und in frischem Medium mit neu zugefügtem Peptid weiterkultiviert. Hierbei zeigte sich eine deutliche Inhibition der p24 Menge und damit der Sekretion von Viruspartikeln, bei gleichzeitigem Ausbleiben eines toxischen Effekts (Abbildung 41). Der stärkste inhibitorische Effekt trat neun Tage nach Inhibition auf. Die Peptide Pep19-4 und Pep19-8 waren hier in der Lage, die HIV-1 Replikation über 90% zu inhibieren. Aufgrund der noch sehr niedrigen Viruslast an Tag 3 wurden die Werte hierfür in einem anderen Maßstab dargestellt. Selbst zu diesem recht frühen Zeitpunkt zeigte sich bereits eine Inhibition von über 50% durch die SALP-Behandlung, wobei sich die gemessenen p24-Mengen im unteren Bereich der Nachweisgrenze dieses Detektionsverfahrens befanden.

In einem weiteren Ansatz sollte nun unter ähnlichen Versuchsbedingungen die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der HIV-1 Replikation durch die SALP bestimmt werden. Da die Peptide einen in der Intensität ähnlichen inhibitorischen Effekt aufwiesen, wurden für zwei der wirksamsten Peptide, Pep19-2.5 und Pep19-4, verschiedene Verdünnungen in den folgenden Studien eingehender untersucht.

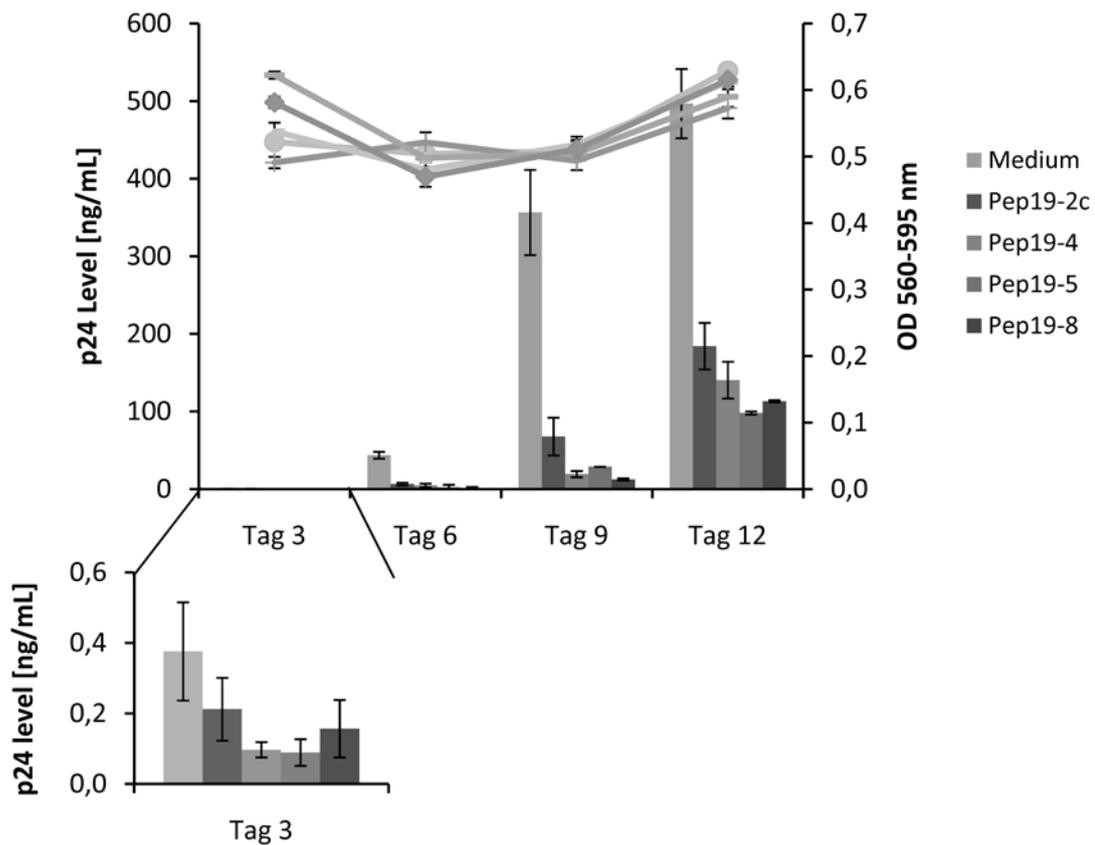


Abbildung 41: Analyse der Inhibition der HIV-1 Replikation durch SALP. PM1 Zellen wurden mit HIV-1 BaL infiziert und anschließend in reinem Medium oder Medium mit 20 µg/mL unterschiedlicher Peptide für 12 Tage inkubiert. An jedem dritten Tag wurde sowohl die p24 Menge im Zellkulturüberstand bestimmt (Balken) als auch die Lebensfähigkeit der Zellen gemessen (Linien, AlamarBlue Assay). Da die Virusmengen an Tag 3 sehr niedrig waren, sind die Werte hierfür in dem unteren Diagramm in einem anderen Maßstab wiedergegeben.

Die SALP wurden in den Konzentrationen 2,5, 5, 10 und 20 µg/mL getestet. In Abweichung zu der vorher beschriebenen Versuchsanordnung wurden die Zellen nun bei jeder Passage einmal mit Medium gewaschen, um die im Überstand vorliegenden Viruspartikel zu verdünnen und um die potenziell verschleppte Virusmenge bei der Passage zu minimieren. Wie in Abbildung 42 zu erkennen, erfolgt die Inhibition der Virusreplikation Dosis-abhängig. Bei einer Konzentration von 20 µg/mL SALP waren an den Tagen 8, 10 und 12 besonders bei Pep19-2.5 kaum noch Viruspartikel im p24 ELISA nachweisbar. Aber auch Pep19-4 inhibierte die Sekretion von Viruspartikeln in den Kulturüberstand zu 90%. Niedrigere Konzentrationen hemmten weniger stark. Auffällig bei den niedrigeren Konzentrationen war, dass der Effekt zu späteren Zeitpunkten (Tag 10, Tag 12) abnahm. Vermutlich war die Peptidmenge nicht ausreichend, die Viruspartikelsekretion derart zu hemmen, dass eine effektive Vermehrung und die weitere Infektion anderer Zellen verhindert werden konnte. Dies würde dazu führen, dass die Gesamtviruslast über die Zeit ansteigt, wodurch wiederum die Inhibition durch eine suboptimale Peptidkonzentration noch schwächer ausfällt.

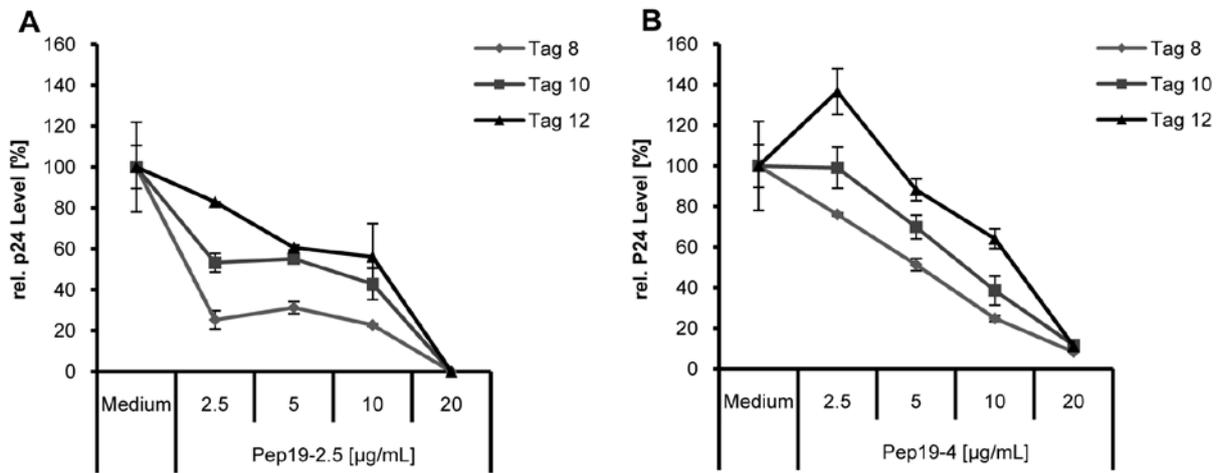


Abbildung 42: Titration der antiviralen Aktivität der SALP. Für die Untersuchung der Dosis-abhängigen antiviralen Aktivität der SALP wurden HIV-1 BaL infizierte PM1 Zellen über 12 Tage mit verschiedenen SALP-Konzentrationen oder Medium allein inkubiert. An den Tagen 8, 10 und 12 wurde die Viruslast im Zellkulturüberstand im p24 ELISA bestimmt und in Relation zu den Werten für unbehandelte Zellen aufgetragen.

Parallel zur Viruslast wurde auch die Viabilität der Zellkulturen verfolgt (Abbildung 43). Bemerkenswert hierbei ist, dass in der dargestellten Weise die Vitalität der Peptid-behandelten Zellen an Tag 12 offensichtlich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ansteigt. Dieser Unterschied ist jedoch wahrscheinlich auf die hohe Viruslast in unbehandelten Zellen zurückzuführen, die so stark angestiegen ist, dass sie toxische Auswirkungen auf die entsprechenden Kontrollkulturen ausübt. Ebenso ist zu beobachten, dass die Lebensfähigkeit der SALP-behandelten Zellen mit zunehmender Konzentration steigt, was im Umkehrschluss auf die entsprechend geringere Viruslast zurückführbar sein könnte.

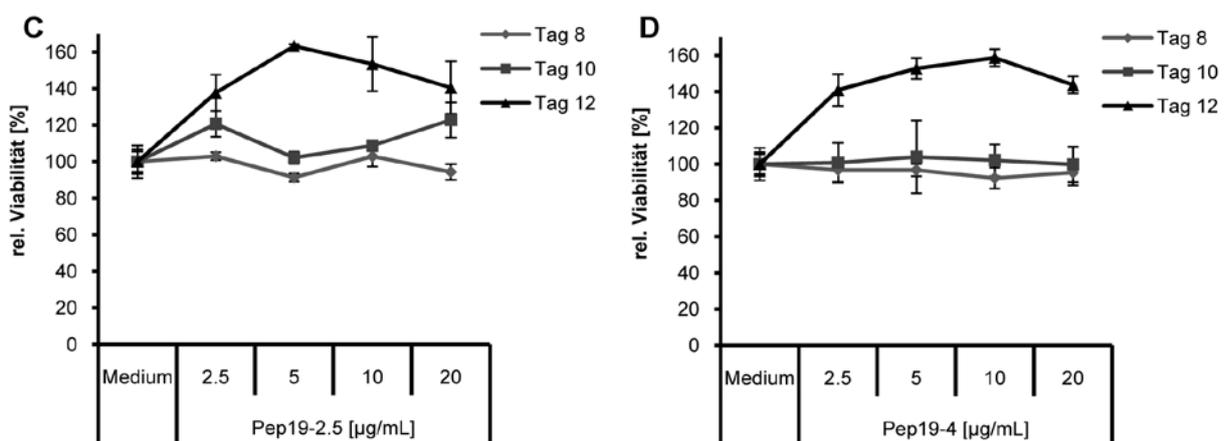


Abbildung 43: Verlauf der SALP-Konzentration abhängigen Zellviabilität während der Testung der antiviralen Aktivität. Parallel zu der Bestimmung der Viruslast (Abbildung 42) wurde der toxische Einfluss der Peptide auf die PM1 Zellen im AlamarBlue Assay gemessen.

6.2.2.1 Einfluss der SALP auf die Rev- und Tat-Transaktivierung

Nachdem eine antivirale Wirkung in der HIV-1 Infektion durch die Behandlung mit den anti-Lipopoly-saccharid Peptiden nachgewiesen werden konnte, sollte im Folgenden der Wirkmechanismus, der dieser Inhibition zugrunde liegt, näher charakterisiert werden. Dafür wurden zunächst Rev- und Tat-Transaktivierungsassays durchgeführt. Diese geben Auskunft darüber, ob SALP die Transkription der viralen RNA oder der nukleozytoplasmatische Transport ungespleißter viraler RNA zum Ziel haben. Es werden dabei Reporterstrukturen verwendet, die das Reporter-gen CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase) Tat- bzw. Rev-abhängig exprimieren. Entsprechend werden die beiden Transaktivatoren kotransfiziert. Für die Tat-Transaktivierung wird CAT von einem HIV-1 LTR-Promotor reguliert, der in Abwesenheit von Tat nur eine geringe Basalexpression ermöglicht. Ist Tat jedoch anwesend wird die Transkription enorm gesteigert. Der Rev-Reporter ist so aufgebaut, dass das CAT-Gen, reguliert von einem CMV-Promotor, von zwei HIV-1 Spleißstellen flankiert wird und an seinem 3'-Ende darüber hinaus ein RRE (*Rev response element*) trägt. In Abwesenheit von Rev verbleibt die Reporter mRNA im Zellkern und das CAT-Gen wird durch Spleißen weitestgehend entfernt. In Anwesenheit von Rev wird die ungespleißte mRNA dann in das Zytoplasma transportiert und das CAT-Gen exprimiert.

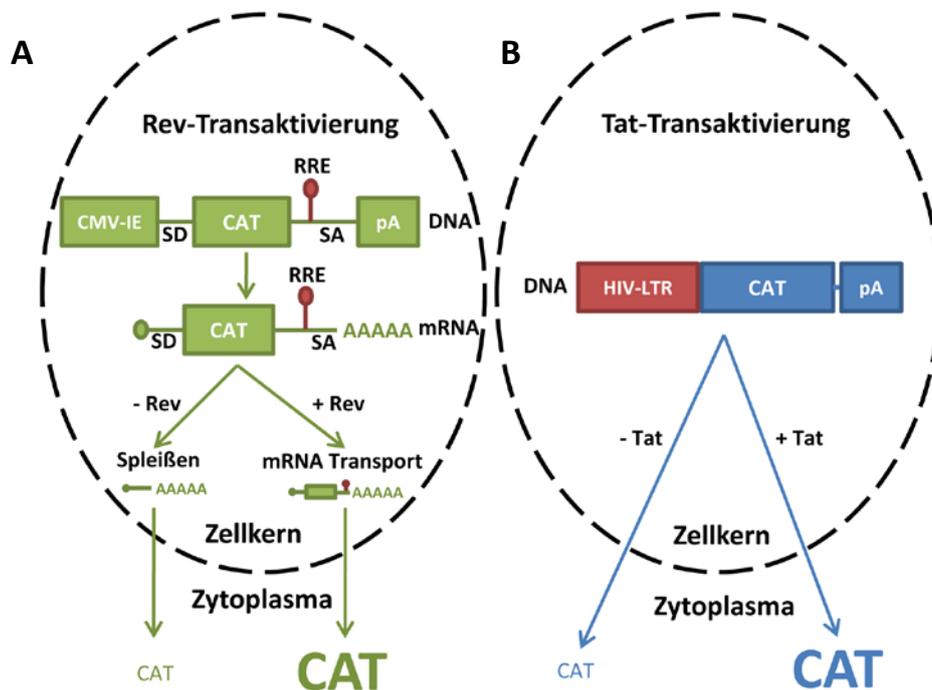


Abbildung 44: Prinzip der Rev- und Tat-Transaktivierungsassays. (A) Rev-Transaktivierung: Auf dem Rev-Reporterkonstrukt ist das CAT-Gen unter Kontrolle eines CMV-IE Promotors und wird, zusammen mit dem RRE, flankiert von HIV-1 Spleißstellen (SD: Spleißdonor, SA: Spleißakzeptor). In Abwesenheit von Rev wird das Reporter-gen durch Spleißen entfernt und es kommt lediglich zu Hintergrund-CAT-Signalen. Rev bindet an das RRE und vermittelt die nukleozyto-plasmatische Translokation der intronhaltigen mRNA. (B) Tat-Transaktivierung: Die Transkription des CAT-Gens wird durch den HIV-LTR Promotor reguliert. In Abwesenheit von Tat werden lediglich basale Level des Reporter-gens exprimiert. Tat vermittelt eine massive Steigerung der CAT-Expression.

Für die Untersuchung der SALP Aktivität hinsichtlich dieser Regulationsschritte im HIV-1 Lebenszyklus wurden HeLa Zellen mit den entsprechenden Konstrukten und einem β -Galaktosidase Plasmid als Transfektionskontrolle kotransfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Peptid behandelt und für weitere 48 h kultiviert. Die CAT-Expression wurde aus den Zelllysaten in einem CAT ELISA (Roche, Mannheim) bestimmt, mit den Werten der Galaktosidase-Aktivität normiert und auf die Expression der unbehandelten Kontrollzellen bezogen (Abbildung 45). Hierbei konnte gezeigt werden, dass weder die Rev- noch die Tat-Transaktivierung durch SALP beeinflusst werden.

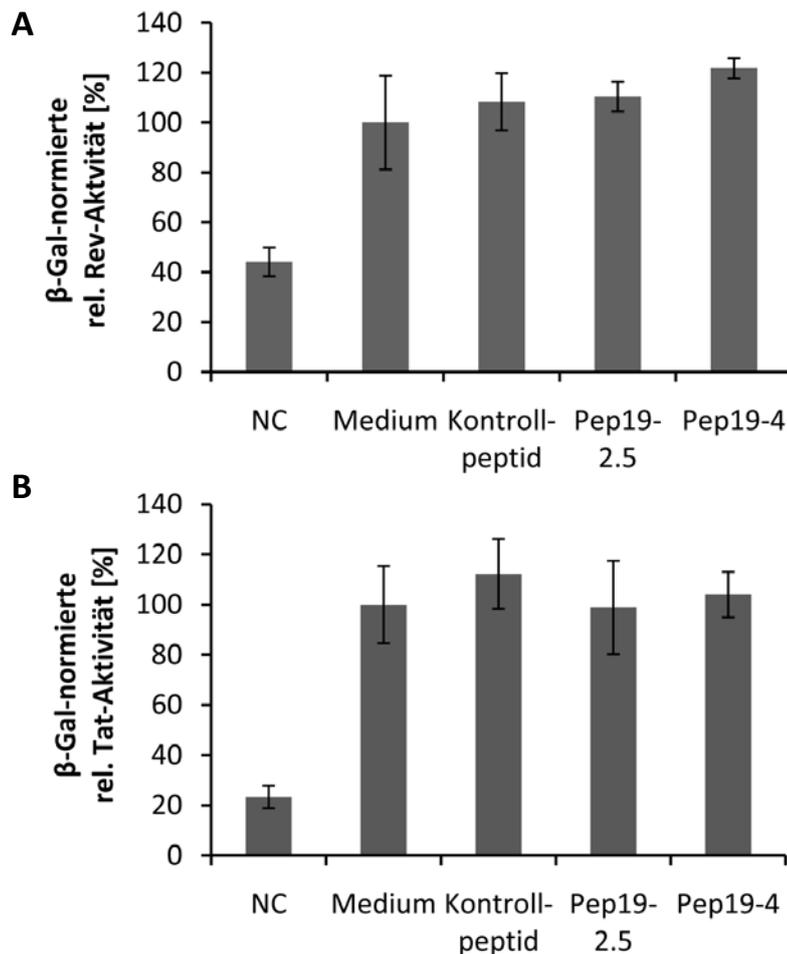


Abbildung 45: Die Peptide zeigen keinen Einfluss auf die Rev- und Tat-Transaktivierung. Hierfür wurden HeLa Zellen mit einem Reporterplasmid entweder für die (A) Rev- (pDM128/RRE) oder (B) Tat- (pBC12/HIV/CAT) Transaktivierung und Konstrukten ihrer jeweiligen Transaktivatoren, pcRev und pTat, kotransfiziert. Zusätzlich wurde ein Plasmid zur Expression der β -Galaktosidase als Transfektionskontrolle zugesetzt. 48 h nach Transfektion wurden die Zelllysate einem CAT ELISA unterzogen und die erhaltenen Werte mit den im Galaktosidase-Assay ermittelten Werten normalisiert. Gezeigt sind die relativen Transaktivator-Aktivitäten im Verhältnis zum Signal unbehandelter Zellen.

6.2.2.2 Einfluss der SALP auf frühe Schritte des HIV-1 Lebenszyklus

Im folgenden Assay wurden die Abschnitte in der HIV-1 Replikation beleuchtet, die vor der Tat-Transaktivierung stattfinden. Dafür wurde die TZM-bl Reporterzelllinie verwendet (Abbildung 46A), ein HeLa-Derivat, das durch Transduktion mit retroviralen Vektoren stabil die für die HIV-1 Infektion

notwendigen Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 exprimiert. Diese Zellen können also sowohl von M-tropen als auch T-tropen HIV-1 Stämmen infiziert werden. Ferner tragen TZM-bl Zellen eine Reporterengenkassette, die Luciferase Tat-abhängig mit Hilfe eines LTR-Promotors exprimiert. Nach HIV-1 Infektion und Integration des Provirus sorgt das daraufhin gebildete Tat für die Reporterexpression, die mit einem Luciferase Assay quantifiziert werden kann.

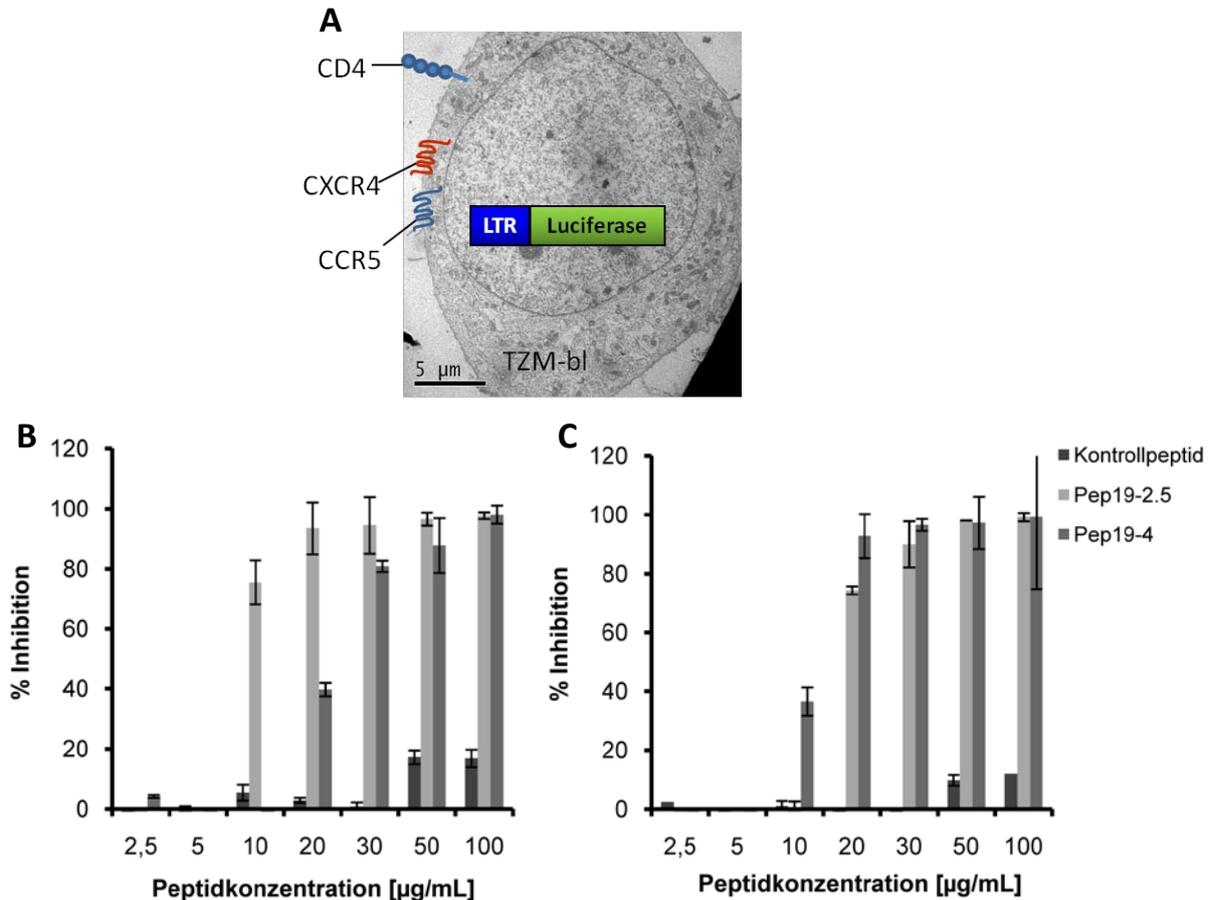


Abbildung 46: SALP inhibieren frühe Schritte im HIV-1 Lebenszyklus. (A) Elektronenmikroskopische Darstellung einer TZM-bl Zelle mit den schematisch dargestellten stabil exprimierten Rezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5 sowie der LTR-Luciferase Reporterengenkassette. (B) und (C): TZM-bl Zellen wurden mit den angegebenen Mengen oder ohne Peptid für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 5 ng p24 HIV-1 BaL (B) oder NL4-3 (C) pro 10^4 Zellen infiziert. Nach 48 h wurde die Luciferase-Aktivität der Zelllysate bestimmt und als prozentuale Inhibition dargestellt (unbehandelt = 0%).

TZM-bl Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Pep19-2.5 und Pep19-4 sowie Kontrollpeptid für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend entweder mit R5-tropen HIV-1 BaL oder X4-tropen NL4-3 infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und das Luciferase-Signal lumino-metrisch detektiert. Das Kontrollpeptid hatte dabei keine Auswirkung auf die Tat-induzierte Luciferase-Expression. Pep19-2.5 hingegen konnte in der HIV-1 BaL Infektion schon bei einer Konzentration von 10 µg/mL das Signal um über 70% hemmen, bei 20 µg/mL sogar um über 90%. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen aus der Infektion von PM1 Zellen. Bei HIV-1 NL4-3 infizierten TZM-bl Zellen hingegen, wirkte Pep19-2.5 schwächer und konnte bei 20 µg/mL die

Infektion lediglich zu 70% hemmen, während 10 µg/mL nicht inhibitorisch wirkten. Bei Pep19-4 verhielt es sich annähernd umgekehrt. Es verhinderte die Luciferase-Expression bei HIV-1 BaL infizierten Zellen mit einer Konzentration von 20 µg/mL um etwa 40%, während es bei 10 µg/mL nicht aktiv war. Die Infektion mit HIV-1 NL4-3 wurde bereits mit 10 µg/mL Peptid zu fast 40% und bei 20 µg/mL zu über 90% inhibiert. Aus der Titration der Peptide ließen sich die IC₅₀ Konzentrationen errechnen (Tabelle 3). Aufgrund dieser Ergebnisse scheinen die Peptide eine gegensätzliche Spezifität zu R5- und X4-tropen Virusstämmen aufzuweisen. Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass die Peptide einen offensichtlich frühen Schritt im HIV-1 Replikationszyklus vor der Tat-Transaktivierung hemmen.

Tabelle 3: IC₅₀-Werte der getesteten SALP im TZM-bl Assay.

Peptid	BaL [µg/mL]	BaL [µM]	NL4-3 [µg/mL]	NL4-3 [µM]
Pep19-2.5	8	2,9	16	5,9
Pep19-4	22	8,0	10	3,6

6.2.2.3 Zell-Zell-Fusionsassay

Die HIV-induzierte Zell-Zell-Fusion stellt einen wesentlichen Beitrag zur Ausbreitung des Virus dar. Infizierte Zellen produzieren HIV-1 Hüllproteine (Env) und transportieren diese zur Zelloberfläche, wo sie in der gleichen Orientierung wie im späteren Virion präsentiert werden. Damit kann die Zelle bei Kontakt der membranständigen Env Proteine mit anderen Zielzellen, vergleichbar der Virus-Zell-Fusion, eine Fusion der Plasmamembranen auslösen. Dieser Vorgang kann sich mehrfach wiederholen, was zur Ausbildung von mehrkernigen Zellen, sogenannten Syncytien, führt. Um dieses Ereignis zu simulieren werden 293T Zellen mit Env und Tat Expressionsvektoren kotransfiziert und anschließend mit der Reporter-T-Zelllinie Jurkat 1G5 kokultiviert, welche wie die TZM-bl Zellen ebenfalls eine LTR-Luciferase Reporterengenkassette tragen. Die auf den 293T Zellen präsentierten Env Moleküle vermitteln dann über die natürlich vorkommenden CD4 und CXCR4 Rezeptoren der Jurkat 1G5 Zellen die Zell-Zell-Fusion, wodurch Tat aus den 293T Zellen in den Zellkern der Jurkat Zellen gelangt und die Luciferase-Expression initiiert (Abbildung 47).

Die Wirkung der SALP auf die Zell-Zell-Fusion wurde in diesem System getestet. Dafür wurden transfizierte 293T Zellen und Jurkat 1G5 Zellen als Einzelkulturen für 1 h bei 37°C mit 20 µg/mL Peptid inkubiert und erst dann, in Gegenwart der Peptide, kokultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase Expression bestimmt. Wie in Abbildung 48 zu sehen, war Pep19-4 in der Lage, die Zell-Zell-Fusion moderat um 30% zu inhibieren. Die Behandlung mit Pep19-2.5 allerdings verhinderte die Fusion der beiden Zelllinien um 70%. Dies ist besonders bemerkenswert, da die Zell-Zell-Fusion wegen der hohen Konzentration von Env Molekülen an der Zelloberfläche unter Bildung von

sogenannten viralen Synapsen um 2-3 Größenordnungen effizienter abläuft als die Infektion durch zellfreie Viruspartikel (Dimitrov et al., 1993).

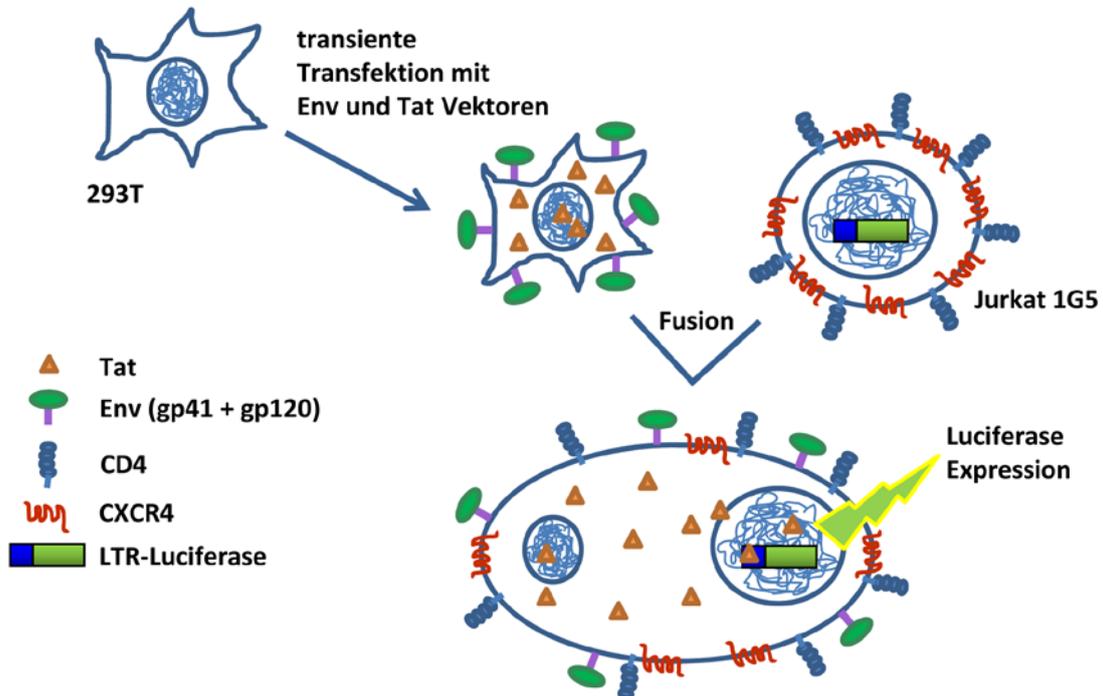


Abbildung 47: Prinzip des verwendeten Zell-Zell-Fusionsassays (schematische Darstellung). Adhärenente 293T Zellen werden transient mit Expressionsvektoren für das HIV-1 NL4-3 Hüllprotein Env und den Transaktivator der Transkription Tat transfiziert. Hierdurch wird Env auf der 293T Zelloberfläche präsentiert und ist in der Lage, durch Interaktion mit CD4 und CXCR4-Rezeptoren von Jurkat 1G5 die Fusion der Zellmembranen einzuleiten. Jurkat 1G5 Zellen tragen ein Luciferase-Gen unter der Kontrolle des HIV-1 LTR Promotors. Nach der Fusion kann Tat aus den 293T Zellen in den Zellkern der Jurkat 1G5 Zellen und dort die Transkription des Luciferasegens aktivieren. Die Luciferase-Expression wird daraufhin luminometrisch quantifiziert.

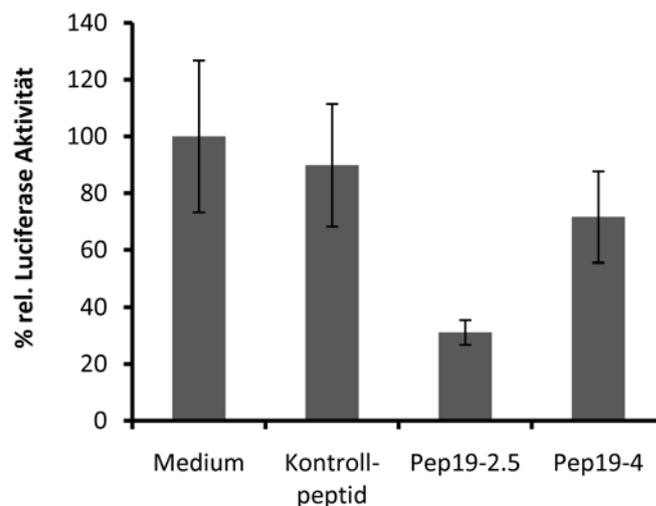


Abbildung 48: SALP sind in der Lage die Zell-Zell-Fusion zu vermindern. Wie oben beschrieben wurden 293T Zellen mit Tat- und Env-Vektoren transient transfiziert. Am folgenden Tag wurden transfizierte 293T Zellen und Jurkat 1G5 Zellen jeweils mit oder ohne 20 µg/mL Peptid behandelt und nach 1 h kokultiviert. Nach weiteren 24 h wurde die Luciferase-Aktivität aus den Zelllysaten bestimmt, wobei die Aktivität für unbehandelte Zellen auf 100% gesetzt wurde.

6.2.2.4 Einfluss der SALP auf die Anheftung von HIV-1 Viruspartikeln an Wirtszellen

Als erster Schritt während der Virusinfektion muss sich das Virus an die potenzielle Wirtszelle anheften. Um zu analysieren, ob die Behandlung mit SALP eine Wirkung auf diese erste Virus-Zell-Interaktion hat, wurden TZM-bl Zellen mit SALP und Kontrollpeptid behandelt und bei 4°C mit 20 ng BaL HI-Viren inkubiert. Diese Temperatur wurde gewählt, um den Eintritt von Viren in die Zellen zu verhindern. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen, lysiert und die Menge an p24 mittels ELISA ermittelt. In Abbildung 49 sind die Ergebnisse dargestellt. Es wird daraus deutlich, dass die Behandlung mit SALP die Anheftung der Viruspartikel an die Zelloberfläche deutlich verringert. So sind nach Behandlung mit Pep19-4 ca. 80% weniger Viruspartikel und nach Inkubation von Pep19-2.5 sogar ca. 90% weniger gebundene Viruspartikel detektierbar.

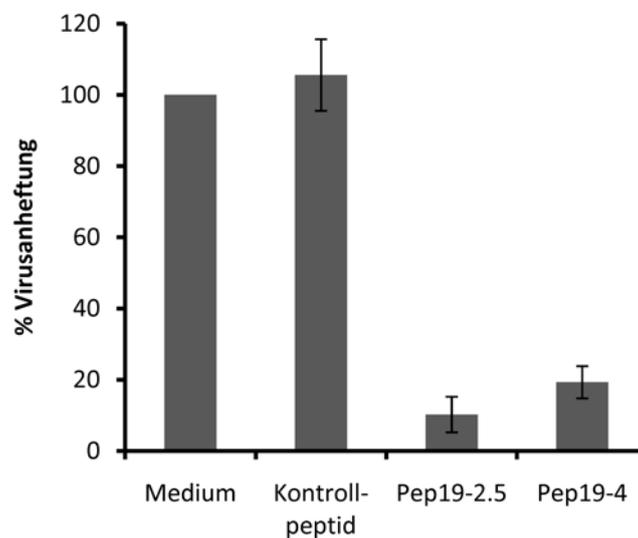


Abbildung 49: SALP verhindern die Anheftung von HIV-1 Partikeln an Zielzellen. Hier wurden 5×10^5 TZM-bl Zellen für 1 h bei 37°C mit oder ohne 20 µg/mL Peptid inkubiert und anschließend auf 4°C gekühlt. Die Virusbindung von 20 ng/mL p24 HIV-1 BaL an die Zellen erfolgte für 30 min, wonach diese 5x mit PBS gewaschen und daraufhin in 0,5% NP-40 in PBS lysiert wurden. Aus dem Lysat wurde die p24 Menge im ELISA bestimmt und auf die Menge im Lysat der unbehandelten Zellen bezogen.

Mit diesen Ergebnissen kann abschließend festgestellt werden, dass SALP die HIV-1 Replikation hemmen, indem sie bereits die Anheftung der Viruspartikel an die Zielzelle verhindern. Allerdings wird diese Bindung nicht komplett gehemmt, wodurch die Infektion unter diesen experimentellen Bedingungen, wenn auch sehr eingeschränkt, noch immer möglich ist.

6.2.3 Lokalisation der SALP

6.2.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation von Pep19-2.5

Um die Wechselwirkung zwischen einem SALP und der Zelle zu visualisieren, wurde eine Pep19-2.5 Variante N-terminal mit dem Chromophor NBD (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol) markiert, welches grün fluoresziert. TZM-bl Zellen wurden mit 20 µg/mL dieses Peptids inkubiert. Plasmamembranen

wurden nach Fixierung mit Dil (Molecular Probes) angefärbt. Die Zellkerne wurden anschließend mit Draq5 behandelt. Die am konfokalen Mikroskop Zeiss CLSM510 Meta aufgenommenen Bilder zeigen, dass die Zellen mit dem Peptid umgeben sind und es sich anscheinend nicht innerhalb der Zelle befinden. Um dies genauer zu untersuchen, wurden von einzelnen Zellen Stapelaufnahmen in der z-Ebene angefertigt und davon anschließend mit der Software Bitplane Imaris 6.4.2 3D-Rekonstruktionen erstellt.

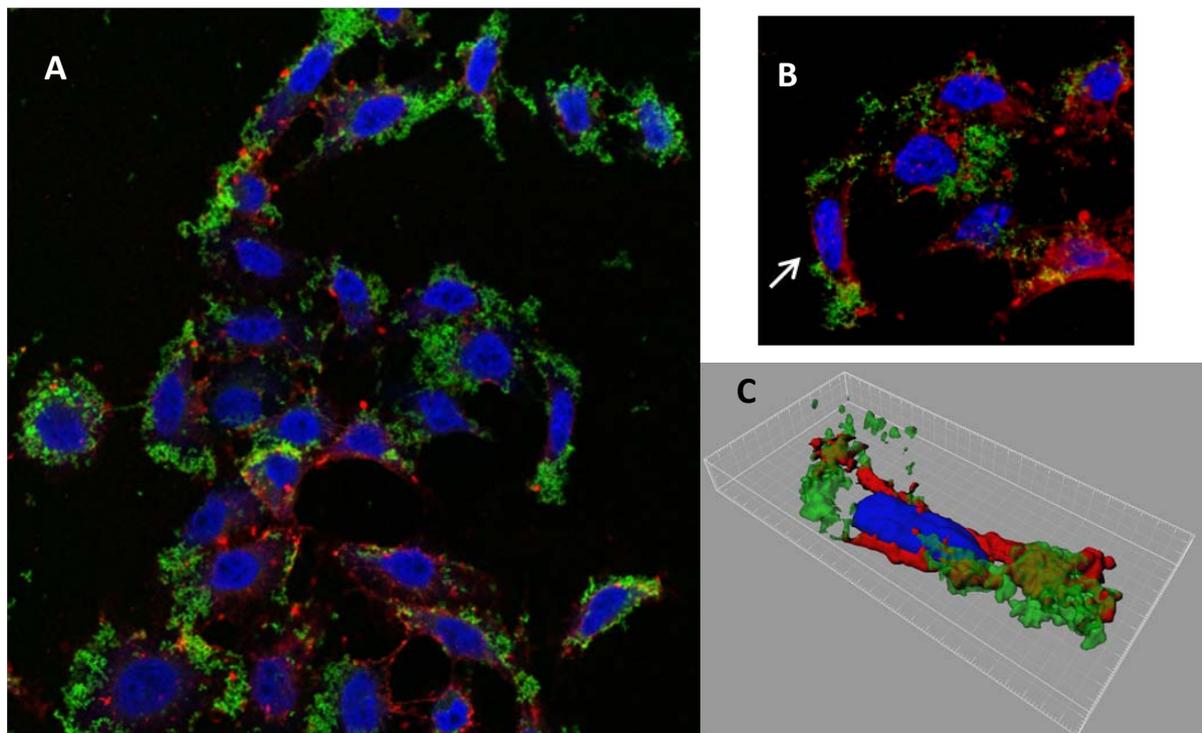


Abbildung 50: Subzelluläre Lokalisation von NBD-Pep19-2.5 auf TZM-bl Zellen. Die Zellmembran wurde mit dem lipophilen Farbstoff Dil (Molecular Probes) und die Zellkerne durch Behandlung mit Draq5 (Cell Signaling) gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten an einem Zeiss CLSM510 Meta Konfokalmikroskop. (A) Übersicht der NBD-Pep19-2.5 behandelten TZM-bl Zellen. (B) Exemplarisch wurden z-Stapel aufgezeichnet und mit der 3D-Rekonstruktion der Bitplane Imaris 6.4.2 Software prozessiert (C).

In Abbildung 50C ist eine derart prozessierte Zelle dargestellt. Aus den Fluoreszenzsignalen der einzelnen Farbkanäle wurden die Oberflächen errechnet. Zur Veranschaulichung der Ebenenfolge wurde die grüne Peptidebene halbtransparent dargestellt. Wie zu erkennen ist, befindet sich die rote Oberfläche der Plasmamembran darunter, was ein Indiz dafür ist, dass NBD-Pep19-2.5 extrazellulär gebunden vorliegt.

6.2.3.2 Elektronenmikroskopische Analyse der Peptids 19-2.5 Lokalisation

Die Bindung von Pep19-2.5 sollte für eine Analyse mit höherer Auflösung in elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen untersucht werden. Diese wurden in Zusammenarbeit mit Barbara Holstermann und Dr. Heinrich Hohenberg am Heinrich-Pette-Institut vorgenommen. Es wurden dazu drei Ansätze gewählt. Zunächst wurde eine Peptidlösung von 20 µg/mL in kapillarische

Mikroröhrchen eingeschlossen und mit 2% PFA fixiert (Hohenberg et al., 1994). In diesen konnte gezeigt werden, dass die Peptide bereits in Lösung Aggregate bilden (Abbildung 51).

Als nächstes wurde die Lokalisierung des Peptids auf TZM-bl Zellen untersucht. Hierfür wurde eine N-terminal Rhodamin-markierte Pep19-2.5 Variante verwendet, mit der ein korrelativer EM-Ansatz möglich war. Dazu wurden TZM-bl Zellen in Kulturschalen mit einem Rastergitter ausgesät, mit dem Peptid inkubiert und nach dieser Inkubation mehrfach gewaschen. Die Rhodamin-Markierung wurde nun genutzt, geeignet markierte Zellen fluoreszenzmikroskopisch aufzufinden und deren Orientierung im Rastergitter festzuhalten. So konnten Zielzellen vor der Anfertigung ultra-dünner Schnitte anhand des Rasters wiedergefunden werden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. In den Aufnahmen mit Peptid konnten wiederum Aggregate auf der Zelloberfläche ausgemacht werden, die denen der Aufnahmen des Peptids in Lösung ähnelten und die auf unbehandelten Zellen nicht zu finden waren (Abbildung 51).

In einem letzten Ansatz wurde die Rhodamin-Markierung des Peptids verwendet, um das eventuell an die Zellen gebundene Peptid mit einem Rhodamin-spezifischen Antikörper durch die Verwendung eines Kolloidgold-markierten Sekundärantikörper nachweisen zu können. Auch hier wurden die schon bei den vorigen Aufnahmen entdeckten Aggregate gefunden. Durch das Auffinden von Goldpartikeln innerhalb dieser Aggregate kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei tatsächlich um Pep19-2.5 handelt. Auf den Kontrollzellen konnte keine Goldpartikel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

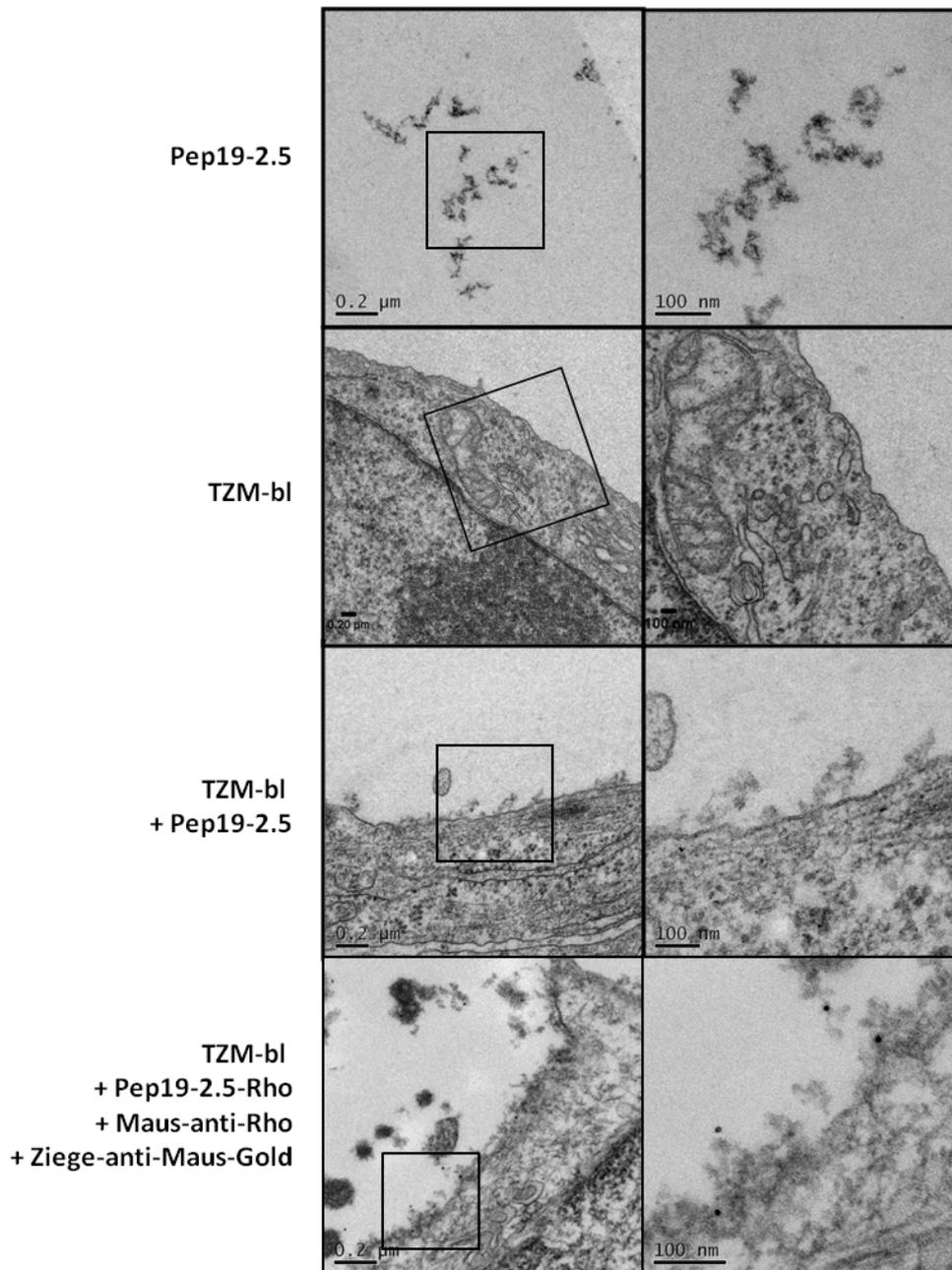


Abbildung 51: Elektronenmikroskopische Lokalisation von Pep19-2.5. Hierfür wurde eine 20 μg/mL konzentrierte Peptidlösung in kapillare Mikroröhrchen eingeschlossen und mit 2% PFA fixiert. Für die Darstellung einer N-terminal Rhodamin-markierten Variante von Pep19-2.5 auf Zellen wurde TzM-bl Zellen in IBIDI Schälchen mit optischem Boden und Rastergitter kultiviert und mit 20 μg/mL Pep19-2.5 behandelt oder als unbehandelte Kontrolle eingesetzt. Alternativ wurden TzM-bl Zellen mit Rho-Pep19-2.5 inkubiert und mit einem monoklonalen anti-Rhodamin Mausantikörper (Klon 11H10, 1:100, Antikörper-Online) gefärbt und schließlich mit einem Ziege anti-Maus Antikörper behandelt, der mit 10 nm kolloidalem Gold markiert war. Die fixierten Proben wurden in einem EPON Harz (Carl Roth) eingebettet und für ultra-dünne Schnitte prozessiert. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. EM Aufnahmen wurden an einem Philips CM 120 TEM bei 80 kV unter Verwendung einer Gatan Multiscan 794 Kamera durchgeführt.

6.2.3.3 Pep19-2.5 und Pep19-4 binden an Heparansulfat

Die mikroskopisch erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass Pep19-2.5 auf der Zelloberfläche lokalisiert bzw. im Komplex mit einem extrazellulären Bindungspartner vorliegt. SALP besitzen als besonderes Merkmal acht positiv geladenen Lysin- und Argininreste. Aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften stellt Heparansulfat (HS) einen potenziellen SALP-Bindungspartner dar. HS ist aus mehrfach sulfatisierten und carboxylierten Disaccharid-Bausteinen aufgebaut und ist damit ein Polyanion. HS ist ein lineares Polysaccharid aus der Gruppe der Glykosaminoglykane, die als Bestandteil der extrazellulären Matrix auf allen tierischen Zellen vorkommt. HS ist an Membranproteine gebunden, die unter dem Namen Heparansulfat Proteoglykane (HSPG) zusammengefasst werden (Iozzo, 1998.)

In Kooperation mit Prof. Klaus Brandenburg und Ina Kowalski vom Forschungszentrum Borstel wurde zur Messung einer möglichen Interaktion die äußerst sensitive Methode der Isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) eingesetzt. Neben ihrer Empfindlichkeit hat diese den Vorteil gegenüber anderen Methoden, wie z.B. der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie, dass die untersuchten Bindungspartner nicht immobilisiert werden müssen, sondern in gelöster Form vorliegen. Dabei wird ein Bindungspartner in zwei Messzellen vorgelegt, eine davon dient als Referenzzelle, in die andere wird der zu untersuchende Bindungspartner tropfenweise hinzu titriert. Erfolgt eine Bindung, wird bei jedem Tropfen Wärme frei (exotherme Bindung) oder der Umgebung Wärme entzogen (endotherme Bindung) bis keine weitere Bindung mehr stattfindet, also eine Sättigung eingetreten ist.

Tatsächlich konnte in der ITC-Messung eine Bindung zwischen Pep19-2.5 (Daten exemplarisch in Abbildung 52 gezeigt) und Pep19-4 an Heparansulfat gezeigt werden. Die Bindung ist exotherm und hat eine Bindungsenthalpie von $\Delta H = -40$ kJ/mol. Gleichzeitig kann an der Messkurve abgelesen werden, dass die Bindung bei einem Massenverhältnis von 1:1 gesättigt ist und danach kein weiteres Peptid mehr gebunden wird. Ähnlich verhält es sich bei Pep19-4, wobei die Bindungsenthalpie $\Delta H = -28$ kJ/mol etwas geringer erscheint, aber dennoch deutlich ausgeprägt ist. Ein weiterer potenzieller Bindungskandidat war die einfach negativ geladene N-Acetylneuraminsäure, die Bestandteil glykosylierter Membranproteine ist. Bei den ITC Messungen mit Pep19-2.5 und Pep19-4 wurden dabei deutlich schwächere Bindungen mit Bindungsenthalpien von $\Delta H = -1$ kJ/mol bzw. $-7,5$ kJ/mol ermittelt.

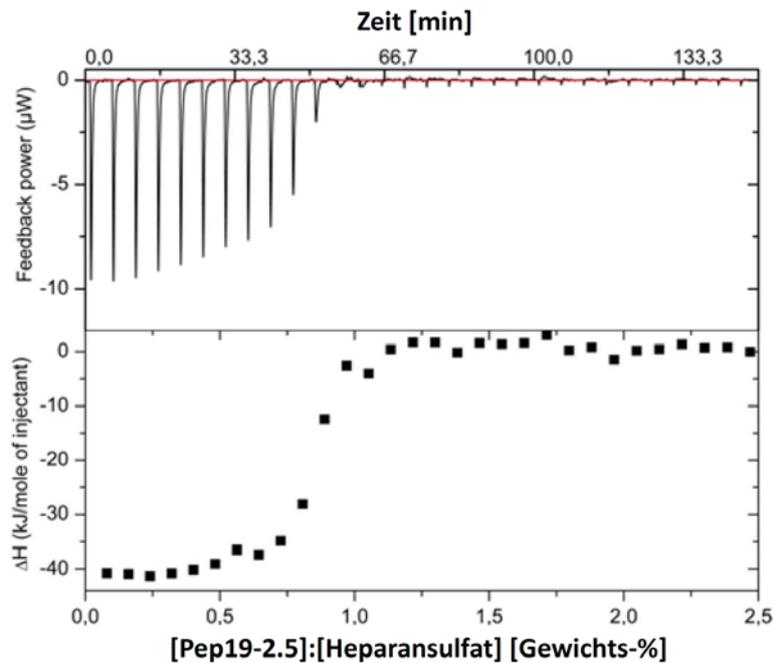


Abbildung 52: Pep19-2.5 bindet Heparansulfat in einer exothermen Reaktion. Um eine mögliche Bindung von Pep19-2.5 und Heparansulfat zu untersuchen, wurden diese beiden Komponenten in 20 mM HEPES (pH 7,0) gelöst und in einer Isothermalen Titrationskalorimetrie vermessen. Dafür wurde 200 µg/mL Heparansulfat in der mikrokalorimetrischen Zelle eines MSC ITC (Microcal INC.) vorgelegt. Nach Einstellung des Temperaturgleichgewichts bei 37°C wurden 2 mM Pep19-2.5 tropfenweise unter konstantem Mischen zugeführt und die bei der Interaktion gemessene Wärme nach jeder Injektion gegen die Zeit bzw. nach dem sich daraus ergebenden Gewichtsverhältnis der Komponenten aufgetragen.

6.2.4 Inhibition der HSV-1 und HSV-2-Infektion

Im Zuge der Charakterisierung der Wirkung von SALP bei der HIV-1 Infektion konnte Heparansulfat als SALP-Bindungspartner und potenzieller Bestandteil des Wirkmechanismus identifiziert werden. Heparansulfat Proteoglykane (HSPG) sind auch primäre Rezeptoren der Herpes Simplex Viren und für die initiale Interaktion der HSV-Partikel mit der Zielzelle verantwortlich (Herold et al., 1991; Shieh et al., 1992; Tal-Singer et al., 1995; Laquerre et al., 1998). Dabei binden die glykosylierten Hüllproteine gC und gB an HSPG, woraufhin weitere Wechselwirkungen anderer viraler Glykoproteine erfolgen, die zur Fusion von Virus- und Zellmembran führen. So kann das Glykoprotein gD drei unzusammenhängende Rezeptoren binden, einer davon 3-O-sulfatisiertes Heparansulfat (Shukla et al., 1999). Daher sollte im Folgenden überprüft werden, ob SALP neben HIV-1 auch mit HSV-Infektionen interferieren.

6.2.4.1 SALP-vermittelte Inhibition der Plaquebildung und viralen Genexpression in HSV infizierten Vero Zellen

In einem ersten Versuch wurden Vero Zellen mit 20 µg/mL SALP für 1 h bei 37°C vorinkubiert und anschließend bei 4°C für 2 h mit HSV-1 oder HSV-2 verschiedener Konzentrationen inkubiert. Für HSV-1 wurde eine MOI (*multiplicity of infection*) von 0,1 und für HSV-2 eine MOI von 1 gewählt. Danach wurden die Zellen gewaschen und für 18 h bei 37°C weiterkultiviert. Bereits unter dem

Lichtmikroskop konnte ein deutlicher Unterschied zwischen SALP-behandelten Zellen und Kontrollzellen festgestellt werden (Abbildung 53).

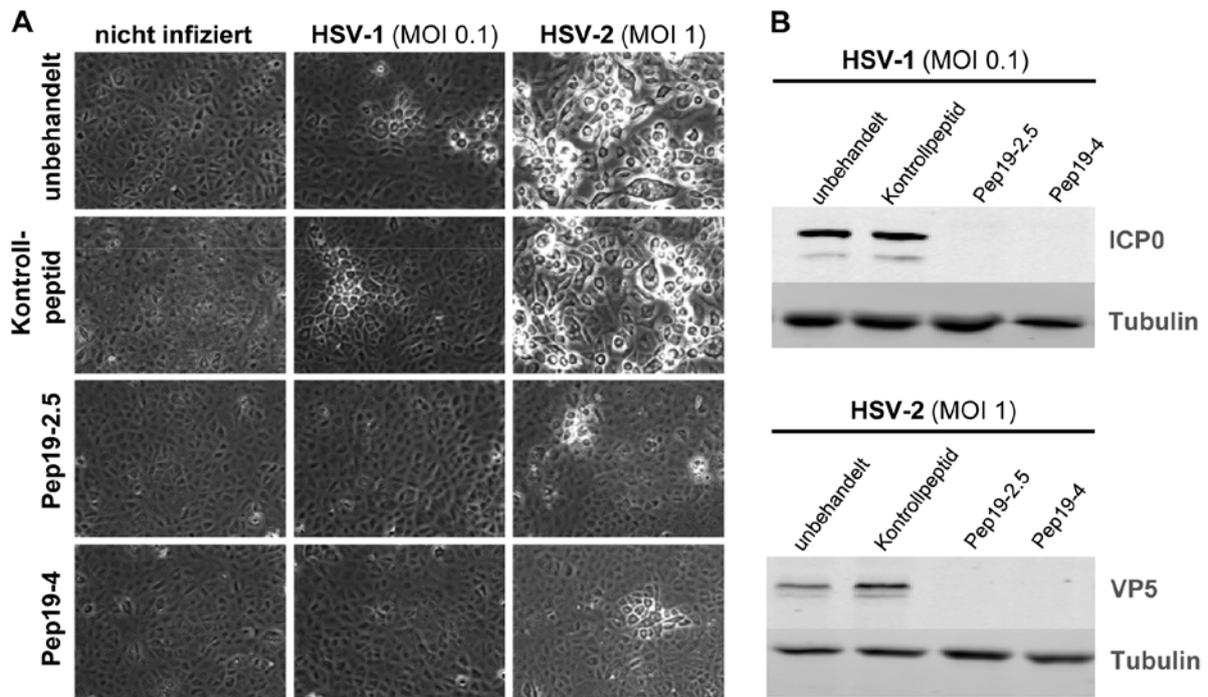


Abbildung 53: Verminderte Plaquebildung und Genexpression in SALP-behandelten Vero Zellen. Zur Untersuchung eines antiviralen Effektes in der HSV-1 und -2 Infektion wurden Verozellen für 1 h bei 37°C mit Medium oder 20 µg/mL Peptid inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt und für 2 h auf Eis mit angegebenen Virusmengen infiziert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen für weitere 18 h bei 37°C kultiviert und mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop aufgenommen (A). Daraufhin wurden die Zellen lysiert und die Gesamtproteinextrakte in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und in einem Western Blot analysiert (B). Bei den HSV-1 infizierten Zellen wurde das *immediate early* Protein ICP0 nachgewiesen, bei den HSV-2 infizierten Zellen das VP5-Protein, die Hauptkomponente des viralen Kapsids. Tubulin wurde als Ladekontrolle markiert.

Die HSV-Infektion zeigt sich zunächst durch eine Abrundung der normalerweise sehr flachen Vero Zelle. Durch die horizontale Infektion von Nachbarzellen kommt es nach einiger Zeit zur Plaquebildung. Dieser Mechanismus der Virusausbreitung und der damit verbundene zytopathische Effekt ist bei HSV-2 ausgeprägter. HSV-1 hingegen sezerniert neue Viruspartikel eher in das Medium, die dann auch entferntere Zellen infizieren können. Wurden die Zellen zuvor mit SALP behandelt, geht die Plaquebildung bei der HSV-2 Infektion stark zurück. Bei den HSV-1 infizierten Zellen konnten keine Plaques gefunden werden.

Um die virale Genexpression zu überprüfen, wurden diese Zellen lysiert, das Gesamtproteinextrakt auf SDS-PAGE Gelen aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Im Fall von HSV-1 wurde das erste gebildete virale Protein, das *immediate early* Protein, ICP0, und im Fall von HSV-2 das Protein VP5, der Hauptbestandteil des viralen Kapsids, detektiert. Als Ladekontrolle wurde Tubulin markiert. In den Lysaten der mit SALP behandelten Zellen war keine Expression der viralen Proteine nachweisbar (Abbildung 53B).

6.2.4.2 SALP hemmen den Eintritt und die Anheftung von HSV-1 Partikeln in Vero Zellen

Das Ausbleiben der Genexpression früher viraler Proteine wie ICPO lässt auf eine Inhibition eines frühen Schrittes in der Virusreplikation schließen. Eine mögliche Wirkung der SALP auf den Eintritt der Viruspartikel in die Zelle sollte durch einen entsprechenden Assay gezeigt werden. Hierfür wurden HSV-1 Partikel durch Zugabe von [³H]-Thymidin in das Kulturmedium bei der Produktion der Viren tritiiert. Mit diesen radioaktiv markierten HSV-Viren wurden wie zuvor beschrieben Peptid-behandelte Zellen bei 4°C infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C weiterkultiviert, um einen Eintritt der Virionen in die Zellen zu ermöglichen. Gebundene aber nicht eingedrungene Viren wurden mit Proteinase K abgebaut, die Zellen daraufhin geerntet und in einem Szintillationszähler (Beckman Coulter LS6500) auf ihre [³H]-Aktivität untersucht (Abbildung 54A). In den mit SALP behandelten Zellen war nur noch Hintergrundaktivität messbar, während die Tritiumsignale in den Proben der beiden Kontrollansätze vergleichbar hoch waren. Der Grund für das Fehlen der viralen Proteinexpression kann also damit erklärt werden, dass HSV-Partikel in SALP-behandelte Zellen nicht mehr eindringen können.

Da die Peptide Heparansulfat, einen für die Partikelanheftung verantwortlichen Rezeptor, binden können, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Anheftung von HSV-1 Partikeln durch SALP-Behandlung negativ beeinflusst ist. Dafür wurden SALP-behandelte und Kontrollzellen ebenfalls mit tritiierten Viren infiziert, aber nun direkt nach den 2 h bei 4° gründlich gewaschen und geerntet. Über die Messung der Radioaktivität der Proben sollte die relative Menge an gebundenen Viruspartikeln bestimmt werden. In Abbildung 54B sind die jeweiligen Eingangsaktivitäten der verwendeten Virusmenge aufgetragen und daneben die nach dem Waschen verbliebenen Aktivitäten. An unbehandelten und Kontrollpeptid-behandelten Zellen band ca. 30% der Eingangsmenge, was eine moderate Infektionseffizienz anzeigt. In den mit SALP behandelten Zellen waren die Aktivitäten auf 0,3% (Pep19-2.5) bzw. 0,2% (Pep19-4) wiederum in den Bereich der Hintergrundaktivität zurückgegangen, was darauf schließen lässt, dass tatsächlich die Anheftung der Virionen an die Zielzelle gehemmt wird.

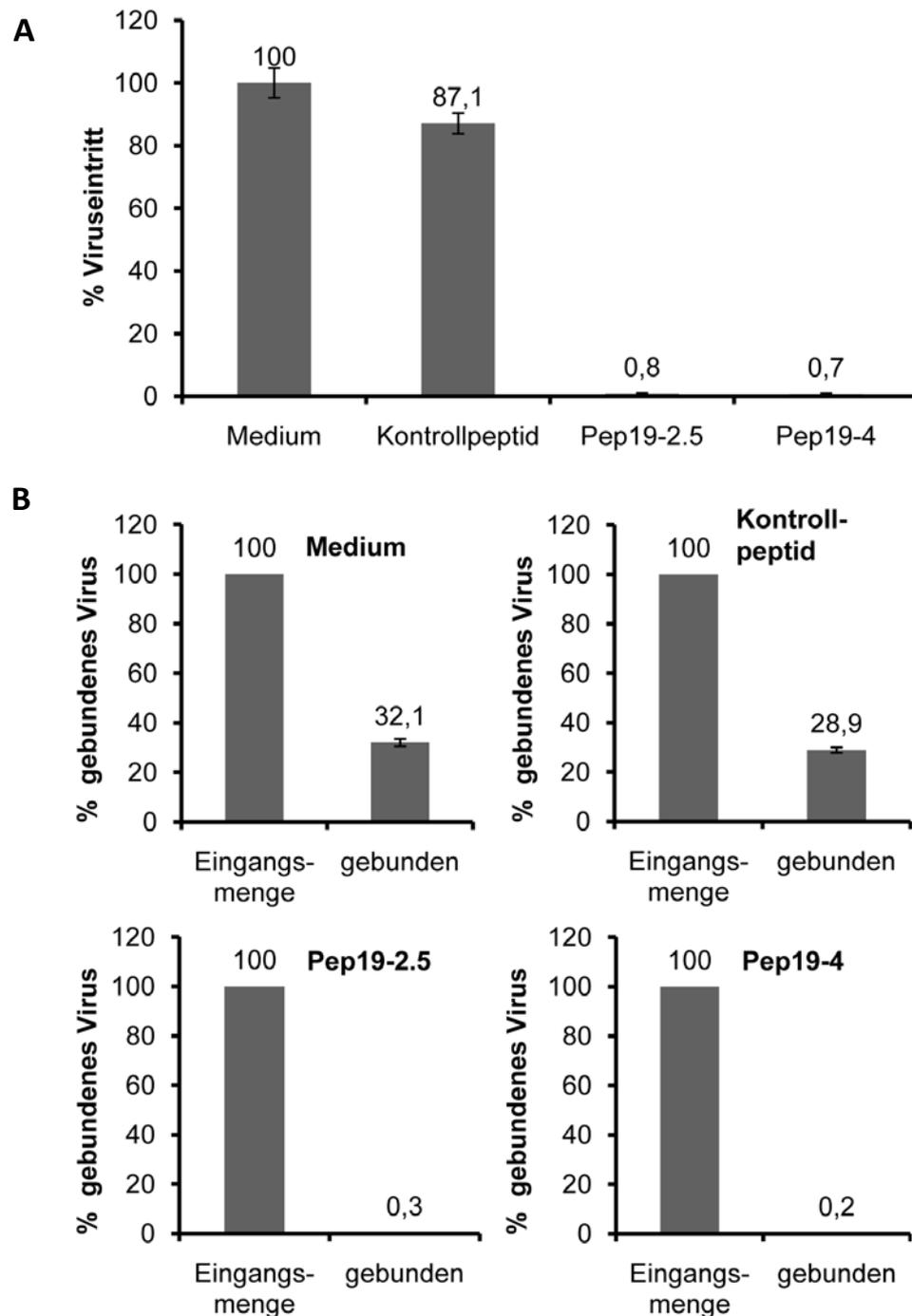


Abbildung 54: Eintritt und Anheftung von HSV-1 Partikeln werden durch SALP gehemmt. Zur Untersuchung des Eintritts und der Anheftung von HSV-1 Partikeln an Vero Zellen wurden durch Supplementierung des Kulturmediums der Produktionszellen mit Tritiumthymidin zunächst tritiierte Viruspartikel produziert. Damit wurden mit 20 µg/mL Peptid behandelte oder unbehandelte Vero Zellen wie zuvor beschrieben infiziert. (A) Für die Ermittlung der in die Zelle eingedrungenen Virusmenge wurden die Zellen nach dem Waschen für 1 h bei 37°C inkubiert, mit Protease behandelt, um gebundene aber nicht eingedrungene Virionen zu verdauen und anschließend geerntet. (B) Zur Bestimmung der Menge an gebundenen Virionen wurden die Zellen direkt nach der Inkubation mit Viruspartikeln gründlich gewaschen und geerntet. Die jeweiligen Zellen wurden nun in Szintillationsröhrchen überführt und mit 3 mL Szintillationslösung überschichtet. Die Messung des Tritiumsignals wurde mit einem Beckmann Coulter LS6500 Sinztillationszähler durchgeführt.

Abschließend wurde in einer Titration unter gleichen Versuchsbedingungen die Konzentrationsabhängigkeit der Bindungsinhibition ermittelt (Abbildung 55). Aus den erhaltenen Daten konnten die IC_{50} -Werte, also die Konzentrationen, bei denen 50% der Virusanheftung inhibiert wird, errechnet werden (Tabelle 4).

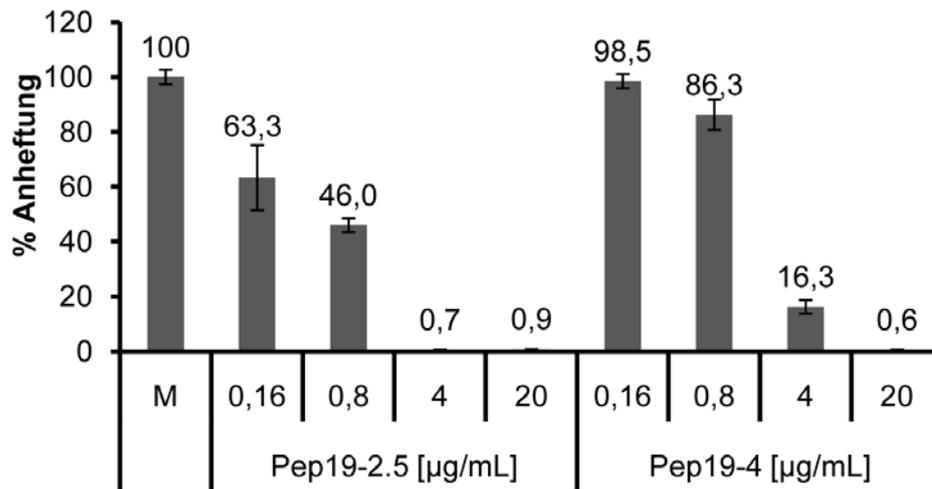


Abbildung 55: Titration der Dosis-abhängigen Inhibition der Anheftung von HSV-Partikeln an Vero Zellen. Wie in Abbildung 54B wurde hier die Bindung von tritierten HSV-1 Partikeln an Vero Zellen in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen SALP gemessen und im Verhältnis zu unbehandelten Zellen gesetzt.

Tabelle 4: IC_{50} Werte der SALP in der HSV Infektion.

Peptid	IC_{50} [µg/mL]	IC_{50} [nM]
Pep19-2.5	0,42	151
Pep19-4	1,8	664

Zusammenfassend zeigen die hier aufgeführten Daten eine starke antivirale Aktivität der SALP sowohl bei der HIV-1 als auch der HSV Infektion, die höchstwahrscheinlich auf einer kompetitiven Bindung der Peptide an zelluläres Heparansulfat beruht.

7 Diskussion

Die große Mehrheit der auf dem Markt befindlichen antiviralen Wirkstoffe ist gegen viruseigene Enzyme oder Strukturen gerichtet. Viren sind in der Lage, diesem Selektionsdruck bei unzureichender Adhärenz durch Einführung von Mutationen während ihrer Replikation zu entkommen. Die daraus resultierenden (multi-)resistenten Erreger stellen eine ernsthafte Gesundheitsbedrohung dar und machen die ständige kostenintensive Entwicklung neuer Inhibitoren, aber auch neuer Inhibitionsstrategien notwendig. Eine Hemmung zellulärer, für die Virusreplikation essenzieller Faktoren stellt einen vielversprechenden alternativen Ansatz dar, bei dem davon ausgegangen wird, dass die Ausbildung von Resistenzen seitens des Virus schwieriger ist und somit weniger schnell auftritt. Die evolutionäre Anpassung des Virus an die Inhibition zellulärer Zielstrukturen macht eine Umstellung ganzer Abschnitte des viralen Lebenszyklus an die neuen Bedingungen erforderlich. Demgegenüber sind Resistenzen durch einfache Mutationen, wie z. B. gegen den gängigen NRTI Lamivudin durch eine Punktmutation in der Reversen Transkriptase (Mutation: M184V; Miller et al., 2002), für das Virus schneller zu etablieren. Durch die Inhibition zellulärer Zielstrukturen ist es daher insbesondere möglich, multiresistente Virusvarianten in ihrer Vermehrung zu hemmen (Hauber et al., 2005; Schäfer et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkweise verschiedener Inhibitoren auf die zellulären Enzyme Deoxyhypusinhydroxylase (DOHH) und Deoxyhypusinsynthase (DHS) analysiert. Mittels RNA Interferenz wurde untersucht, ob die DOHH-Reaktion einen Einfluss auf die Rev-Funktion und damit die HIV-1 Replikation besitzt. Im zweiten Teil wurden antimikrobielle LPS-bindende Peptide (SALP) auf ihre antivirale Aktivität in der HIV-1 und HSV-1 und HSV-2 Infektion analysiert und deren Wirkmechanismus charakterisiert.

7.1 Inhibition der Hypusin-Modifikation von eIF-5A

Der eukaryotischen Initiationsfaktor 5A ist das einzige bekannte Protein, das die ungewöhnliche Aminosäure Hypusin enthält. Die Hypusinmodifikation erfolgt enzymatisch in zwei Schritten durch die Deoxyhypusinsynthase (DHS) und anschließend durch die Deoxyhypusinhydroxylase (DOHH, Abbildung 3). Hypusin ist essenziell für die Funktion von eIF-5A. Unter anderem dient das durch diese Modifikation aktivierte eIF-5A als wesentlicher Kofaktor für HIV-1 Rev, dem Regulator des nukleozytoplasmatischen Exports unvollständig gespleißter viraler mRNA. Wird die Aktivierung von eIF-5A unterbunden, führt dies zur effizienten Hemmung der HIV-1 Replikation, was in mehreren Studien auf drei unterschiedlichen Ebenen gezeigt werden konnte. So war es zum einen möglich, eines der für die Modifikation verantwortlichen Enzyme DHS oder DOHH direkt zu hemmen und damit die HIV-1 Replikation zu inhibieren (Andrus et al., 1998; Hauber et al., 2005; Hoque et al.,

2009). Es war zudem ausreichend, ein für die Biosynthese des DHS-Substrates Spermidin verantwortliches Enzym, die S-Adenosylmethionindecaboxylase (SAMDC), zu hemmen, um eine substanzielle Verringerung der HIV-1 Replikation zu erzielen (Schäfer et al., 2006). Darüber hinaus konnten Schäfer et al. zeigen, dass die Verhinderung der DHS-Reaktion tatsächlich einen Einfluss auf die Rev-Transaktivierung hat und die Ursache für die verminderte Replikation mit der Inhibition des Kernexportes Rev-abhängiger viraler mRNA Spezies erklärt werden kann (Schäfer et al., 2006). In den Studien zur Inhibition der DOHH Reaktion konnte hingegen kein Einfluss auf die Rev-Funktion gezeigt werden (Andrus et al., 1998; Hoque et al., 2009).

Einen deutlichen Unterschied wiesen die verwendeten Inhibitoren in ihrer zellulären Toxizität auf. Die in den Studien von Hauber et al. (2005) und Schäfer et al. (2006) eingesetzten Verbindungen befanden sich bereits in klinischen Studien Phase II für andere Indikationen und hatten damit Verträglichkeitsstudien erfolgreich absolviert. CNI-1493 ist ein Inhibitor der DHS-Reaktion, der in der klinischen Studie im Kontext mit Morbus Crohn untersucht wird, da er die TNF Produktion und damit die Aktivierung von Makrophagen unterdrückt (Cohen et al., 1996). Der SAMDC-Inhibitor SAM486A wurde als antiproliferativer Wirkstoff bei der Behandlung des B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms getestet (Pless et al., 2004), wobei hier sogar 250-fach höhere Konzentrationen verwendet wurden als in der antiviralen Studie von Schäfer et al. (2006). Im Gegensatz dazu wiesen die DHS-Inhibitoren GC-7 (Park et al., 1994; Lee et al., 2002) und Deoxyspergualin (Nishimura et al., 2002) einen deutlichen Einfluss auf die Zellproliferation auf. Auch für die bisher beschriebenen Inhibitoren der DOHH, die Eisenchelatoren L-Mimosin, Deferiprone und Ciclopirox (Hanuske-Abel et al., 1994; Andrus et al., 1998; Clement et al., 2002; Hoque et al., 2009), wurden zelltoxische Eigenschaften, wie die Beeinträchtigungen der Zellzyklusprogression und des Apoptoseverhaltens, nachgewiesen. Von Ciclopirox wird zudem neben der Hydroxylierung von Deoxyhypusin ebenfalls die Prolin-Hydroxylierung bei der Reifung von Kollagen inhibiert.

Zur Auswirkung dieser DOHH-Inhibition auf die HIV-1 Replikation gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Die Gruppe um Andrus begründete den Effekt von L-Mimosin und Deferiprone mit einer verminderten Polysomenbeladung der viralen ungespleißten mRNA im Gegensatz zu zellulärer mRNA. In der induzierbar HIV-1 exprimierenden T-Zelllinie ACH-2 führte die Behandlung mit den verwendeten Inhibitoren zur einer erheblichen Steigerung der Induktion von Apoptose. Deferiprone und Ciclopirox haben laut Hoque et al. (2009) einen anderen Effekt. Die Autoren beschreiben eine verminderte Bindung zwischen DOHH und eIF-5A, was schließlich zu einer Inhibition der HIV-1 Replikation aufgrund der Hemmung der Initiation der Transkription vom HIV-1 LTR Promotor führen soll. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die Inhibition der DOHH-Reaktion die HIV-1 Replikation negativ beeinflusst. Ob die Wirkung und auch die toxischen Nebenwirkungen auf einer

spezifischen Hemmung der DOHH oder möglicherweise auf der Interferenz mit anderen eisenhaltigen Enzymen wie Hydroxylasen und Monooxygenasen beruht, konnte nicht geklärt werden. Da beschrieben wurde, dass das Fehlen von DOHH für das Zellwachstum von *Saccharomyces cerevisiae* nicht essenziell ist (Park et al., 2006), bleibt die DOHH eine aussichtsreiche Zielstruktur für die Entwicklung spezifischer antiviraler Hemmstoffe.

7.1.1 Inhibition der humanen DOHH durch niedermolekulare Verbindungen

Als gemeinsames Charakteristikum haben alle beschriebenen DOHH-Inhibitoren einen einfach Stickstoff-substituierten nicht aromatischen Sechsring (siehe Abbildung 8). Von diesen Strukturen ausgehend wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Holzgrabe (Universität Würzburg) neue Moleküle synthetisiert, die auf einem ähnlichen Grundgerüst (Piperidin) basierten, jedoch variierende Substituenten aufwiesen (Goebel et al., 2008). Sieben solcher Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre antivirale Aktivität untersucht. Es konnte allerdings lediglich bei den drei Verbindungen JK8-2, EHW437 und TG118 ein Effekt auf die Replikation des R5-tropen HIV-1 Stamms BaL in PM1 Zellen gezeigt werden. EHW437 inhibierte die Virusreplikation um nur ca. 20% nach 10 Tagen Behandlung. TG118 zeigte einen noch geringeren antiviralen Effekt (Abbildung 11A). Eine deutliche Hemmung der HIV-1 Replikation von 65-80% war bei dem Wirkstoff JK8-2 zu beobachten. Die weiteren Untersuchungen zum Einfluss der Inhibitoren auf die Rev-Funktion wurden daher auf JK8-2 beschränkt. Keine der drei Verbindungen hatte einen Einfluss auf den Zellmetabolismus (Abbildung 11B). In zwei Ansätzen mit unterschiedlichen Rev-abhängigen Reporter-Konstrukten wurde gezeigt, dass die Behandlung von transient transfizierten Zellen mit JK8-2 die Rev-Transaktivierung nicht hemmte (Abbildungen 12 und 13). Eine mögliche Begründung für diese Beobachtung könnte in einer mangelnden Spezifität von JK8-2 für die DOHH liegen. Dies wurde im Anschluss in Kooperation mit Prof. Kaiser (FH Köln) in einem DOHH Spezifitätsassay *in vitro* untersucht. Hierfür wurden die Proteine eIF-5A, DHS und DOHH rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Nach der DHS-Reaktion wurde als Substrat für die anschließende Reaktion der DOHH das intermediäre Deoxyhypusin-modifizierte eIF-5A isoliert und in der DOHH-Reaktion eingesetzt. Als Kontrollen zu der Reaktion in Gegenwart von JK8-2 wurden Ansätze ohne DOHH (Positivkontrolle) und mit DOHH, aber ohne Inhibitor (Negativkontrolle) vorgenommen. Nach der Inkubationszeit wurde eIF-5A isoliert, vollständig hydrolysiert und die Aminosäuren in einer UPLC von der Firma Waters (Eschborn) analysiert. Das Endprodukt Hypusin (Hyp) lag nicht als gereinigte Aminosäure vor, so dass die Menge an Deoxyhypusin (Dhp) quantifiziert wurde, um eine Aussage über die DOHH-Aktivität treffen zu können. Es wurde dabei angenommen, dass eine hohe Dhp-Konzentration mit einer geringen Aktivität gleichzusetzen ist, während ein niedriger Wert für Dhp vermuten lässt, dass vorhandenes Dhp-eIF-5A durch die aktive DOHH vollständig zu Hyp-eIF-5A umgesetzt worden ist.

Tatsächlich lag die gemessene Dhp-Menge in der Reaktion mit JK8-2 um ca. 17% höher als ohne Wirkstoff. Allerdings wurde dieser vermeintliche Effekt durch das Ergebnis der Positivkontrolle relativiert. Ohne DOHH wurde unerwartet ein um 8% niedrigerer Wert gemessen als mit DOHH (Tabelle 1). Da diese Werte recht nah beieinander lagen und die Abschätzung der DOHH-Aktivität über die Menge an Dhp nur indirekt erfolgen kann, lässt dieses Ergebnis keine Aussage über die Spezifität von JK8-2 für die Inhibition von DOHH zu.

Hyp hat eine höhere Polarität als Dhp und sollte daher in der *reverse phase* Chromatographie bei einer niedrigeren Retentionszeit detektiert werden. Ein entsprechendes Signal, das keiner der verwendeten unmodifizierten natürlichen Aminosäuren entsprach, konnte in der Negativkontrolle und der Reaktion mit JK8-2, nicht aber in der Positivkontrolle ohne DOHH gefunden werden, was nahe legt, dass die eingesetzte rekombinante DOHH aktiv war.

Prof. Kaiser untersucht die Eignung der DOHH aus Plasmodien als eine mögliche Zielstruktur in der Therapie von Malaria (Kerscher et al., 2010). Sie konnte in einer GC/MS-basierten Variation dieses Assays zeigen, dass weder EHW437 noch JK8-2 einen Einfluss auf die DOHH-Aktivität besitzen (unveröffentlichte Daten). Dies ist besonders bemerkenswert, da die plasmodiale DOHH fünf und nicht vier HEAT-ähnliche Wiederholungen enthält, was in dem von Prof. Kaiser durchgeführten Assay zu einer Verdopplung der DOHH-Aktivität führt (Daten unveröffentlicht). Bei der GC/MS-Analyse des Aminosäurehydrolysats ist Hyp als Endprodukt detektierbar. Die Vorteile der UPLC-Analyse jedoch liegen neben des geringeren Aufwandes und der höheren Schnelligkeit der Messung, besonders in der Möglichkeit der Quantifizierbarkeit der erhaltenen Aminosäuremengen. Es bedarf jedoch einer weiteren Optimierung dieses Assays, idealerweise mit Hyp als Standard der UPLC-Messung, um den Einfluss möglicher Inhibitoren auf die DOHH direkt bestimmen zu können.

Obwohl die plasmodiale DOHH nur zu 27% identisch mit der humanen ist, lassen diese Ergebnisse im Kontext mit der Beobachtung, dass JK8-2 die Rev-Funktion nicht beeinträchtigte, die Schlussfolgerung zu, dass JK8-2 wahrscheinlich keine Spezifität für die humane DOHH besitzt. Da dennoch ein ausgeprägter antiviraler Effekt gemessen werden konnte, legt dies einen anderen Wirkmechanismus für JK8-2 nahe, der im Folgenden näher eingegrenzt werden sollte.

In einem Assay mit TZM-bl Reporterzellen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit JK8-2 die Expression von HIV-1 LTR-Promotor angetriebener Luciferase nach Infektion mit HIV-1 BaL zu über 50% inhibierte (Abbildung 17B). Dies impliziert eine Wirkung des Inhibitors auf frühe Schritte des HIV-1 Lebenszyklus noch vor der Transkriptionsaktivierung durch Tat. Durch die Analyse eines möglichen Einflusses auf die Integration mit einer semiquantitativen *nested*-PCR konnte gezeigt werden, dass JK8-2 schon die Integration proviraler DNA hemmt (Abbildung 18).

Die HIV-1 Integrase ist eine erfolgversprechende antivirale Zielstruktur, da in humanen Zellen ein homologes Enzym fehlt und sich Integraseinhibitoren wie Raltegravir durch eine gute Verträglichkeit auszeichnen. Vergleicht man die Struktur von JK8-2 mit bekannten Integrase-Inhibitoren, ist allerdings keine Ähnlichkeit festzustellen.

Abschließend konnte unter den sieben getesteten Verbindungen lediglich ein Inhibitor der HIV-1 Replikation gefunden werden. Dieser scheint aber nicht, wie zunächst vermutet, die DOHH-Reaktion und den nukleären Export viraler mRNA zu beeinflussen, sondern einen früheren Schritt im viralen Lebenszyklus vor oder während der Integration der proviralen DNA zu inhibieren.

Eine Entwicklung von DOHH-Inhibitoren bleibt damit weiterhin von Interesse. Die Abwesenheit von Kristallstrukturen der DOHH erschwert das rationale Design von potenten Inhibitoren. Bei der Bildung von Kristallen ist eine mobile Verbindung der zwei katalytischen Untereinheiten innerhalb der DOHH-Sequenz problematisch (Park et al., 2006), weshalb derzeit versucht wird, diese durch Deletion zu verkürzen (Klinke et al., unveröffentlichte Daten). Um die bisherige Strategie weiter zu verfolgen und Eisenchelatverbindungen als Inhibitoren einzusetzen, ist die genaue Kenntnis der Mikroumgebung der aktiven katalytischen Domäne für deren Inhibitorspezifität unerlässlich. Wie im Fall der verwendeten DHS-Inhibitoren könnten auch Analoga des Deoxyhypusins möglicherweise eine lohnenswerte Substanzklasse darstellen. Ferner könnten durch Protein-Protein-Interaktionsstudien von DOHH-Mutanten mit Dhp-eIF-5A die für die Bindung essenziellen Aminosäuren kartiert werden. Daraus folgend könnten dann spezifische Interaktionsinhibitoren entworfen werden.

7.1.2 Inhibition der humanen DOHH durch RNA Interferenz

Mangels eines spezifischen Inhibitors der DOHH konnte der Einfluss des Ausbleibens der Hydroxylierung von Dhp auf die Rev-Transaktivierung nicht weiter charakterisiert werden. In einem alternativen Ansatz wurde versucht, die DOHH mittels RNA Interferenz (RNAi) zu depletieren, was in der Literatur bisher noch nicht gezeigt werden konnte. Der Einsatz zahlreicher siRNA, shRNA, esiRNA und antisense RNA Sequenzen vermochte das DOHH-Expressionsniveau auf Proteinebene jedoch nicht zu vermindern. Letztendlich konnte sowohl eine Kombination aus zwei miRNA-Sequenzen, die gemeinsam von einem stabil integrierten lentiviralen Vektor exprimiert wurden, als auch eine einzige, ebenfalls durch lentivirale Transduktion stabil integrierte shRNA die DOHH-Expression um 70% vermindert (Abbildungen 24 und 25). In diesen *knockdown* Zellen wurden dann funktionelle Untersuchungen zur Rev-Transaktivierung und zum Einfluss von DOHH auf die Replikation von HIV-1 durchgeführt. Weder in den Transaktivierungsassays (Abbildungen 27 und 28) noch bei der HIV-1 Replikation konnten Unterschiede zwischen spezifischen und Kontroll-*knockdown*-Zellen festgestellt werden. Diese Beobachtungen lassen zwei Interpretationsmöglichkeiten zu. Entweder ist ein *knockdown* von 70% nicht ausreichend, um die Funktion von DOHH nachhaltig zu hemmen oder der

zweite Schritt der Hypusin-Modifikation ist nicht essenziell für die Rev-Funktion. Auch Kooperationspartner, die versuchten die murine DOHH zu depletieren, konnten keine höheren *knockdown* Effizienzen erzielen und stellten ebenfalls keine funktionellen Unterschiede fest (Balabanov und Sievert, unveröffentlichte Daten). Das *dohh*-Gen besitzt einen hohen GC-Anteil von über 70%, wobei die Nukleotide derart verteilt sind, dass anhand derzeitiger Algorithmen zur Findung potenziell RNAi-tauglicher Sequenzen nur wenige Bereiche für eine Interferenz identifiziert werden. Daher scheint die RNAi Technik nicht geeignet zu sein, um die DOHH vollständig herunter zu regulieren. Einen weiteren Ansatz, um den Einfluss auf die Rev-Funktion abschließend zu klären, bietet die Generierung humaner *knock-out*-Zellen, in denen das *dohh*-Gen komplett oder teilweise deletiert ist. In der Laborgruppe von Dr. Balabanov (UKE Hamburg) wird derzeit eine *dohh knock-out* Maus gezüchtet. Dabei hatte ein *knock-out* auf der Blastozystenebene und somit eine konstitutive Gendeletion, einen embryonal-letalen Phänotyp. Es wurde daher dazu übergangen, den *knock-out* gewebespezifisch in hämatopoetischen Zellen und konditional, also erst nach vollständiger Entwicklung der Maus, durch einen niedermolekularen Auslöser der Rekombination zu induzieren.

7.1.3 Inhibition der humanen DHS mit niedermolekularen Verbindungen

Neben Inhibitoren für die DOHH wurden im Rahmen dieser Arbeit neue potenzielle Inhibitoren der DHS und ihr Einfluss auf die HIV-1 Replikation von R5- und X4-tropen HIV-1 Stämmen analysiert. Dies geschah innerhalb des Konsortiums „Combating Drug Resistance“, das durch die BMBF Initiative „Innovative Therapieverfahren auf molekularer und zellulärer Basis“ gefördert wurde. Dieses Konsortium aus Strukturbiologen, Bioinformatikern, Chemikern, Klinikern und Virologen aus Hamburg und Lübeck hatte unter anderem, basierend auf vorhandenen Publikationen zur Inhibition der Replikation von multiresistenten HIV-1 Stämmen durch die Hemmung der Hypusinmodifikation von eIF-5A (Hauber et al., 2005; Schäfer et al., 2006), die präklinische Entwicklung neuer Inhibitoren der DHS und auch der DOHH zum Ziel. Durch die Kristallisation der beiden Enzyme, allein und zusammen mit vorhandenen Inhibitoren, sollte eine verbesserte *in silico* Berechnung der räumlichen und elektrostatischen Anforderungen der katalytischen Domänen zu neuen inhibitorischen Leitstrukturen führen, deren Wirksamkeit in Zellkultur überprüft werden sollte. Aus der Bibliothek an passenden Strukturen wurden zunächst sechs potenzielle DHS-Inhibitoren (DHSI) für die chemische Synthese ausgewählt (Abbildung 31). Bei diesen Inhibitoren stellen DHSI-06 und -07 GC-7 Analoga dar, während bei DHSI-01,-02 und -04 die Alkylkette zwischen den terminalen Aminofunktionen äquidistant durch teilweise aromatische Ringsysteme variiert wurde. An zentraler Position ist eine weitere Aminofunktion integriert, die auch in Spermidin zu finden ist (Abbildung 30). DHSI-08 ist eine der beiden Phenylhydrazoneneinheiten, die in CNI-1493 durch eine aliphatische Kohlenstoffkette miteinander verbunden werden.

Bei der Auswahl der präklinischen Experimente wurde ein Hauptaugenmerk auf die gute zelluläre Verträglichkeit der Verbindungen gelegt. Daher wurden zu Beginn der Einfluss der Verbindungen auf den Zellmetabolismus, die Zellzyklusprogression und die Induktion von Apoptose in einem vorher festgelegten Konzentrationsspielraum von 0,1 bis 8 μM über einen Zeitraum von 18 Tagen in der relevanten T-Zelllinie PM1 und in primären Zellen untersucht. Höhere Konzentrationen wurden in Hinblick auf angestrebte spätere klinische Studien als nicht sinnvoll erachtet. Alle Verbindungen zeigten keinerlei toxische Eigenschaften. Die einzige Ausnahme bildete DHSI-04, das bei einer Konzentration von 8 μM schon nach wenigen Tagen zum Absterben der Zellen führte (Abbildung 32 -34). Bei DHSI-04 handelt es sich um 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), das in der Fluoreszenzmikroskopie für die Anfärbung von Kernen verwendet wird. Es interkaliert dabei mit zellulären Nukleinsäuren im Kern, präferenziell mit doppelsträngiger DNA.

Anschließend wurde die antivirale Aktivität in PM1 Zellen, die mit dem R5-tropen HIV-1 Stamm BaL infiziert wurden, getestet. Die Aktivität gegen HIV-1 NL4-3, einem X4-tropen HIV-1 Stamm, wurde in CEM-SS Zellen untersucht. Aus der Arbeit von Hauber et al. (2005) ging hervor, dass der DHS-Inhibitor CNI-1493, aber auch die gegen *dhs* gerichtete siRNA erst nach sieben Tagen ihre volle Wirksamkeit entfalten. Dies liegt vermutlich in der hohen Halbwertszeit von Deoxyhypusin- bzw. weiter reagiertem Hypusin-modifizierten eIF-5A begründet. Daher wurden die infizierten Kulturen für 18 Tage mit den DHS Inhibitoren behandelt. Abgesehen von DHSI-04, der bei der maximalen nicht-toxischen Konzentration von 4 μM die Replikation von HIV-1 NL4-3 zu etwa 50% und die von HIV-1 BaL an den Tagen 9-18 nahezu komplett hemmen konnte (Abbildung 35), waren alle anderen Inhibitoren nicht wirksam. Bei der Analyse der DHSI-Spezifität für die DHS in einem *in vitro* Assay, bei der der Transfer eines radioaktiv markiertem Aminobutylrest von Spermidin auf eIF-5A gemessen wurde, zeigte keiner der getesteten DHSI eine vergleichbar hohe Inhibition wie die Positivkontrolle CNI-1493. Allein DHSI-04 offenbarte eine schwache Dosis-abhängige Verminderung der DHS-Aktivität; zum Vergleich: 80 μM DHSI-04 hemmten die DHS-Reaktion so wie 5 μM CNI-1493 (Abbildung 36).

Trotz dieser schwachen Hemmung *in vitro* wurde der Einfluss auf die Rev-Funktion, wie zuvor bei den DOHH Inhibitoren beschrieben, untersucht. Die hierfür verwendeten HeLa Zellen tolerierten eine maximale DHSI-04 Konzentration von 2 μM . Tatsächlich konnte eine Dosis-abhängige Reduktion der Partikelsekretion beobachtet werden, allerdings sowohl bei Rev-abhängigen als auch bei Rev-unabhängigen Reporterkonstrukten (Abbildung 37 C und D). Darüber hinaus wurde ebenso die Sekretion der als Transfektionskontrolle koexprimierten Sekretierten Alkalischen Phosphatase (SEAP) durch DHSI-04 gehemmt. Die Inhibition von HIV-1 durch DHSI-04 scheint also weder von Rev noch von der zu inhibierenden DHS-Aktivität abzuhängen, sondern einen anderen weitreichenden

Mechanismus als Ursache zu haben. Aufgrund der Eigenschaft von DHSI-04 in DNA und RNA zu interkalieren, wäre eine Wirkung auf Transkriptionsebene vorstellbar, die zwar ausreicht, die virale und Reporterexpression einzudämmen, jedoch über einen Zeitraum von 18 Tagen nicht die zelluläre Lebensfähigkeit beeinflusst.

Starre, planare Moleküle mit konjugierten π -Elektronensystemen, wie sie in DHSI-04 vorkommen, scheinen für den Entwurf von Inhibitoren aufgrund der möglichen Interkalation vor allem mit DNA problematisch zu sein. Dabei stand bei der Auswahl von DHSI-04 nicht die Planarität im Vordergrund, sondern vielmehr der Abstand der terminalen Amino- bzw. Diamidgruppen. Für weitere Inhibitoren sollte daher auf eine höhere Flexibilität der zentralen Molekülbausteine Wert gelegt werden. Momentan wird im Rahmen des Konsortiums am Entwurf neuer Inhibitoren unter Berücksichtigung der korrigierten Anforderungen gearbeitet. Während die hier untersuchte erste Gruppe von Inhibitoren im Vergleich zu GC-7 *in silico* eine niedrigere Affinität zur DHS aufwies, konnte bei der kommenden Generation eine durchweg höhere Affinität erreicht werden (Kolodzik, unveröffentlichte Daten).

Interessant bei diesen Ergebnissen ist ebenfalls das Ausbleiben einer inhibitorischen Funktion von DHSI-08, einem Fragment von CNI-1493. Aufgrund vorhandener DHS-Strukturdaten kann begründet angenommen werden, dass das CNI-1493 Molekül zu voluminös für den Spermidinbindungskanal innerhalb der DHS ist. Es ist unwahrscheinlich, dass DHSI-08 trotz seiner geringeren Größe in den schmalen, länglichen Tunnel passt. Kürzlich ist die Kristallisation von DHS zusammen mit CNI-1493 gelungen, bei der gezeigt werden konnte, dass beide Phenylringe des Inhibitors in einer gestaffelten Konformation vorliegen und die Alkylkette als eine Art Abstandshalter dazwischen fungiert und damit diese intramolekulare Wechselwirkung ermöglicht und stabilisiert. Weiterhin konnten die DHS-Aminosäuren für die CNI-1493 Bindung kartiert werden. DHS-Mutanten mit Aminosäureaustauschen an diesen Bindungsstellen wiesen in dem *in vitro* Aktivitätsassay eine verringerte Fähigkeit auf, eIF-5A zu modifizieren. Dieses Ergebnis wurde durch eine Interaktionsstudie unterstützt. Hier konnte nach Inkubation von DHS-Mutanten und eIF-5A im Gegensatz zur Interaktion der Wildtypproteine keine Verschiebung der Bande in einem nativen Acrylamidgel detektiert werden (Klinke, unveröffentlichte Daten). Damit haben die beiden bisher aktiven DHS-Inhibitoren eine unterschiedliche Wirkungsweise. Während GC-7 Spermidin kompetitiv hemmt, verhindert CNI-1493 die Interaktion von DHS und eIF-5A. Diese Erkenntnis erweitert die Möglichkeiten beim Entwurf zukünftiger DHS-Inhibitoren.

7.2 Synthetische antimikrobielle Peptide als Inhibitoren der Replikation von HIV und HSV

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Klasse antimikrobieller Peptide auf ihre Fähigkeit untersucht, die Replikation von HIV-1, HSV-1 und HSV-2 zu hemmen. Diese Peptide wurden ursprünglich für eine Bindung von bakteriellem Lipopolysaccharid und der damit verbundenen Verhinderung eines Endotoxin-vermittelten septischen Schocks optimiert (Gutsmann et al., 2010). Als besondere Charakteristika enthalten die als SALP (*synthetic anti-lipopolysaccharide peptides*) bezeichneten Peptide acht positiv geladene Aminosäuren (Arginin, R; Lysin, K) im Aminoterminal und einen hydrophoben Carboxyterminus (Phenylalanine, F; Tryptophan, W), wodurch die sie amphiphile Eigenschaften aufweisen (Tabelle 2).

Vor Beginn der antiviralen Studien konnte in verschiedenen relevanten Zelllinien gezeigt werden, dass SALP bis zu einer Konzentration von 20 µg/mL, was einer molaren Konzentration von 7 µM entspricht, weder den Zellmetabolismus, noch das Zellzyklusmuster oder das Apoptoseverhalten negativ beeinflussen (Abbildungen 39 und 40).

Die Messungen zur antiviralen Aktivität in PM1 Zellen, die mit HIV-1 BaL infiziert wurden, zeigten einen ausgeprägten inhibierenden Einfluss auf die HIV-1 Replikation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Für die beiden hauptsächlich untersuchten SALP, Pep19-2.5 und Pep19-4, konnte dieser Effekt auch Dosis-abhängig gezeigt werden (Abbildungen 41 und 42). Bei der höchsten verwendeten Konzentration von 20 µg/mL konnte Pep19-2.5 die Virusreplikation vollständig hemmen, Pep19-4 zu über 90%. Auffällig bei den an den Tagen 8, 10 und 12 entnommenen Proben ist eine gesteigerte Viruslast der Kulturen im Verlauf des Experiments bei mit niedrigeren Peptidkonzentrationen (10, 5 und 2,5 µg/mL) behandelten Zellen. Bei 20 µg/mL war die Inhibition über den gesamten Versuchsverlauf annähernd gleich hoch. Bei den gewählten milden Infektionsbedingungen wird zu Beginn nur ein verhältnismäßig kleiner Anteil der Zellen infiziert. Im Laufe des Experiments breitet sich die Infektion auf die restliche Kultur aus. Dadurch steigen die Virusmengen in den unbehandelten Kulturen nahezu exponentiell an. Bei anfänglich niedriger Viruslast sind geringere Konzentrationen der SALP lediglich in der Lage die Ausbreitung der Infektion zu verlangsamen. Sobald eine bestimmte Virusmenge im Kulturüberstand überschritten wird, kommt es nur noch zu einer suboptimalen Hemmung der Virusreplikation. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass die SALP-behandelten Zellen an Tag 12 durchweg eine apparent höhere Lebensfähigkeit aufwiesen als die unbehandelten Kulturen (Abbildung 43). Hier wird der zytopathische Effekt einer HIV-1 Infektion auf unbehandelte Zellen deutlich.

Nach der Feststellung einer Inhibition der HIV-1 Replikation wurde im Folgenden der zugrunde liegende Mechanismus näher charakterisiert. Dabei konnte eine Wirkung auf spätere Vorgänge im

HIV-1 Lebenszyklus ausgeschlossen werden. In Reporterassays wurde gezeigt, dass weder die Tat- noch die Rev-Transaktivierung durch Behandlung der Zellen mit SALP beeinflusst wird (Abbildung 45). Daher wurde im Anschluss ein Effekt auf frühe Schritte der HIV Replikation untersucht. Tatsächlich inhibieren SALP die infektionsabhängige Luciferase-Expression in TZM-bl Reporterzellen potent im Vergleich zu Zellen, die mit einem Kontrollpeptid behandelt wurden (Abbildung 46). In diesen Versuchen konnte Pep19-2.5 die Infektion von R5-tropem HIV-1 BaL bei einer Konzentration von 10 µg/mL zu 75% und bei höheren getesteten Konzentrationen zu über 90% inhibieren. Die Inhibition von X4-tropem NL4-3 Virus war mit einer Inhibition von 75% bei einer Konzentration von 20 µg/mL etwas weniger effektiv. Bei höheren Konzentrationen konnten allerdings auch hier eine Inhibition von 90% erreicht werden. Interessanterweise wies Pep19-4 eine umgekehrte Spezifität auf. BaL wurde mit 20 µg/mL zu 40% gehemmt, mit 30 µg/mL zu 80%. Währenddessen war die Wirkung auf die NL4-3 Infektion mit 40% Inhibition bei 10 µg/mL und zu über 90% ab 20 µg/mL stärker ausgeprägt. Mit Hilfe dieses Experiments ließen sich die IC₅₀-Werte der Peptide bestimmen. Sie liegen für die Inhibition von einer Infektion mit BaL bei 8 µg/mL im Fall von Pep19-2.5 und bei 22 µg/mL für Pep19-4. Für die 50% Inhibition einer NL4-3 Infektion sind rechnerisch 16 µg/mL Pep19-2.5 und 10 µg/mL Pep19-4 nötig.

Ein Vergleich der Sequenzen beider Peptide zeigte, dass der einzige deutliche Unterschied in einem zusätzlichen Cysteinrest am Aminoterminus von Pep19-2.5 liegt. Die positiven Ladungen stammen von den gleichen Aminosäuren und sind in gleicher Weise verteilt. Lediglich am C-Terminus ist die Reihenfolge der W- und F-Reste vertauscht. Möglicherweise hat der zusätzliche Cysteinrest mit der voluminösen Thiolgruppe eine sterische Bedeutung in der Inhibition oder er bildet mit dem Cystein eines anderen Pep19-2.5 bzw. mit viralen oder zellulären Cysteinen Disulfidbindungen aus, die für den inhibitorischen Effekt bedeutsam sind.

Da gezeigt werden konnte, dass die SALP-Wirkung frühe Ereignisse der HIV-1 Replikation betrifft, wurde nun der Einfluss auf die Zell-Zell-Fusion (d.h. Membranfusion), einem wichtigen Mechanismus bei der HIV-1 Infektion, untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass vor allem Pep19-2.5 die Fusion zu 70% hemmen kann, während das Kontrollpeptid keinen Effekt vermittelte. Dies ist besonders eindrucksvoll, da bei der Zell-Zell-Fusion eine Assemblierung von Gag und Env Molekülen an der Plasmamembran an sogenannten Cholesterin-reichen *lipid rafts* stattfindet (Bhattacharya et al., 2006). Das sind Mikrodomänen, an denen Env in hohen Konzentrationen vorliegt. Dies führt unter anderem dazu, dass die Zell-Zell-Fusion gegenüber der zellfreien Infektion kinetisch 2-3 Größenordnungen schneller abläuft (Dimitrov et al., 1993). Es bilden sich dabei virologische Synapsen, deren Bildung kürzlich in Lebend-Zell-Aufnahmen gezeigt werden konnten (Hübner et al., 2009). Die

Inhibition der Zell-Zell-Fusion ist wegen der höheren Env-Konzentration daher anspruchsvoller als die Inhibition der Fusion von Virionmembran und Zellmembran.

Der erste Schritt bei der Virus-Zell-Interaktion ist die Anheftung des Viruspartikels an die Zelloberfläche. Zur Überprüfung des Einflusses der SALP auf diesen Schritt wurden TZM-bl Zellen bei 4°C mit hohen Mengen an Virus inkubiert und die nicht bindenden Partikel durch stringentes Waschen entfernt und der Kapsidgehalt der gebundenen Viruspartikel gemessen. Dabei wurde gezeigt, dass Pep19-4 die Anheftung von HIV-1 Partikeln zu 80% und Pep19-2.5 die Virusanheftung zu 90% verhindern kann (Abbildung 49).

Zusammenfassend konnte der antivirale Effekt in der HIV-1 Infektion durch SALP auf der Ebene der Viruspartikel-Anheftung nachgewiesen werden. Dies ließ darauf schließen, dass die Peptide eine initiale Wechselwirkung zwischen viralen und zellulären Komponenten blockieren. Um mehr über die Lokalisation der SALP zu erfahren, wurden daher mikroskopische Untersuchungen mit Fluoreszenzmarkiertem Pep19-2.5 durchgeführt. Konfokale Mikroskopie erbrachte erste Hinweise, dass das Peptid auf der Oberfläche der Zelle lokalisiert (Abbildung 50). Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten eine Aggregation an der Zelloberfläche, die durch Immunogoldbehandlung eindeutig markiert werden konnte (Abbildung 51).

Aufgrund der hohen positiven Ladung der Peptide war eine Interaktion mit negativ geladenen Strukturen auf der Zelloberfläche wahrscheinlich. Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass vor der hochspezifischen Interaktion des HI-Virions mit seinem Primärrezeptor CD4 Interaktionen mit zellulärem, negativ geladenen Heparansulfat (HS) stattfinden (Callahan et al., 1991; Mbemba et al., 1992; Harrop et al., 1994; Roderiquez et al., 1995; Demaria und Bushkin, 1996; Ugolini et al., 1999; Moulard et al., 2000; Cladera et al., 2001). Desweiteren wurde beschrieben, dass lösliches HS und andere sulfatisierte Polysaccharide die HIV-1 Infektion wirksam hemmen können (Ueno und Kuno, 1987; Ito et al., 1987; McClure et al., 1992; Herold et al., 1997). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Entfernung von HS von der Zelloberfläche die HIV-1 Anheftung und Replikation attenuiert (Patel et al., 1993; Ohshiro et al., 1996; Mondor et al., 1998; Ibrahim et al., 1999).

Eine mögliche Interaktion der SALP mit Heparansulfat wurde mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht. Hierbei konnte eine starke exotherme Bindung mit einer Bindungsenthalpie von $\Delta H = -40$ kJ/mol für Pep-19-2.5 bestimmt werden, wobei die Bindung bei einem Massenverhältnis von 1:1 eine Sättigung erreichte (Abbildung 52). Pep19-4 zeigte ebenfalls eine starke Bindungsenthalpie von $\Delta H = -28$ kJ/mol. Hieraus lässt sich ableiten, dass SALP an zelluläres HS bindet und damit die infektiösfördernde Interaktion von HIV-Partikel und Zelle blockiert.

Heparansulfat gehört zur Familie der Glykosaminoglykane (GAG). Dies sind lineare saure Polysaccharide, die aus mehrfach sulfatisierten sowie acetylierten Disaccharidbausteinen aufgebaut sind (Volpi, 2006) und in den meisten Geweben vorkommen (Casu et al., 2002). Mit Ausnahme von Hyaluronsäure sind GAG kovalent an Proteine gebunden. Die sogenannten Proteoglykane sind neben Kollagenen der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und tragen eine oder mehrere an Serinreste gekoppelte GAG-Ketten, die entweder von unterschiedlichen GAG-Typen stammen oder auch nur von einem, wie es bei Heparansulfat Proteoglykanen (HSPG) der Fall ist. Hier unterscheidet man zwischen den mehrheitlich vorkommenden transmembranen Syndecanen und den Glypicanen, die über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Plasmamembran gebunden sind (Iozzo, 1998). HSPG stellen Rezeptoren für verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren dar, werden aber auch von vielen Pathogenen zur infektionseinleitenden Wechselwirkung verwendet (Wadstrom und Ljungh, 1999; Spillmann, 2001). Zu diesen Pathogenen gehören die Alphaherpesviren HSV-1 und HSV-2, die HSPG als primären Rezeptor für den Eintritt in die Wirtszelle nutzen (Shieh et al., 1992). Aus diesen Fakten ergab sich die Frage, ob die untersuchten SALP auch einen inhibierenden Einfluss auf die HSV-Infektion besitzen.

Zunächst wurde daher die Wirkung von SALP auf die Infektion von Vero Zellen mit HSV-1 und HSV-2 analysiert. Es konnte eine deutliche Reduktion der Plaquebildung bei Zellen, die mit HSV-2 infiziert wurden, festgestellt werden (Abbildung 53 A). Dies weist nicht nur auf eine Inhibition der Infektion hin, sondern impliziert zudem eine Verhinderung der horizontalen Übertragung der Infektion auf Nachbarzellen. Bei der HSV-1 Inhibition wurde die Plaquebildung durch eine SALP-Behandlung vollständig verhindert. Dieser Befund wurde weiterhin durch die Überprüfung der viralen Genexpression des unmittelbar frühen Proteins ICPO (HSV-1) bzw. des späten Proteins VP5, einem Hauptbestandteil des viralen Kapsids (HSV-2), in diesen Zellen bestätigt. Hier konnten bei beiden Infektionen nach SALP-Behandlung keine viralen Genprodukte detektiert werden (Abbildung 53 B).

Um die Vermutung einer Wirkung der SALP auf den Eintritt bzw. die Anheftung von HSV-Partikeln zu bestätigen, wurden HSV-1 Partikel radioaktiv markiert und mit Zellen inkubiert, die zuvor mit SALP, Kontrollpeptid oder nicht behandelt wurden. Zur Überprüfung der Eintrittseffizienz wurde die in die Zelle gelangte Radioaktivität gemessen, nachdem außerhalb der Zelle bindende, aber nicht internalisierte Viruspartikel proteolytisch verdaut wurden. Hierbei war bei den SALP-behandelten Zellen lediglich Hintergrundaktivität messbar (Abbildung 54 A). Zur Bestimmung des Einflusses auf die Anheftung wurden die Zellen direkt nach der Inkubation mit Virus mehrfach gewaschen und die an den Zellen verbliebene Radioaktivität gemessen. Auch hier war nach SALP-Behandlung nur noch Hintergrundaktivität nachweisbar (Abbildung 54 B). In einer Titration unterschiedlicher SALP-Mengen wurde der IC_{50} Wert der Peptide für diese Inhibition bestimmt. Danach hemmen bereits 1,8 $\mu\text{g/mL}$

Pep19-4 und 0,4 µg/mL Pep19-2.5 die Anheftung von HSV-1 Partikeln zu 50%, dies entspricht einer Inhibition im nanomolaren Bereich (Tabelle 4). Somit inhibieren SALP wie vermutet sehr effizient auch die Bindung von HSV-Partikeln an ihre Zielzellen.

In einer Studie zur Auffindung inhibitorischer Peptide für die HSV-Infektion wurde kürzlich eine Reihe von überlappenden 15-mer Peptiden der Ektodomäne des HSV Hüllproteins gB erstellt und ihre Wirkung charakterisiert (Akkarawongsa et al., 2009). Die auf diese Weise erreichten mittleren inhibitorischen Konzentrationen lagen jedoch im zwei- bis dreistelligen mikromolaren Bereich. Interessant ist die hohe Ähnlichkeit der SALP mit der HS Bindungsdomäne des HSV Hüllproteins gC, die ebenfalls sowohl amphiphile Eigenschaften aufweist und als auch acht positiv geladene Aminosäuren enthält (Mardberg et al., 2001). Dieses Glykoprotein ist zwar für die HSV Infektion nicht essenziell, Deletionsmutanten weisen dennoch eine stark attenuierte Infektiosität auf (Herold et al., 1994). In einer weiteren Studie wurde versucht, den HSV-1 Eintritt durch die Verwendung von bovinem Lactoferrin zu inhibieren (Ammendolia et al., 2007), das an HSPG bindet. Hier werden für eine 50% Inhibition 150 µg/mL des Inhibitors benötigt, ein Vielfaches der in dieser Arbeit verwendeten SALP-Menge. Bei der Testung von bovinem Lactoferrin in der HSV-2 Infektion wurden sogar 400 µg/mL für einen antiviralen Effekt benötigt (Marchetti et al., 2009).

Neben der bereits erwähnten infektionsfördernden Interaktion von HIV-1 mit HS gibt es neuere Erkenntnisse zur Beteiligung von HS an der Übertragung von HIV-1 und darauf aufbauend Studien, die HS als antivirale Zielstruktur nutzen. So konnte die Heparansulfat Bindungsstelle im variablen V3-*loop* von gp120 im Bereich der Korezeptorbindungsstelle gefunden werden (Jagodzinski und Trzeciak, 1998; Bobardt et al., 2004; de Parseval et al., 2005; Crublet et al., 2008). Die Gruppe um Gallay macht dafür ein konserviertes Arginin (R298) verantwortlich, das Syndecane, HS-präsentierende Proteoglykane, an 6-O-sulfatisierten HS-Ketten bindet. Diese Aminosäure wurde auch schon für die Bindung von gp120 an CCR5 beschrieben (Wang et al., 1998). Es wird vermutet, dass HIV-1 ähnliche Motive auf Syndecanen und CCR5 erkennt, wobei die 6-O-Sulfate auf Syndecanen die sulfatisierten Tyrosine am N-Terminus von CCR5 nachahmen (de Parseval et al., 2005). So sind anscheinend Syndecane auf mikrovaskulären Endothelzellen an der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch HIV-1 beteiligt (Bobardt et al., 2004).

Es wurde bereits früher beschrieben, dass genitale Epithelzellen HIV-Partikel über Heparansulfat binden (Wu et al., 2003; Bobardt et al., 2003). Sie werden dabei zwar nicht selbst infiziert, können aber kokultivierte CD4-positive T-Lymphozyten in *trans* infizieren. Bezeichnend ist dabei, dass an Syndecan gebundene HI-Viren für eine Woche ihre Infektiosität behalten, während zellfreies Virus diese schon nach weniger als einem Tag verliert. In diesem Kontext konnte nachgewiesen werden, dass HIV-1 bei der Transmigration durch genitale Epithelzellen, die *in vivo* am Gebärmutterhals und

in der vaginalen Mukosa eine hohe Syndecanexpression aufweisen, auf eine Bindung an Syndecane und Chemokinrezeptoren angewiesen ist (Bobardt et al., 2007). Nach Überwindung des Epithels werden die Viruspartikel von dendritischen Zellen (DC) über das Lectin DC-SIGN auf T-Zellen übertragen (Pope und Haase, 2003). Neben DC-SIGN ist daran auch das Syndecan-3 auf der DC-Oberfläche beteiligt, indem es die gebundenen Viruspartikel stabilisiert, die DC-Infektion in *cis* verstärkt und ebenso die Virusübertragung auf T-Zellen vermittelt (de Witte et al., 2007). Heparansulfat ist zudem an der Übertragung von HIV-1 durch Spermatozoen auf DC beteiligt. Neben zellfreien Viruspartikeln und infizierten Leukozyten ist HIV-1 in der Samenflüssigkeit auch an Spermien gebunden, die Heparansulfat auf ihrer Oberfläche exprimieren, und kann so auf DC übertragen werden. Bei einem pH-Wert von 6.5, wie er in der vaginalen Mukosa nach dem Geschlechtsverkehr gemessen werden kann, ist dieser Effekt noch verstärkt (Ceballos et al., 2009). Die Bindung von Fluoreszenz-markierten virusähnlichen Partikeln (VLP) an die Zelloberfläche konnte mittels *single virus tracing* (SVT) bereits optisch verfolgt werden (Endress et al., 2008). Es wurde festgestellt, dass Virionen entweder an Zellen immobilisiert bleiben oder schnell wieder abdissoziieren. Hierbei konnte beobachtet werden, dass VLPs stärker an Zellen mit einer hohen HSPG Konzentration binden (Endress et al., 2008).

Zusammengefasst ist Heparansulfat und HS-präsentierendes Syndecan an der initialen Bindung von HIV-1 an verschiedene Zelltypen beteiligt, unabhängig von der Anwesenheit von CD4 Rezeptoren. Zudem spielt es eine Rolle bei der transepithelialen Migration und bei der Übertragung von Viruspartikeln auf DC und CD4-positive T-Zellen. Damit stellt es ein lohnendes Ziel für die antivirale Therapie dar, vor allem im Rahmen der Entwicklung topisch applizierter Mikrobizide.

Ein Vorteil bei der Adressierung der Heparansulfat-gp120 Interaktion ist eine Wirkung sowohl gegenüber R5-, X4-, R5X4-tropem HIV-1 und HIV-2, so dass von einer breiteren Wirkung als bei den momentan in Mikrobiziden verwendeten CCR5-Antagonisten (Lederman et al., 2004) ausgegangen werden kann. Da Heparansulfat und CCR5 von der gleichen Aminosäure in gp120 gebunden werden, inhibiert ein Wirkstoff gegen die gp120-HS Interaktion wahrscheinlich auch die gp120-CCR5 Wechselwirkung (de Parseval et al., 2005), wodurch ein synergistischer Effekt zu erwarten ist. Kürzlich wurde in einer Studie lösliches an den IgG-Fc-Teil fusioniertes Syndecan als neues mögliches Mikrobizid vorgestellt (Bobardt et al., 2010). Trotz vielversprechender antiviraler Eigenschaften *in vitro*, verliert dieser Wirkstoff aber seine antivirale Wirkung nach einer Stunde der Virusexposition.

Bisher wurden in Mikrobiziden neben Detergenzien, HAART-Medikamenten und gepufferten Gelen hauptsächlich anionische Polymere eingesetzt, die den Viruseintritt verhindern sollen. PRO2000, Cellulosesulfat und Carraguard sind sulfatisierte oder sulfonierte Polymere, die den Heparansulfatrezeptor nachahmen und damit kompetitiv den Viruseintritt durch Bindung an virale Hüllproteine

verhindern sollen (Cheshenko et al., 2004). Carraguard hat sich dabei als unwirksam gegen HIV herausgestellt (Skoler-Karpoff et al., 2008). Die Cellulosesulfat Studie wurde abgebrochen, nachdem die Anzahl der HIV-Infektionen im Vergleich zur Kontrollgruppe anstieg (Van Damme et al., 2008).

Zudem setzen Bestandteile der Samenflüssigkeit und des Vaginalsekrets die Wirksamkeit von topischen polyanionischen Mikrobiziden herab (Patel et al., 2007; Herold et al., 2010). Vaginalsekret besitzt eine anti-HIV-1 Aktivität, hemmt die Infektion mit HSV *in vitro* und schützt Mäuse vor Genitalherpesinfektion (John et al., 2005; Cole und Cole, 2008). Diese antivirale Aktivität wird teilweise durch natürliche antimikrobielle Peptide, sogenannte Defensine, vermittelt (Venkataraman et al., 2005). Defensine sind körpereigene, cysteinreiche, positiv-geladene Peptide, die aufgrund vieler hydrophober Aminosäuren mit Membranen interagieren können. Sie stellen damit einen Teil der angeborenen Immunität dar. Einen Überblick über die antivirale Wirkweise natürlicher Defensine geben Ding et al., (2009). Präferenziell werden frühe Schritte des Lebenszyklus umhüllter, aber auch unbehüllter Viren gehemmt, wie Eintritt, Fusion oder Anheftung. Einige inaktivieren die Virionen direkt oder haben einen Einfluss auf Replikationsschritte nach dem Eintritt, wie Transkription oder Reverse Transkription. Natürliche theta-Defensine aus Rhesusmakaken schützen Zellen vor Infektionen mit HIV und HSV durch die Inhibition der Bindung und somit des Eintritts von Viruspartikeln (Münk et al., 2003; Yasin et al., 2004). Solche Defensine werden von Menschen nicht gebildet, da das entsprechende Gen im Menschen ein vorzeitiges Stoppcodon enthält (Lehrer, 2004). Es wurden daher synthetische theta-Defensine entwickelt, die sogenannten Retrocykline, die verbesserte Eigenschaften gegenüber den natürlichen theta-Defensinen besitzen. Kürzlich wurde die Interaktion humaner natürlich exprimierter Defensine mit Heparansulfat beschrieben (Seo et al., 2010). Dies könnte eine Erklärung für die antivirale Wirkweise der Defensine liefern und stellt eine interessante Parallele zur Wirkung der hier untersuchten SALP dar. Bei der Verwendung anionischer, Heparansulfat-nachahmender Mikrobizide werden damit auch Defensine gebunden und damit teilweise inaktiviert. Umgekehrt könnte diese Interaktion mit den in der Vaginalmukosa stark vertretenen Defensinen mit der Wirkungslosigkeit der oben erwähnten Mikrobizide in Verbindung gebracht werden (Ding et al., 2010).

Unter den Mikrobiziden, welche die gp120-HS Interaktion hemmen, befinden sich ausschließlich anionische Polymere, die sich als HS-Antagonisten gegen virale Strukturen richten. Die Ergebnisse aus den im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Studien eröffnen eine vielversprechende Alternative dazu. Wie gezeigt wurde, inhibieren SALP effizient die Bindung von HIV-1, HSV-1 und HSV-2 Partikeln an ihre Zielzellen, höchstwahrscheinlich indem sie an zelluläres Heparansulfat binden. Als Komponente eines topischen, mukosalen Mikrobizids könnten SALP die sexuelle oder perinatale Übertragung von HIV und HSV hemmen. Die kationischen SALP könnten im Gegensatz zu anionischen

Verbindungen zusätzlich die Wirkung natürlicher antimikrobieller Peptide ergänzen. Heparansulfat als Bestandteil der extrazellulären Matrix der meisten Zellen ist zudem ein universeller Rezeptor für verschiedenste Pathogene (Viren, Bakterien, Fungi) und damit auch eine interessante Zielstruktur für antimikrobielle Breitband-Inhibitoren, wie den SALP.

In Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern konnten wir neben der inhibitorischen Wirkung der untersuchten Peptide hinsichtlich der HIV-1 und HSV Infektion ebenso eine Hemmung der Infektion von Hepatitis B und C auf der Ebene des Viruseintritts zeigen (Krepstakies et al., Manuskript eingereicht). Darüber hinaus konnte in weiteren Kooperationen ein ausgeprägter antiviraler Effekt auf die Infektion mit klassischen Schweinepestviren (KSPV), Coxsackieviren, und Influenza A festgestellt werden (unveröffentlichte Daten). Zudem existieren zahlreiche Veröffentlichungen, die eine initiale und essenzielle Interaktion weiterer sexuell übertragbarer Humanpathogene mit Heparansulfat beschreiben, zu denen auch die humanen Papillomaviren (HPV, Giroglou et al., 2001) und das Humane T-Zell Leukämie Virus Typ I (HTLV-I, Jones et al., 2005; Jones et al., 2008) gehören. Vor diesem Hintergrund ist die Hemmung verschiedener Virusinfektionen durch die Verwendung SALP-haltiger Mikrobizide zur Vorbeugung von Koinfektionen besonders geeignet.

8 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
b	Basen
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
CA	Kapsidprotein (p24)
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CNI-1493	(<i>N,N'</i> -Bis[3,5-bis[1(aminoiminomethyl)hydrazonoethyl]phenyl]-decandiamid Tetrahydrochlorid
Da	Dalton
Dhp	Deoxyhypusin
DHS	Deoxyhypusin-Synthase
DHSI	Inhibitoren der Deoxyhypusin-Synthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOHH	Deoxyhypusin Hydroxylase
eIF-5A	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 5A
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
Env, <i>env</i>	<i>Envelope</i> , virale Hüllproteine
FAM	6-Carboxyfluorescein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA	Glutaraldehyd
Gag, <i>gag</i>	Gruppenspezifische Antigene (HIV-1 Strukturproteine)
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV	Humanes T-Zell Leukämievirus
Hyp	Hypusin
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
K	Kilo
kV	Kilovolt
LB	Luria Bertani
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Molar
MA	Matrixprotein
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
miRNA	<i>micro RNA</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MoMLV	Moloney Maus Leukämievirus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazolyl
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NC	Nukleokapsid

NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nt	Nukleotid
NTA	Nitrilotriessigsäure, <i>nitrilotriacetic acid</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PI	Propidiumiodid
Rev	<i>Regulator of expression of virion</i>
Rho	Rhodamin
RRE	<i>Rev response element</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SALP	<i>Synthetic anti-lipopolysaccharide peptides</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfate</i>)
SEAP	<i>Secreted placental alkaline phosphatase</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Tat	<i>Transactivator of transfection</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylsorbitan Monolaurat
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
VSV-G	Glykoprotein G des Vesicular Stomatitis Virus
x g	Mehrfaches der Gravitation

Aminosäuren wurden nach 1-Buchstaben-Code abgekürzt.

9 Literatur

Abbruzzese, A., Park, M. H., and Folk, J. E. (1986); Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis. Partial purification and characterization; *J.Biol.Chem.*; 261(7); 3085-3089

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

Aerts, A. M., Francois, I. E., Cammue, B. P., and Thevissen, K. (2008); The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins; *Cell Mol.Life Sci.*; 65(13); 2069-2079

Aguilar-Cordova, E., Chinen, J., Donehower, L., Lewis, D. E., and Belmont, J. W. (1994); A sensitive reporter cell line for HIV-1 tat activity, HIV-1 inhibitors, and T cell activation effects; *AIDS Res.Hum.Retroviruses*; 10(3); 295-301

Akkarawongsa, R., Pocaro, N. E., Case, G., Kolb, A. W., and Brandt, C. R. (2009); Multiple peptides homologous to herpes simplex virus type 1 glycoprotein B inhibit viral infection; *Antimicrob.Agents Chemother.*; 53(3); 987-996

Ammendolia, M. G., Marchetti, M., and Superti, F. (2007); Bovine lactoferrin prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 1 in Green Monkey Kidney cells; *Antiviral Res.*; 76(3); 252-262

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

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., xler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983); Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS); *Science*; 220(4599); 868-871

Bartig, D., Lemkemeier, K., Frank, J., Lottspeich, F., and Klink, F. (1992); The archaeobacterial hypusine-containing protein. Structural features suggest common ancestry with eukaryotic translation initiation factor 5A; *Eur.J.Biochem.*; 204(2); 751-758

Batzer, M. A. and Deininger, P. L. (2002); Alu repeats and human genomic diversity; *Nat.Rev.Genet.*; 3(5); 370-379

Berger, E. A., Murphy, P. M., and Farber, J. M. (1999); Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease; *Annu.Rev.Immunol.*; 17:657-700

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

Bernstein, D. I., Stanberry, L. R., Sacks, S., Ayisi, N. K., Gong, Y. H., Ireland, J., Mumper, R. J., Holan, G., Matthews, B., McCarthy, T., and Bourne, N. (2003); Evaluations of unformulated and formulated

dendrimer-based microbicide candidates in mouse and guinea pig models of genital herpes; *Antimicrob.Agents Chemother.*; 47(12); 3784-3788

Beyer, W. R., Westphal, M., Ostertag, W., and von, L. D. (2002); Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range; *J.Virol.*; 76(3); 1488-1495

Bhattacharya, J., Repik, A., and Clapham, P. R. (2006); Gag regulates association of human immunodeficiency virus type 1 envelope with detergent-resistant membranes; *J.Virol.*; 80(11); 5292-5300

Bloom, D. C. (2004); HSV LAT and neuronal survival; *Int.Rev.Immunol.*; 23(1-2); 187-198

Bobardt, M. D., Chatterji, U., Schaffer, L., de, W. L., and Gallay, P. A. (2010); Syndecan-Fc hybrid molecule as a potent in vitro microbicidal anti-HIV-1 agent; *Antimicrob.Agents Chemother.*; 54(7); 2753-2766

Bobardt, M. D., Chatterji, U., Selvarajah, S., Van der, S. B., David, G., Kahn, B., and Gallay, P. A. (2007); Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells; *J.Virol.*; 81(1); 395-405

Bobardt, M. D., Salmon, P., Wang, L., Esko, J. D., Gabuzda, D., Fiala, M., Trono, D., Van der, S. B., David, G., and Gallay, P. A. (2004); Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion; *J.Virol.*; 78(12); 6567-6584

Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., Van der, S. B., Zhang, Z., David, G., and Gallay, P. A. (2003); Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes; *Immunity.*; 18(1); 27-39

Bogerd, H. P., Echarri, A., Ross, T. M., and Cullen, B. R. (1998); Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1; *J.Virol.*; 72(11); 8627-8635

Boyd, M. R., Bacon, T. H., Sutton, D., and Cole, M. (1987); Antitherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxy-methylbut-1-yl)guanine (BRL 39123) in cell culture; *Antimicrob.Agents Chemother.*; 31(8); 1238-1242

Bradford, M. M. (1976); A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal.Biochem.*; 72:248-254

Brinkman, K., Smeitink, J. A., Romijn, J. A., and Reiss, P. (1999); Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy; *Lancet*; 354(9184); 1112-1115

Brogden, K. A. (2005); Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?; *Nat.Rev.Microbiol.*; 3(3); 238-250

Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002); A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells; *Science*; 296(5567); 550-553

Callahan, L. N., Phelan, M., Mallinson, M., and Norcross, M. A. (1991); Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120-CD4 interactions; *J.Virol.*; 65(3); 1543-1550

- Campadelli-Fiume, G., Amasio, M., Avitabile, E., Cerretani, A., Forghieri, C., Gianni, T., and Menotti, L.** (2007); The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell; *Rev.Med.Virol.*; 17(5); 313-326
- Carfi, A., Willis, S. H., Whitbeck, J. C., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Wiley, D. C.** (2001); Herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor HveA; *Mol.Cell*; 8(1); 169-179
- Casu, B., Naggi, A., and Torri, G.** (2002); Chemical derivatization as a strategy to study structure-activity relationships of glycosaminoglycans; *Semin.Thromb.Hemost.*; 28(4); 335-342
- Ceballos, A., Remes, L. F., Sabatte, J., Rodriguez, R. C., Cabrini, M., Jancic, C., Raiden, S., Donaldson, M., Agustin, P. R., Jr., Marin-Briggiler, C., Vazquez-Levin, M., Capani, F., Amigorena, S., and Geffner, J.** (2009); Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells; *J.Exp.Med.*; 206(12); 2717-2733
- Center of Disease Control** (1982); Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States; *MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep.*; 31(37); 507-4
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S.** (1997); Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein; *Cell*; 89(2); 263-273
- Cheshenko, N., Keller, M. J., MasCasullo, V., Jarvis, G. A., Cheng, H., John, M., Li, J. H., Hogarty, K., Anderson, R. A., Waller, D. P., Zaneveld, L. J., Profy, A. T., Klotman, M. E., and Herold, B. C.** (2004); Candidate topical microbicides bind herpes simplex virus glycoprotein B and prevent viral entry and cell-to-cell spread; *Antimicrob.Agents Chemother.*; 48(6); 2025-2036
- Cimarelli, A. and Darlix, J. L.** (2002); Assembling the human immunodeficiency virus type 1; *Cell Mol.Life Sci.*; 59(7); 1166-1184
- Cladera, J., Martin, I., and O'Shea, P.** (2001); The fusion domain of HIV gp41 interacts specifically with heparan sulfate on the T-lymphocyte cell surface; *EMBO J.*; 20(1-2); 19-26
- Clement, P. M., Hanauske-Abel, H. M., Wolff, E. C., Kleinman, H. K., and Park, M. H.** (2002); The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro; *Int.J.Cancer*; 100(4); 491-498
- Coen, D. M. and Schaffer, P. A.** (2003); Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets; *Nat.Rev.Drug Discov.*; 2(4); 278-288
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., and .** (1986); Human immunodeficiency viruses; *Science*; 232(4751); 697-
- 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
- Cole, A. M. and Cole, A. L.** (2008); Antimicrobial polypeptides are key anti-HIV-1 effector molecules of cervicovaginal host defense; *Am.J.Reprod.Immunol.*; 59(1); 27-34
- Cooper, H. L., Park, M. H., Folk, J. E., Safer, B., and Braverman, R.** (1983); Identification of the hypusine-containing protein hy+ as translation initiation factor eIF-4D; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 80(7); 1854-1857

- Crublet, E., Andrieu, J. P., Vives, R. R., and Lortat-Jacob, H.** (2008); The HIV-1 envelope glycoprotein gp120 features four heparan sulfate binding domains, including the co-receptor binding site; *J.Biol.Chem.*; 283(22); 15193-15200
- Cullen, B. R.** (1986); Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism; *Cell*; 46(7); 973-982
- De Clercq, E.** (1991); Chemotherapy of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS): non-nucleoside inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase; *Int.J.Immunopharmacol.*; 13 Suppl 183-89
- de Parseval, A., Bobardt, M. D., Chatterji, A., Chatterji, U., Elder, J. H., David, G., Zolla-Pazner, S., Farzan, M., Lee, T. H., and Gallay, P. A.** (2005); A highly conserved arginine in gp120 governs HIV-1 binding to both syndecans and CCR5 via sulfated motifs; *J.Biol.Chem.*; 280(47); 39493-39504
- de Witte, L., Bobardt, M., Chatterji, U., Degeest, G., David, G., Geijtenbeek, T. B., and Gallay, P.** (2007); Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 104(49); 19464-19469
- Demaria, S. and Bushkin, Y.** (1996); Soluble CD4 induces the binding of human immunodeficiency virus type 1 to cells via the V3 loop of glycoprotein 120 and specific sites in glycoprotein 41; *AIDS Res.Hum.Retroviruses*; 12(4); 281-290
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di, M. 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
- Derse, D., Mikovits, J., and Ruscetti, F.** (1997); X-I and X-II open reading frames of HTLV-I are not required for virus replication or for immortalization of primary T-cells in vitro; *Virology*; 237(1); 123-128
- Dimitrov, D. S., Willey, R. L., Sato, H., Chang, L. J., Blumenthal, R., and Martin, M. A.** (1993); Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics; *J.Virol.*; 67(4); 2182-2190
- Ding, J., Chou, Y. Y., and Chang, T. L.** (2009); Defensins in viral infections; *J.Innate.Immun.*; 1(5); 413-420
- Ding, J., Rapista, A., Teleshova, N., Lu, W., Klotman, M. E., and Chang, T. L.** (2010); Mucosal Human Defensins 5 and 6 Antagonize the Anti-HIV Activity of Candidate Polyanion Microbicides; *J.Innate.Immun.*;
- Döhner, K., Radtke, K., Schmidt, S., and Sodeik, B.** (2006); Eclipse phase of herpes simplex virus type 1 infection: Efficient dynein-mediated capsid transport without the small capsid protein VP26; *J.Virol.*; 80(16); 8211-8224
- Döhner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R., and Sodeik, B.** (2002); Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport; *Mol.Biol.Cell*; 13(8); 2795-2809
- Dong, Z., Arnold, R. J., Yang, Y., Park, M. H., Hrnčirova, P., Mechref, Y., Novotny, M. V., and Zhang, J. T.** (2005); Modulation of differentiation-related gene 1 expression by cell cycle blocker mimosine, revealed by proteomic analysis; *Mol.Cell Proteomics*.; 4(7); 993-1001

- 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
- 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
- Endress, T., Lampe, M., Briggs, J. A., Krausslich, H. G., Brauchle, C., Muller, B., and Lamb, D. C.** (2008); HIV-1-cellular interactions analyzed by single virus tracing; *Eur.Biophys.J.*; 37(8); 1291-1301
- Everett, R. D.** (2001); DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies; *Oncogene*; 20(49); 7266-7273
- Everett, R. D. and Murray, J.** (2005); ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection; *J.Virol.*; 79(8); 5078-5089
- Fauci, A. S., Schnittman, S. M., Poli, G., Koenig, S., and Pantaleo, G.** (1991); NIH conference. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection; *Ann.Intern.Med.*; 114(8); 678-693
- Feinberg, M. B., Jarrett, R. F., Aldovini, A., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F.** (1986); HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA; *Cell*; 46(6); 807-817
- Feldblum, P. J., Adeiga, A., Bakare, R., Wevill, S., Lendvay, A., Obadaki, F., Olayemi, M. O., Wang, L., Nanda, K., and Rountree, W.** (2008); SAVVY vaginal gel (C31G) for prevention of HIV infection: a randomized controlled trial in Nigeria; *PLoS.One.*; 3(1); e1474-
- 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
- Furman, P. A., St Clair, M. H., and Spector, T.** (1984); Acyclovir triphosphate is a suicide inactivator of the herpes simplex virus DNA polymerase; *J.Biol.Chem.*; 259(15); 9575-9579
- 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
- Galli, M., Ridolfo, A. L., Adorni, F., Gervasoni, C., Rivasio, L., Corsico, L., Gianelli, E., Piazza, M., Vaccarezza, M., d'Arminio, M. A., and Moroni, M.** (2002); Body habitus changes and metabolic alterations in protease inhibitor-naive HIV-1-infected patients treated with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors; *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.*; 29(1); 21-31
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., and Popovic, M.** (1983); Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS); *Science*; 220(4599); 865-867
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., and Lehrer, R. I.** (1985); Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils; *J.Clin.Invest*; 76(4); 1427-1435
- Gärtner, B. and Müller-Lantzsch, N.** (2002); Herpesviren: allgemein.; *Medizinische Virologie - Grundlagen, Diagnostik, und Therapie virologischer Krankheitsbilder* 370-372

- 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
- Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Spear, P. G.** (1998); Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor; *Science*; 280(5369); 1618-1620
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E., and Sapp, M.** (2001); Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate; *J.Virol.*; 75(3); 1565-1570
- Goebel, T., Ulmer, D., Projahn, H., Kloeckner, J., Heller, E., Glaser, M., Ponte-Sucre, A., Specht, S., Sarite, S. R., Hoerauf, A., Kaiser, A., Hauber, I., Hauber, J., and Holzgrabe, U.** (2008); In search of novel agents for therapy of tropical diseases and human immunodeficiency virus; *J.Med.Chem.*; 51(2); 238-250
- Granfors, M. T., Wang, J. S., Kajosaari, L. I., Laitila, J., Neuvonen, P. J., and Backman, J. T.** (2006); Differential inhibition of cytochrome P450 3A4, 3A5 and 3A7 by five human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors in vitro; *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.*; 98(1); 79-85
- Grinsztejn, B., Nguyen, B. Y., Katlama, C., Gatell, J. M., Lazzarin, A., Vittecoq, D., Gonzalez, C. J., Chen, J., Harvey, C. M., and Isaacs, R. D.** (2007); Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial; *Lancet*; 369(9569); 1261-1269
- Gutsmann, T., Razquin-Olazarán, I., Kowalski, I., Kaconis, Y., Howe, J., Bartels, R., Hornef, M., Schurholz, T., Rossle, M., Sanchez-Gomez, S., Moriyon, I., Martinez de, T. G., and Brandenburg, K.** (2010); New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock; *Antimicrob.Agents Chemother.*; 54(9); 3817-3824
- Hanauske-Abel, H. M., Park, M. H., Hanauske, A. R., Popowicz, A. M., Lalande, M., and Folk, J. E.** (1994); Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation; *Biochim.Biophys.Acta*; 1221(2); 115-124
- Harrop, H. A., Coombe, D. R., and Rider, C. C.** (1994); Heparin specifically inhibits binding of V3 loop antibodies to HIV-1 gp120, an effect potentiated by CD4 binding; *AIDS*; 8(2); 183-192
- 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
- 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
- Heldwein, E. E. and Krummenacher, C.** (2008); Entry of herpesviruses into mammalian cells; *Cell Mol.Life Sci.*; 65(11); 1653-1668
- Heldwein, E. E., Lou, H., Bender, F. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Harrison, S. C.** (2006); Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1; *Science*; 313(5784); 217-220
- Hellenbrand, W., Thierfelder, W., Muller-Pebody, B., Hamouda, O., and Breuer, T.** (2005); Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998; *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*; 24(2); 131-135

- Herold, B. C., Mesquita, P. M., Madan, R. P., and Keller, M. J.** (2010); Female Genital Tract Secretions and Semen Impact the Development of Microbicides for the Prevention of HIV and Other Sexually Transmitted Infections; *Am.J.Reprod.Immunol.*;
- Herold, B. C., Siston, A., Bremer, J., Kirkpatrick, R., Wilbanks, G., Fugedi, P., Peto, C., and Cooper, M.** (1997); Sulfated carbohydrate compounds prevent microbial adherence by sexually transmitted disease pathogens; *Antimicrob.Agents Chemother.*; 41(12); 2776-2780
- Herold, B. C., Visalli, R. J., Susmarski, N., Brandt, C. R., and Spear, P. G.** (1994); Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B; *J.Gen.Virol.*; 75 (Pt 6)1211-1222
- Herold, B. C., WuDunn, D., Soltys, N., and Spear, P. G.** (1991); Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity; *J.Virol.*; 65(3); 1090-1098
- Hohenberg, H., Mannweiler, K., and Muller, M.** (1994); High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes; *J.Microsc.*; 175(Pt 1); 34-43
- Hope, T. J., Huang, X. J., McDonald, D., and Parslow, T. G.** (1990); Steroid-receptor fusion of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: mapping cryptic functions of the arginine-rich motif; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 87(19); 7787-7791
- Hoque, M., Hanauske-Abel, H. M., Palumbo, P., Saxena, D., D'Alliessi, G. D., Park, M. H., Pe'ery, T., and Mathews, M. B.** (2009); Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A; *Retrovirology.*; 690-
- Hübner, W., McNerney, G. P., en, P., le, B. M., rdon, R. E., uang, F. Y., , X. D., muth, D. M., ser, T., and en, B. K.** (2009); Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses; *Science*; 323(5922); 1743-1747
- Ibrahim, J., Griffin, P., Coombe, D. R., Rider, C. C., and James, W.** (1999); Cell-surface heparan sulfate facilitates human immunodeficiency virus Type 1 entry into some cell lines but not primary lymphocytes; *Virus Res.*; 60(2); 159-169
- Iozzo, R. V.** (1998); Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function; *Annu.Rev.Biochem.*; 67609-652
- Ito, M., Baba, M., Sato, A., Pauwels, R., De, C. E., and Shigeta, S.** (1987); Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro; *Antiviral Res.*; 7(6); 361-367
- Jagodzinski, P. P. and Trzeciak, W. H.** (1998); The V3 region of gp120 is responsible for anti-HIV-1 activity of heparin sulphate; *Acta Biochim.Pol.*; 45(3); 799-804
- Jakus, J., Wolff, E. C., Park, M. H., and Folk, J. E.** (1993); Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines; *J.Biol.Chem.*; 268(18); 13151-13159
- Jiang, Y. H., Emau, P., Cairns, J. S., Flanary, L., Morton, W. R., McCarthy, T. D., and Tsai, C. C.** (2005); SPL7013 gel as a topical microbicide for prevention of vaginal transmission of SHIV89.6P in macaques; *AIDS Res.Hum.Retroviruses*; 21(3); 207-213

- John, M., Keller, M. J., Fam, E. H., Cheshenko, N., Hogarty, K., Kasowitz, A., Wallenstein, S., Carlucci, M. J., Tuyama, A. C., Lu, W., Klotman, M. E., Lehrer, R. I., and Herold, B. C.** (2005); Cervicovaginal secretions contribute to innate resistance to herpes simplex virus infection; *J.Infect.Dis.*; 192(10); 1731-1740
- Jones, C.** (1998); Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature; *Adv.Virus Res.*; 5181-133
- Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D. C., Huang, Y., and Ruscetti, F. W.** (2005); Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells; *J.Virol.*; 79(20); 12692-12702
- Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y. K., Bertolette, D. C., and Ruscetti, F. W.** (2008); Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells; *Nat.Med.*; 14(4); 429-436
- Kalland, K. H., Szilvay, A. M., Brokstad, K. A., Saetrevik, W., and Haukenes, G.** (1994); The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein shuttles between the cytoplasm and nuclear compartments; *Mol.Cell Biol.*; 14(11); 7436-7444
- Kampmeier, R. H.** (1984); Herpes genitalis: a clinical puzzle for two centuries; *Sex Transm.Dis.*; 11(1); 41-45
- 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
- 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
- Kerscher, B., Nzukou, E., and Kaiser, A.** (2010); Assessment of deoxyhypusine hydroxylase as a putative, novel drug target; *Amino.Acids*; 38(2); 471-477
- 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
- Klotman, M. E. and Chang, T. L.** (2006); Defensins in innate antiviral immunity; *Nat.Rev.Immunol.*; 6(6); 447-456
- Kuwano, K., Tanaka, N., Shimizu, T., and Kida, Y.** (2006); Antimicrobial activity of inducible human beta defensin-2 against *Mycoplasma pneumoniae*; *Curr.Microbiol.*; 52(6); 435-438
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A.** (1998); Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody; *Nature*; 393(6686); 648-659
- Laquerre, S., Argnani, R., Anderson, D. B., Zucchini, S., Manservigi, R., and Glorioso, J. C.** (1998); Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread; *J.Virol.*; 72(7); 6119-6130
- Lederman, M. M.** (1995); Host-directed and immune-based therapies for human immunodeficiency virus infection; *Ann.Intern.Med.*; 122(3); 218-222

- Lederman, M. M., Offord, R. E., and Hartley, O.** (2006a); Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV; *Nat.Rev.Immunol.*; 6(5); 371-382
- Lederman, M. M., Penn-Nicholson, A., Cho, M., and Mosier, D.** (2006b); Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment; *JAMA*; 296(7); 815-826
- Lederman, M. M., Veazey, R. S., Offord, R., Mosier, D. E., Dufour, J., Mefford, M., Piatak, M., Jr., Lifson, J. D., Salkowitz, J. R., Rodriguez, B., Blauvelt, A., and Hartley, O.** (2004); Prevention of vaginal SHIV transmission in rhesus macaques through inhibition of CCR5; *Science*; 306(5695); 485-487
- Lee, S. K., Lee, J., Lee, S. I., Bae, W. J., Lee, Y. M., Park, J. S., Lee, S. K., Park, S. J., Min, S. K., and Kim, E. C.** (2009); N(1)-guanyl-1,7,-diamineoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, suppresses differentiation and induces apoptosis via mitochondrial and AMPK pathways in immortalized and malignant human oral keratinocytes; *J.Oral Pathol.Med.*; 38(10); 792-800
- Lee, Y., Kim, H. K., Park, H. E., Park, M. H., and Joe, Y. A.** (2002); Effect of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on endothelial cell growth, differentiation and apoptosis; *Mol.Cell Biochem.*; 237(1-2); 69-76
- Lee, Y. B., Park, M. H., and Folk, J. E.** (1995); Diamine and triamine analogs and derivatives as inhibitors of deoxyhypusine synthase: synthesis and biological activity; *J.Med.Chem.*; 38(16); 3053-3061
- Lehrer, R. I.** (2004); Primate defensins; *Nat.Rev.Microbiol.*; 2(9); 727-738
- Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W., and Sodroski, J.** (1989); Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions; *J.Virol.*; 63(9); 4085-4087
- 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
- Liao, D. I., Wolff, E. C., Park, M. H., and Davies, D. R.** (1998); Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site; *Structure.*; 6(1); 23-32
- Liu, J., Bartesaghi, A., Borgnia, M. J., Sapiro, G., and Subramaniam, S.** (2008); Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers; *Nature*; 455(7209); 109-113
- Lüderitz, O., Galanos, C., Lehmann, V., Nurminen, M., Rietschel, E. T., Rosenfelder, G., Simon, M., and Westphal, O.** (1973); Lipid A: chemical structure and biological activity; *J.Infect.Dis.*; 128Suppl-29
- Lusso, P., Cocchi, F., Balotta, C., Markham, P. D., Louie, A., Farci, P., Pal, R., Gallo, R. C., and Reitz, M. S., Jr.** (1995); Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1; *J.Virol.*; 69(6); 3712-3720
- 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
- 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

- 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
- Malim, M. H., McCarn, D. F., Tiley, L. S., and Cullen, B. R.** (1991); Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain; *J.Virol.*; 65(8); 4248-4254
- Marchetti, M., Ammendolia, M. G., and Superti, F.** (2009); Glycosaminoglycans are not indispensable for the anti-herpes simplex virus type 2 activity of lactoferrin; *Biochimie*; 91(1); 155-159
- Mardberg, K., Trybala, E., Glorioso, J. C., and Bergstrom, T.** (2001); Mutational analysis of the major heparan sulfate-binding domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C; *J.Gen.Virol.*; 82(Pt 8); 1941-1950
- May, M. T., Sterne, J. A., Costagliola, D., Sabin, C. A., Phillips, A. N., Justice, A. C., Dabis, F., Gill, J., Lundgren, J., Hogg, R. S., de, W. F., Fatkenheuer, G., Staszewski, S., d'Arminio, M. A., and Egger, M.** (2006); HIV treatment response and prognosis in Europe and North America in the first decade of highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis; *Lancet*; 368(9534); 451-458
- Mayer, K. H., Maslankowski, L. A., Gai, F., El-Sadr, W. M., Justman, J., Kwiecien, A., Masse, B., Eshleman, S. H., Hendrix, C., Morrow, K., Rooney, J. F., and Soto-Torres, L.** (2006); Safety and tolerability of tenofovir vaginal gel in abstinent and sexually active HIV-infected and uninfected women; *AIDS*; 20(4); 543-551
- Mbemba, E., Czyski, J. A., and Gattegno, L.** (1992); The interaction of a glycosaminoglycan, heparin, with HIV-1 major envelope glycoprotein; *Biochim.Biophys.Acta*; 1180(2); 123-129
- McClure, M. O., Moore, J. P., Blanc, D. F., Scotting, P., Cook, G. M., Keynes, R. J., Weber, J. N., Davies, D., and Weiss, R. A.** (1992); Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection in vitro; *AIDS Res.Hum.Retroviruses*; 8(1); 19-26
- McGuirt, P. V. and Furman, P. A.** (1982); Acyclovir inhibition of viral DNA chain elongation in herpes simplex virus-infected cells; *Am.J.Med.*; 73(1A); 67-71
- McQuade, T. J., Tomasselli, A. G., Liu, L., Karacostas, V., Moss, B., Sawyer, T. K., Henrikson, R. L., and Tarpley, W. G.** (1990); A synthetic HIV-1 protease inhibitor with antiviral activity arrests HIV-like particle maturation; *Science*; 247(4941); 454-456
- Melikyan, G. B., Markosyan, R. M., Hemmati, H., Delmedico, M. K., Lambert, D. M., and Cohen, F. S.** (2000); Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion; *J.Cell Biol.*; 151(2); 413-423
- Mettenleiter, T. C.** (2004); Budding events in herpesvirus morphogenesis; *Virus Res.*; 106(2); 167-180
- Mettenleiter, T. C.** (2002); Herpesvirus assembly and egress; *J.Virol.*; 76(4); 1537-1547
- Meyer, B. E. and Malim, M. H.** (1994); The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm; *Genes Dev.*; 8(13); 1538-1547
- Michael, N. L., Vahey, M., Burke, D. S., and Redfield, R. R.** (1992); Viral DNA and mRNA expression correlate with the stage of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection in humans: evidence for viral replication in all stages of HIV disease; *J.Virol.*; 66(1); 310-316

- Miller, V., Stark, T., Loeliger, A. E., and Lange, J. M.** (2002); The impact of the M184V substitution in HIV-1 reverse transcriptase on treatment response; *HIV.Med.*; 3(2); 135-145
- 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 type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 82(20); 7096-7100
- Modrow, S., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Gallo, R. C., Wong-Staal, F., and Wolf, H.** (1987); Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions; *J.Virol.*; 61(2); 570-578
- Mondor, I., Ugolini, S., and Sattentau, Q. J.** (1998); Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans; *J.Virol.*; 72(5); 3623-3634
- Montagnier, L., Chermann, J. C., Barre-Sinoussi, F., Klatzmann, D., Wain-Hobson, S., Alizon, M., Clavel, F., Brun-Vezinet, F., Vilmer, E., Rouzioux, C., and .** (1984); Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS; *Princess Takamatsu Symp.*; 15319-331
- Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum, B. J., and Spear, P. G.** (1996); Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family; *Cell*; 87(3); 427-436
- Morikawa, K., Yasumoto, S., and Yanagida, M.** (1981); Specificity in the interaction of 4',6-diamidino-2-phenylindole with polynucleotides; *Nucleic Acids Symp.Ser.*; (10); 85-88
- Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D., and Sattentau, Q. J.** (2000); Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120; *J.Virol.*; 74(4); 1948-1960
- Münk, C., Wei, G., Yang, O. O., Waring, A. J., Wang, W., Hong, T., Lehrer, R. I., Landau, N. R., and Cole, A. M.** (2003); The theta-defensin, retrocyclin, inhibits HIV-1 entry; *AIDS Res.Hum.Retroviruses*; 19(10); 875-881
- 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
- Ohshiro, Y., Murakami, T., Matsuda, K., Nishioka, K., Yoshida, K., and Yamamoto, N.** (1996); Role of cell surface glycosaminoglycans of human T cells in human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection; *Microbiol.Immunol.*; 40(11); 827-835
- 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
- Pantaleo, G., Graziosi, C., and Fauci, A. S.** (1993); New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection; *N.Engl.J.Med.*; 328(5); 327-335
- Parada, C. A. and Roeder, R. G.** (1996); Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain; *Nature*; 384(6607); 375-378

- Park, J. H., Aravind, L., Wolff, E. C., Kaevel, J., Kim, Y. S., and Park, M. H.** (2006); Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a HEAT-repeat-containing metalloenzyme; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 103(1); 51-56
- Park, M. H., Cooper, H. L., and Folk, J. E.** (1981); Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 78(5); 2869-2873
- Park, M. H., Joe, Y. A., and Kang, K. R.** (1998); Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *J.Biol.Chem.*; 273(3); 1677-1683
- 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
- Park, M. H., Wolff, E. C., Lee, Y. B., and Folk, J. E.** (1994); Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines; *J.Biol.Chem.*; 269(45); 27827-27832
- Park, N. H., Pavan-Langston, D., and McLean, S. L.** (1979); Acyclovir in oral and ganglionic herpes simplex virus infections; *J.Infect.Dis.*; 140(5); 802-806
- Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D. C., Oravec, T., Hascall, V. C., and Norcross, M. A.** (1993); Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines; *AIDS Res.Hum.Retroviruses*; 9(2); 167-174
- Patel, S., Hazrati, E., Cheshenko, N., Galen, B., Yang, H., Guzman, E., Wang, R., Herold, B. C., and Keller, M. J.** (2007); Seminal plasma reduces the effectiveness of topical polyanionic microbicides; *J.Infect.Dis.*; 196(9); 1394-1402
- 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
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., and Gallo, R. C.** (1980); Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 77(12); 7415-7419
- Pool, R., Hart, G., Green, G., Harrison, S., Nyanzi, S., and Whitworth, J.** (2000); Men's attitudes to condoms and female controlled means of protection against HIV and STDs in south-western Uganda; *Cult.Health Sex*; 2(2); 197-211
- Pope, M. and Haase, A. T.** (2003); Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection; *Nat.Med.*; 9(7); 847-852
- Preston, B. D., Poiesz, B. J., and Loeb, L. A.** (1988); Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase; *Science*; 242(4882); 1168-1171
- Quinn, T. C. and Overbaugh, J.** (2005); HIV/AIDS in women: an expanding epidemic; *Science*; 308(5728); 1582-1583
- Rajcani, J., Andrea, V., and Ingeborg, R.** (2004); Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview; *Virus Genes*; 28(3); 293-310

- Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., and Sodroski, J.** (1998); A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding; *Science*; 280(5371); 1949-1953
- 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
- Roddy, R. E., Zekeng, L., Ryan, K. A., Tamoufe, U., Weir, S. S., and Wong, E. L.** (1998); A controlled trial of nonoxynol 9 film to reduce male-to-female transmission of sexually transmitted diseases; *N.Engl.J.Med.*; 339(8); 504-510
- Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H., and Norcross, M. A.** (1995); Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41; *J. Virol.*; 69(4); 2233-2239
- Roizman, B. and Knipe, D. M.** (2001); Herpes simplex viruses and their replication.; In Knipe, D. M. und Howley, P. M. (eds.); *Fields Virology 4th Edition*; Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia; pp. 2399-2459
- Ruhl, M., Himmelsbach, 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
- Rutz, S. and Scheffold, A.** (2004); Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems; *Arthritis Res. Ther.*; 6(2); 78-85
- Saefel, M., Sarite, R. S., Njuguna, T., Holzgrabe, U., Ulmer, D., Hoerauf, A., and Kaiser, A.** (2006); Piperidones with activity against Plasmodium falciparum; *Parasitol. Res.*; 99(3); 281-286
- Saphire, A. C., Bobardt, M. D., and Gallay, P. A.** (1999); Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans; *EMBO J.*; 18(23); 6771-6785
- Sasaki, K., Abid, M. R., and Miyazaki, M.** (1996); Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *FEBS Lett.*; 384(2); 151-154
- Schäfer, B., Hauber, I., Bunk, A., Heukeshoven, J., Dusedau, A., Bevec, D., and Hauber, J.** (2006); Inhibition of multidrug-resistant HIV-1 by interference with cellular S-adenosylmethionine decarboxylase activity; *J. Infect. Dis.*; 194(6); 740-750
- Schnier, J., Schwelberger, H. G., Smit-McBride, Z., Kang, H. A., and Hershey, J. W.** (1991); Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *Mol. Cell Biol.*; 11(6); 3105-3114
- Schwartz, J. L., Kovalevsky, G., Lai, J. J., Ballagh, S. A., McCormick, T., Douville, K., Mauck, C. K., and Callahan, M. M.** (2008); A randomized six-day safety study of an antiretroviral microbicide candidate UC781, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; *Sex Transm. Dis.*; 35(4); 414-419
- Seo, E. S., Blaum, B. S., Vargues, T., De, C. M., Deakin, J. A., Lyon, M., Barran, P. E., Campopiano, D. J., and Uhrin, D.** (2010); Interaction of Human beta-Defensin 2 (HBD2) with Glycosaminoglycans; *Biochemistry*;

- Sherman, M. P. and Greene, W. C.** (2002); Slipping through the door: HIV entry into the nucleus; *Microbes.Infect.*; 4(1); 67-73
- Shieh, M. T., WuDunn, D., Montgomery, R. I., Esko, J. D., and Spear, P. G.** (1992); Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans; *J.Cell Biol.*; 116(5); 1273-1281
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., and Spear, P. G.** (1999); A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry; *Cell*; 99(1); 13-22
- Siomi, H. and Siomi, M. C.** (2009); On the road to reading the RNA-interference code; *Nature*; 457(7228); 396-404
- Skoler-Karppoff, S., Ramjee, G., Ahmed, K., Altini, L., Plagianos, M. G., Friedland, B., Govender, S., De, K. A., Cassim, N., Palanee, T., Dozier, G., Maguire, R., and Lahteenmaki, P.** (2008); Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial; *Lancet*; 372(9654); 1977-1987
- Sodeik, B., Ebersold, M. W., and Helenius, A.** (1997); Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus; *J.Cell Biol.*; 136(5); 1007-1021
- Spear, P. G.** (2004); Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry; *Cell Microbiol.*; 6(5); 401-410
- Spear, P. G., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H.** (2000); Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry; *Virology*; 275(1); 1-8
- Spear, P. G. and Longnecker, R.** (2003); Herpesvirus entry: an update; *J.Virol.*; 77(19); 10179-10185
- Spillmann, D.** (2001); Heparan sulfate: anchor for viral intruders?; *Biochimie*; 83(8); 811-817
- Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J. D., Penhallow, R. C., Bensch, K. G., and Engleman, E. G.** (1987); pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane; *Cell*; 49(5); 659-668
- 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
- Stowring, L., Haase, A. T., and Charman, H. P.** (1979); Serological definition of the lentivirus group of retroviruses; *J.Virol.*; 29(2); 523-528
- Subramanian, R. P. and Geraghty, R. J.** (2007); Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 104(8); 2903-2908
- 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
- Tal-Singer, R., Peng, C., Ponce De, L. M., Abrams, W. R., Banfield, B. W., Tufaro, F., Cohen, G. H., and Eisenberg, R. J.** (1995); Interaction of herpes simplex virus glycoprotein gC with mammalian cell surface molecules; *J.Virol.*; 69(7); 4471-4483

- Tindall, B. and Cooper, D. A.** (1991); Primary HIV infection: host responses and intervention strategies; *AIDS*; 5(1); 1-14
- Ueno, R. and Kuno, S.** (1987); Dextran sulphate, a potent anti-HIV agent in vitro having synergism with zidovudine; *Lancet*; 1(8546); 1379-
- Ugolini, S., Mondor, I., and Sattentau, Q. J.** (1999); HIV-1 attachment: another look; *Trends Microbiol.*; 7(4); 144-149
- Umland, T. C., Wolff, E. C., Park, M. H., and Davies, D. R.** (2004); A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme.NAD.inhibitor ternary complex; *J.Biol.Chem.*; 279(27); 28697-28705
- Van Damme, L., Govinden, R., Mirembe, F. M., Guedou, F., Solomon, S., Becker, M. L., Pradeep, B. S., Krishnan, A. K., Alary, M., Pande, B., Ramjee, G., Deese, J., Crucitti, T., and Taylor, D.** (2008); Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission; *N.Engl.J.Med.*; 359(5); 463-472
- van De Wijgert, J., Fullem, A., Kelly, C., Mehendale, S., Rugpao, S., Kumwenda, N., Chirenje, Z., Joshi, S., Taha, T., Padian, N., Bollinger, R., and Nelson, K.** (2001); Phase 1 trial of the topical microbicide BufferGel: safety results from four international sites; *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.*; 26(1); 21-27
- Veazey, R. S., Klasse, P. J., Schader, S. M., Hu, Q., Ketas, T. J., Lu, M., Marx, P. A., Dufour, J., Colonna, R. J., Shattock, R. J., Springer, M. S., and Moore, J. P.** (2005); Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by vaginally delivered inhibitors of virus-cell fusion; *Nature*; 438(7064); 99-102
- Venkataraman, N., Cole, A. L., Svoboda, P., Pohl, J., and Cole, A. M.** (2005); Cationic polypeptides are required for anti-HIV-1 activity of human vaginal fluid; *J.Immunol.*; 175(11); 7560-7567
- Vives, R. R., Imberty, A., Sattentau, Q. J., and Lortat-Jacob, H.** (2005); Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site; *J.Biol.Chem.*; 280(22); 21353-21357
- Volpi, N.** (2006); Therapeutic applications of glycosaminoglycans; *Curr.Med.Chem.*; 13(15); 1799-1810
- Vu, V. V., Emerson, J. P., Martinho, M., Kim, Y. S., Munck, E., Park, M. H., and Que, L., Jr.** (2009); Human deoxyhypusine hydroxylase, an enzyme involved in regulating cell growth, activates O₂ with a nonheme diiron center; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 106(35); 14814-14819
- Wadstrom, T. and Ljungh, A.** (1999); Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity; *J.Med.Microbiol.*; 48(3); 223-233
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., and Alizon, M.** (1985); Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV; *Cell*; 40(1); 9-17
- Wang, W. K., Dudek, T., Zhao, Y. J., Brumblay, H. G., Essex, M., and Lee, T. H.** (1998); CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 95(10); 5740-5745
- Ward, P. L. and Roizman, B.** (1994); Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen; *Trends Genet.*; 10(8); 267-274

- Wei, X., Decker, J. M., Liu, H., Zhang, Z., Arani, R. B., Kilby, J. M., Saag, M. S., Wu, X., Shaw, G. M., and Kappes, J. C.** (2002); Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy; *Antimicrob. Agents Chemother.*; 46(6); 1896-1905
- Weir, J. P.** (2001); Regulation of herpes simplex virus gene expression; *Gene*; 271(2); 117-130
- Weiss, C. D., Levy, J. A., and White, J. M.** (1990); Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles; *J. Virol.*; 64(11); 5674-5677
- Whitley, R. J.** (2001); Herpes simplex viruses.; In Knipe, D. M. und Howley, P. M. (eds.); *Fields Virology 4th Edition*; Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia; pp. 2461-2509
- Whitley, R. J. and Roizman, B.** (2001); Herpes simplex virus infections; *Lancet*; 357(9267); 1513-1518
- Wöhl, T., Baur, M., Friedl, A. A., and Lottspeich, F.** (1992); Chromosomal localization of the HYP2-gene in *Saccharomyces cerevisiae* and use of pulsed-field gel electrophoresis for detection of irregular recombination events in gene disruption experiments; *Electrophoresis*; 13(9-10); 651-653
- Wolff, E. C., Park, M. H., and Folk, J. E.** (1990); Cleavage of spermidine as the first step in deoxyhypusine synthesis. The role of NAD; *J. Biol. Chem.*; 265(9); 4793-4799
- Wu, Z., Chen, Z., and Phillips, D. M.** (2003); Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission; *J. Infect. Dis.*; 188(10); 1473-1482
- Wutzler, P.** (2011); Herpesviren: Herpes-Simplex-Virus Typ 1 und 2, Varizella-Zoster-Virus.; In Doerr, H. W. und Gerlich, W. H. (eds.); *Medizinische Virologie - Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder.*; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York; pp. 373-381
- Wyatt, R. and Sodroski, J.** (1998); The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens; *Science*; 280(5371); 1884-1888
- Yarchoan, R., Klecker, R. W., Weinhold, K. J., Markham, P. D., Lyerly, H. K., Durack, D. T., Gelmann, E., Lehrman, S. N., Blum, R. M., Barry, D. W., and .** (1986); Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex; *Lancet*; 1(8481); 575-580
- Yasin, B., Wang, W., Pang, M., Cheshenko, N., Hong, T., Waring, A. J., Herold, B. C., Wagar, E. A., and Lehrer, R. I.** (2004); Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry; *J. Virol.*; 78(10); 5147-5156
- Zasloff, M.** (2002); Antimicrobial peptides of multicellular organisms; *Nature*; 415(6870); 389-395

Gefahrenstoffe

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
7-Aminoactinomycin D	T+	26/27/28-36/37/38	26-28-36/37-45
Acrylamid	T	45-46-20/2125-36/38-43- 48/23/24/25-62	53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Blasticidin	T+	28	24/25-36/37-45
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Dithiothreitol	Xn	22	36-38
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-68	26-28-36/37-45
Formamid	T	61	53-45
Formaldehyd	T	23/24/25-34-40-43	1/2-26-36/37/39-45-51
Isopropanol	F, Xi	11-36-67	2-7-16-24/25-26
2-Mercaptoethanol	T, N	20/22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
Methanol	T, F	11-23/24/25- 39/23/24/25	1/2-7-16-36/37-45
Phenol	T, C	23/24/25-34- 48/20/21/22-68	1/2-24/25-26-28- 36/37/39-45
Propidiumiodid	Xi	36/37/38	26
SDS	F, Xn	11-21/22-36/37/38	26-36/37
Schwefelsäure	C	35	26-30-45

Publikationen

Publikationen

Krepstakies M., Lucifora J., Nagel C.-H., Zeisel M., Holstermann B., Hohenberg H., Kowalski I., Gutschmann T., Brandenburg K., Baumert T.F., Hauber J., Protzer U, (2011) „Targeting Virus Attachment by a New Class of Synthetic Cross-Species Peptide Inhibitors“, Manuskript eingereicht

Hoffmann, D., Schwarck D., **Krepstakies, M.**, Banning C., Schindler M. and Hauber, J., „A functional view on HIV-1 Rev multimer-formation.“ Manuskript in Vorbereitung

Poster

Krepstakies M., Nagel C.-H., Hauber J., Brandenburg K. “Antimicrobial Peptides (AMP) Inhibit Infection of Human Immunodeficiency Virus and Herpes Simplex Virus“, *4th European Congress of Virology 2010*, Lago di Como, Italien

Schroeder M., Kolodzik A., **Krepstakies M.**, Priyadarshini P., Hauber J., Rarey M. und Meier C. “Rational Drug Design – Screening and Synthesis of Potential Deoxyhypusine Synthase Inhibitors Targeting HIV-1 Replication“, *International Conference on Antiviral Research 2010*, San Francisco

Hartjen P., **Krepstakies M.**, Kummer S., Hauber I., Hauber J., van Lunzen J. „Combating Drug Resistance - Antiretroviral Activity and Immune Function in Presence of Hypusination Inhibitors“, *Deutsch-Schweiz-Österreichischer AIDS Kongress 2009*, St. Gallen, Schweiz

Krepstakies M., Hauber I., Goebel T., Kloeckner J., Holzgrabe U, Hauber J. „Piperidone Derivatives for Treatment of HIV and HTLV Infections and Chronic Myeloid Leukemia“, *Biovaria 2008*, München

Jensen N., Stahmer I., Mohn J., Hoffmann D., **Krepstakies M.**, Hauber I., Jordan S., Stahl-Henning C., Hauber J., van Lunzen J., “Characterization of Distinct TRIM5-alpha mRNA Polymorphisms in SIV and HIV-1 Long-term Non-Progressors“, *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2008*, Boston

Vorträge

Krepstakies M., “A New Class of Multivalent Antiviral Peptides Efficiently Block HIV and HSV“, *HPI Mini-Symposium 2010*, Hamburg

Krepstakies M., „Neue Strategien gegen HIV-AIDS“, *Nacht des Wissens 2009*, HPI Hamburg

Krepstakies M., „Piperidone Derivatives for Treatment of HIV Infections“, *Biovaria 2008*, München

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe. Weiterhin versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Marcel Krepstakies

Hamburg, 24. Januar 2011