



GEORG SPEYER HAUS



**Funktionelle Charakterisierung von  
Peptidliganden für das komplexe HIV-1  
RNA-Verpackungssignal  $\Psi$**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15  
Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Julia Dietz  
aus Bad Homburg v. d. Höhe

Frankfurt am Main 2008

D30

vom Fachbereich 15 (Biowissenschaften) der Johann Wolfgang Goethe-Universität als  
Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. V. Müller

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. H. Schwalbe

Datum der Disputation: 18.06.08



*Für meine Eltern*

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Das Humane Immundefizienz Virus .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Klassifizierung .....	3
1.1.2 Ursprung und Phylogenie von HIV .....	3
1.1.3 Aufbau des Viruspartikels .....	4
1.1.4 Organisation des Genoms .....	5
1.1.5 Virusproteine.....	6
1.1.6 Replikationszyklus.....	7
<b>1.2 Therapeutische Strategien gegen HIV-1.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Konventionelle Behandlung der HIV-1 Infektion.....	9
1.2.2 RNA-Liganden als antivirale Moleküle.....	10
1.2.3 Peptidtherapeutika.....	13
<b>1.3 HIV-1 Genomverpackung .....</b>	<b>15</b>
1.3.1 Die Beteiligung der viralen RNA .....	15
1.3.2 Die Rolle des Gag-Proteins .....	17
1.3.3 Strukturelle Studien der Genomverpackung.....	18
1.3.4 Zusammenbau und Knospung viraler Partikel .....	21
1.3.5 Die $\Psi$ -RNA-NCp7-Interaktion als antivirales Ziel.....	22
1.3.5.1 RNA-Aptamere/Antisense-RNA/Ribozyme .....	22
1.3.5.2 Zinkfinger-Inhibitoren .....	23
1.3.5.3 Aminoglykoside .....	23
1.3.5.4 Peptide .....	24
<b>1.4 Die Phage Display Technologie .....</b>	<b>24</b>
<b>1.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung.....</b>	<b>26</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Geräte .....	27
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	28
2.1.3 Kits.....	29
2.1.4 Lösungen und Medien.....	29
2.1.5 Oligonukleotide .....	34
2.1.6 Plasmide und Vektorkarten.....	34

2.1.7	Generierte Konstrukte .....	37
2.1.8	Peptide .....	38
2.1.9	Enzyme.....	38
2.1.10	Antikörper .....	39
2.1.11	Rekombinante Proteine .....	39
2.1.12	Bakterien und Anzuchtbedingungen .....	39
2.1.13	Zellkulturmedien.....	40
2.1.14	Zelllinien .....	40
2.1.15	Generierte Zelllinien .....	41
2.1.16	HIV-1 Stämme .....	41
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>42</b>
2.2.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	42
2.2.2	Agarose Gelelektrophorese.....	42
2.2.3	Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden .....	42
2.2.4	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	43
2.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	44
2.2.6	Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i> .....	44
2.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	44
2.2.8	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .....	45
2.2.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	45
<b>2.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>46</b>
2.3.1	Auftauen und Einfrieren von Säugerzellen .....	46
2.3.2	Kultivierung von Säugerzellen.....	46
2.3.3	Retrovirale Vektoren .....	47
2.3.3.1	Verpackung lentiviraler Vektoren .....	48
2.3.3.2	Verpackung retroviraler Vektoren .....	49
2.3.4	Transiente Kalzium-Phosphat Transfektion von 293T-Zellen zur Produktion lentiviraler/gammaretroviraler Pseudoviren .....	50
2.3.5	Analyse der Viabilität transfizierter 293T-Zellen .....	51
2.3.6	FACS-Analysen .....	52
2.3.6.1	Titerbestimmung viraler Vektoren.....	52
2.3.6.2	Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	53
2.3.6.3	FACS-Analyse und Sortierung stabiler Peptid-exprimierender PM1-Zellen.....	54
2.3.6.4	Oberflächenantigenfärbung stabiler Peptid-exprimierender PM1-Zelllinien .....	54
2.3.7	ELISA zur Bestimmung der p24-Konzentration in Zellkulturüberständen .....	55

2.3.8	Semiquantitative PCR zum Nachweis viraler RNA in Zellkulturüberständen .....	55
2.3.8.1	Präparation viraler RNA aus Zellkulturüberständen.....	56
2.3.8.2	Umschreiben der viralen RNA in cDNA .....	56
2.3.8.3	Durchführung semiquantitativer PCRs .....	57
2.3.9	Detektion der HIV-1 Gag-Proteine mittels Western Blot.....	58
2.3.10	CLSM-Untersuchungen.....	59
2.3.10.1	Zellfärbung zur Lokalisation der Peptid-RFP-Fusionproteine .....	59
2.3.10.2	Zellfärbung zur Lokalisation Rhodamin-konjugierter Peptide .....	60
2.3.11	Generierung stabiler Peptid-exprimierender T-Zelllinien.....	60
2.3.12	HIV-Infektion stabiler Peptid-exprimierender PM1-Zelllinien.....	61
2.3.13	Analyse der antiviralen Aktivität Rhodamin-konjugierter Peptide .....	62
2.3.13.1	Infektionstest mit HIV-1 <sub>LAI</sub> .....	62
2.3.13.2	Titerbestimmung auf TZM-bl Zellen .....	62
2.3.13.3	Transduktion infizierter P4.R5 MAGI-Zellen mit Peptiden .....	63
2.3.13.4	Zytotoxizitätstest Peptid-behandelter P4.R5 MAGI- und TZM-bl-Zellen.....	64
2.3.13.5	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in infizierten P4.R5 MAGI-Zellen.....	65
2.3.14	Analyse der virolytischen Aktivität Rhodamin-konjugierter Peptide .....	66
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>Optimierung selektierter Peptidliganden.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2</b>	<b>Bindungseigenschaften des optimierten HKWPWW-Peptids .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3</b>	<b>Expression des HKWPWW-Peptids in Fusion mit RFP über transiente Transfektion .....</b>	<b>68</b>
3.3.1	Assay zur Testung der antiviralen Aktivität des HKWPWW-Peptids .....	68
3.3.2	Titration der Plasmide zur Produktion pseudotypisierter Lentiviren.....	69
3.3.3	Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Transfektionseffizienz .....	72
3.3.4	Quantifizierung der Transfektionseffizienz über FACS-Analyse .....	73
3.3.5	Expressionsraten der Fusionsproteine .....	75
3.3.6	Intrazelluläre Lokalisation des HKWPWW-RFP-Proteins.....	76
3.3.6.1	Zellmembranfärbung mit ConcanavalinA-Alexa Fluor 488 .....	78
3.3.6.2	Zellkernfärbung mit TO-PRO <sup>®</sup> -3.....	79
3.3.7	Analyse der Viabilität transfizierter 293T-Zellen .....	79
3.3.8	Einfluss des HKWPWW-RFP-Proteins auf die Entstehung infektiöser Viren .....	80
3.3.9	Beeinflussung der Virusproduktion durch das HKWPWW-RFP-Protein.....	82
3.3.10	Quantifizierung von viraler RNA in Viruspartikeln .....	86

3.3.11	Expression der HIV-1 Gag-Proteine in transfizierten 293T-Zellen.....	88
3.3.12	Produktion von Gammaretroviren in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins .....	92
<b>3.4</b>	<b>Etablierung stabiler Peptid-exprimierender T-Zelllinien .....</b>	<b>95</b>
3.4.1	Expressionsraten stabiler Peptid-exprimierender T-Zelllinien.....	95
3.4.2	HIV-Replikation in stabilen Peptid-exprimierenden T-Zelllinien.....	97
3.4.3	Expression der CD4/CXCR4-Rezeptoren auf Peptid-exprimierenden T-Zelllinien .....	99
<b>3.5</b>	<b>Transduktion des HKWPWW-Peptids über eine Proteintransduktionsdomäne.....</b>	<b>100</b>
3.5.1	Etablierung eines funktionellen Assays zur Testung der inhibitorischen Eigenschaften des HKWPWW-Peptids .....	101
3.5.2	Zelluläre Aufnahme von Peptiden in P4.R5 MAGI-Zellen .....	104
3.5.3	Untersuchung der Zytotoxizität von Peptiden.....	106
3.5.4	Testung der antiviralen Wirksamkeit des HKWPWW-Peptids .....	108
3.5.4.1	Hemmung der HIV-1 Produktion in P4.R5 MAGI-Zellen .....	108
3.5.4.2	Inhibition der frühen Replikationsschritte von HIV-1 .....	111
3.5.4.3	Virolytische Aktivität des HKWPWW-Peptids .....	113
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>116</b>
<b>4.1</b>	<b>Bindungscharakteristika des optimierten HKWPWW-Peptids.....</b>	<b>117</b>
<b>4.2</b>	<b>Expression des HKWPWW-Peptids in Fusion mit RFP über transiente Transfektion .....</b>	<b>119</b>
4.2.1	Transfektionseffizienz und Expression der Peptid-RFP-Proteine.....	120
4.2.2	Einfluss des HKWPWW-RFP-Proteins auf die Produktion lentiviraler Pseudoviren .....	122
4.2.3	Untersuchung des RNA-Gehalts lentiviraler Pseudoviren.....	125
4.2.	Expression der HIV-1 Gag-Proteine in Pseudoviren-produzierenden Zellen .....	126
4.2.5	Einfluss des HKWPWW-RFP-Proteins auf die Herstellung gammaretroviraler Pseudoviren .....	127
<b>4.3</b>	<b>HIV-Replikation in stabilen Peptid-exprimierenden T-Zelllinien.....</b>	<b>129</b>
<b>4.4</b>	<b>Transduktion des HKWPWW-Peptids über eine Proteintransduktionsdomäne .....</b>	<b>131</b>
<b>4.5</b>	<b>Wirkmechanismus des HKWPWW-Peptids .....</b>	<b>134</b>

<b>4.6</b>	<b>Abschließende Betrachtungen und Ausblick.....</b>	<b>138</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>140</b>
<b>5.1</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>140</b>
<b>5.2</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen .....</b>	<b>159</b>
5.2.1	Publikationen .....	159
5.2.2	Posterpräsentationen .....	159
5.2.3	Vorträge .....	160
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>161</b>

## Zusammenfassung

Im Laufe der vergangenen Jahre hat die Identifizierung von Peptidleitstrukturen in der Wirkstoffentwicklung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Phage Display Technologie ist eine Methode, welche zur Selektion von inhibitorischen Peptiden weit verbreitet ist. Prinzipiell eignet sich dieser Ansatz auch für die Suche nach neuen Leitstrukturen für die Therapie der HIV-Infektion, welche in hochspezifische und -regulierte Schritte im HIV-Replikationszyklus eingreifen sollen. Bei der Verpackung viraler RNA in neu entstehende Virionen handelt es sich um einen Prozess, welcher auf der gezielten Erkennung der dreidimensionalen Struktur der  $\Psi$ -Region am 5'-Ende ungespleißter, viraler RNA durch die NCp7-Domäne des Gag<sup>p55</sup>-Vorläuferproteins basiert. Darüber hinaus partizipiert das NCp7-Protein noch an der Reversen Transkription der HIV-RNA sowie an der Integration proviraler DNA und spielt somit eine zentrale Rolle im HIV-1 Replikationszyklus.

In vorangegangenen Arbeiten konnten wir mittels der Phage Display Technologie Peptidliganden für die HIV-1  $\Psi$ -RNA selektieren, welche die  $\Psi$ -RNA-NCp7-Interaktion hemmten und in Folge dessen die Verpackung viraler RNA verhindern sollten. Die Bindung der identifizierten tryptophanreichen Peptide an die  $\Psi$ -RNA konnte zwar zum Teil *in vitro* mit NCp7 kompetitiert werden, jedoch wiesen die Peptide eine relativ geringe Affinität für die  $\Psi$ -RNA auf. Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit stand nach Optimierung der Affinität eine umfassende funktionelle Charakterisierung der Peptide hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität *in vitro*. Zunächst gelang es mittels Spot-Synthese-Membranen die Affinität der  $\Psi$ -RNA-bindenden Peptide um etwa das 30-fache zu verbessern. Der  $K_D$ -Wert des optimierten HKWPWW-Peptids lag bei 1,1  $\mu\text{M}$  für ein Teilelement der  $\Psi$ -RNA, das allein über Verpackungsaktivitäten verfügt. Die folgende Analyse der Bindungseigenschaften des HKWPWW-Peptids an die  $\Psi$ -RNA über NMR und Fluoreszenz-Spektroskopie offenbarte, dass das Peptid über die hydrophoben Aminosäuren an eine charakteristische Schleifenregion in der Sekundärstruktur der  $\Psi$ -RNA bindet, ähnlich wie der natürliche Ligand NCp7. Gestützt auf diese Ergebnisse, wurde im Hauptteil des Projekts untersucht, ob das HKWPWW-Peptid in der Lage ist, die Verpackung viraler RNA in HI-Virionen zu hemmen. Hierfür erfolgte die Etablierung diverser Testsysteme, welche die intrazelluläre Expression des Peptids ermöglichten. Die Expression von HKWPWW in Fusion mit RFP in Pseudoviren-produzierenden Zellen über transiente Transfektion führte in der höchsten getesteten DNA-Konzentration (2,5  $\mu\text{g}$ ) zu einer 95%igen Reduktion des infektiösen Titers. Dieser inhibitorische Effekt war spezifisch für lentivirale Pseudoviren, da die

Produktion gammaretroviraler Pseudoviren nicht durch die Anwesenheit des Peptids beeinflusst wurde. Mittels einer stabilen HKWPWW-exprimierenden T-Zelllinie gelang es nachzuweisen, dass das Peptid sogar in der Lage ist, replikationskompetentes HIV über einen Zeitraum von fünf Tagen zu hemmen. Die Synthese des HKWPWW-Peptids in Fusion mit einer Proteintransduktionsdomäne ermöglichte die direkte Behandlung von HIV-infizierten Zellen und führte zu einer verminderten Freisetzung infektiöser HI-Viren in die Zellkulturüberstände. Dabei lagen die  $IC_{50}$ - und  $IC_{90}$ -Werte des HKWPWW-Peptids nach zweimaliger Peptidzugabe bei 5, 7 bzw. 28,6  $\mu$ M.

Eine in der Literatur oftmals beschriebene Beobachtung ist, dass bei einer reinen Hemmung der HIV-Verpackung Viren entstehen, welche keine virale RNA enthalten. Das Phänomen war in Anwesenheit des HKWPWW-Peptids wenig ausgeprägt wie Korrelationen von p24-Antigen-ELISA und die Quantifizierung viraler RNA in Viruspartikeln zeigten. Diese Gegebenheit sowie das Wissen über die mannigfaltigen Funktionen des NCp7-Proteins im HIV-Replikationszyklus ließen vermuten, dass HKWPWW noch zusätzlich andere Schritte im HIV-Replikationszyklus hemmen könnte. Unterstützt wurde diese Annahme dadurch, dass HKWPWW Ähnlichkeiten zu der hydrophoben Plattform von NCp7 aufweist, welche essentiell für die Verpackung viraler RNA sowie die Reverse Transkription ist. Damit in Einklang steht, dass neben einer Bindung an die  $\Psi$ -RNA auch eine schwächere Interaktion des HKWPWW-Peptids mit den viralen TAR- und PBS-Strukturen nachgewiesen werden konnte. Die auch beobachtete Hemmung der frühen HIV-Replikationsschritte durch HKWPWW könnte somit mit einer möglichen Hemmung der Transkription viraler Gene, der Reversen Transkription oder Integration erklärt werden.

Jedoch zeigte die elektronenmikroskopische Analyse, dass nicht nur weniger Viren in Anwesenheit des HKWPWW-Peptids entstehen, sondern dass diese zum Teil einen weniger kondensierten Kern aufweisen. Dies kann als ein Anhaltspunkt angesehen werden, dass HKWPWW tatsächlich auch auf der Ebene der RNA-Verpackung bzw. der viralen Partikelentstehung einen hemmenden Effekt ausübt. Somit resultiert die beobachtete antivirale Aktivität des HKWPWW-Peptids vermutlich aus kombinierten inhibitorischen Effekten auf mehreren Ebenen der HIV-Replikation.



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Humane Immundefizienz Virus

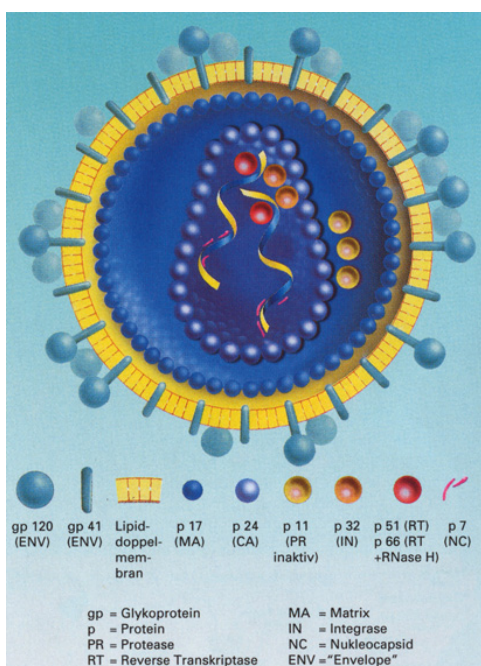
### 1.1.1 Klassifizierung

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV), welches die Krankheit AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) verursacht, ist Mitglied der Familie der Retroviren. Das diploide, 7-11 kb große, Genom der Retroviren liegt in Form von zwei einzelsträngigen RNA-Strängen mit positiver Polarität vor. Ferner ist für Retroviren der Besitz des Enzyms Reverse Transkriptase charakteristisch, welches ihnen ermöglicht die mitgeführte RNA als Zwischenprodukt in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Die Familie der *Retroviridae*, unterteilt sich in die drei Unterfamilien Onkoretroviren (Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilonretroviren), Lentiviren und Spumaviren. HIV gehört zur Gattung der Lentiviren, welche im Gegensatz zu Onkoretroviren, sehr effizient nicht-teilende Zellen infizieren können<sup>15,205</sup>.

### 1.1.2 Ursprung und Phylogenie von HIV

Die Immunschwächekrankheit AIDS wurde erstmals 1981 bei einer Gruppe homosexueller Männer mit schweren opportunistischen Infektionen beschrieben. Als Krankheitsverursacher wurden 1983 von zwei Arbeitsgruppen Retroviren isoliert und identifiziert. Das Virus wurde zunächst von Luc Montagnier am Institut Pasteur in Paris als LAV (lymphadenopathy associated virus) beschrieben<sup>16</sup>. In den USA wurde von Robert Gallo und dessen Mitarbeitern das Virus als HTLV-III (human T-lymphotropic virus III) bezeichnet<sup>97</sup>. 1985 ergaben schließlich genetische Analysen, dass die isolierten Viren zu der gleichen Retrovirenart gehörten, fortan wurde diese als HIV bezeichnet<sup>51</sup>.

Aus dem Menschen wurden sowohl HIV-1 als auch HIV-2 isoliert. HIV-1 und das aus Schimpansen isolierte SIV<sub>cpz</sub> (simian immunodeficiency virus) haben einen gemeinsamen Vorläufer. HIV-2, welches Verwandtschaft mit dem aus Makaken stammenden SIV<sub>mac</sub> zeigt, ist vermutlich weniger pathogen als HIV-1 und in seiner Ausbreitung hauptsächlich auf Westafrika beschränkt<sup>132,164,165</sup>.



**Abbildung 1.1:** Schematischer Aufbau eines HIV-1 Partikels: gp41 Glykoprotein, gp120 Glykoprotein, p17 Matrixprotein (MA), p24 Capsidprotein (CA), p7 Nucleocapsid (NC), p11 Protease (PR), p32 Integrase (IN), p51/p66 Reverse Transkriptase (RT) (aus: klinischer Leitfaden für HIV, Abbott GmbH).

Aufgrund von Sequenzunterschieden wird HIV-1 in die Gruppen M (major), O (outliner) und N (non-M, non-O) eingeteilt. Die Hauptgruppe M umfasst alle HIV-1-Stämme, welche für die Epidemie verantwortlich sind, in den Gruppen O und N sind divergente HIV-1-Isolate mit einer geringen Prävalenz zusammengefasst. Zurzeit unterteilt sich die Gruppe M in zehn Subtypen: A – H sowie J und K. Dabei herrscht Subtyp B in Europa und Amerika vor, während Subtyp A am häufigsten in Afrika und Osteuropa vorkommt. Viren mit dem Subtyp C sind für 50% aller HIV-1-Infektionen verantwortlich und hauptsächlich in Indien und Südafrika verbreitet.

HIV-2 wird aktuell in acht Gruppen eingeteilt (A - H)<sup>35,179,264</sup>. Auch am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt wurden durch die Arbeitsgruppe von H. Rüksamen-Waigmann eine Reihe von HIV-1 und HIV-2 Subtypen isoliert und sequenziert. Darunter

befand sich auch das erste aus deutschen Patienten isolierte HIV-1<sup>68,69,111,166,254</sup>.

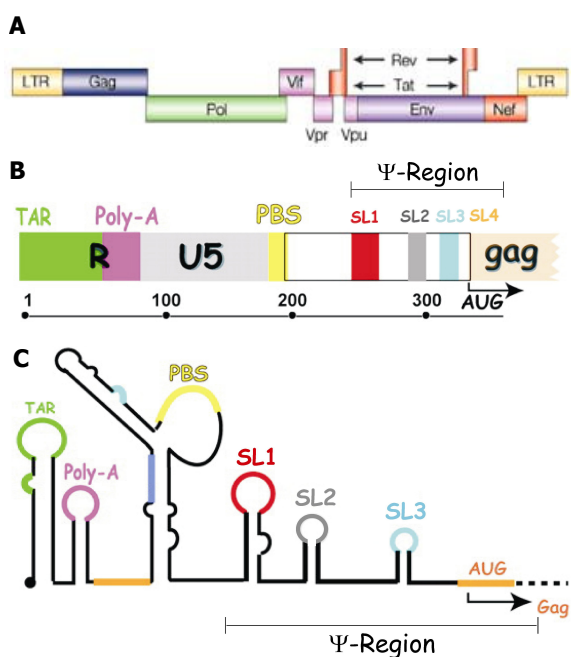
Die HIV-1 Epidemie, welche Anfang der 1980er Jahre in den Städten der USA sowie Zentralafrikas begann, hat sich weltweit ausgebreitet und sich in Ländern der sogenannten Dritten Welt (Afrika, Indien, Südostasien und Südamerika) zu einer Pandemie entwickelt<sup>252</sup>. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gab es 2007 weltweit 2,5 Millionen Neuinfektionen und insgesamt bereits 33,2 Mio. HIV-Infizierte.

### 1.1.3 Aufbau des Viruspartikels

Die infektiösen Partikel des HI-Virus weisen einen Durchmesser von etwa 100 nm auf. Dabei besteht die äußere Virushülle aus einer Phospholipiddoppelschicht, welche von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abstammt und Trimere der viralen Glykoproteine trägt (Abb. 1.1). Dabei ist das transmembrane Glykoprotein gp41 in der Membran verankert, während das Hüllglykoprotein gp120 nicht-kovalent mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des gp41 assoziiert ist<sup>93,205,305</sup>. Die Innenseite der Virushülle besteht aus Matrixproteinen (MA) p17, welche über N-terminale Myristylierungen mit der Lipid-

membran verbunden sind. Im Partikelinneren befindet sich das konisch geformte Viruskapsid, welches aus den Kapsidproteinen (CA) p24 besteht. Das Viruskapsid enthält zwei identische Moleküle einzelsträngiger, viraler RNA, welche dimerisiert vorliegen und von Nukleokapsidproteinen (NC) p7 komplexiert werden<sup>266,305</sup>. Darüber hinaus befinden sich innerhalb des Viruskapsids die Enzyme Reverse Transkriptase (RT) p51 mit RNaseH p66 und Integrase (IN) p32 sowie zwei Moleküle tRNA<sup>Lys</sup>, welche für die Initiation der reversen Transkription notwendig sind. Die funktionelle Reverse Transkriptase ist ein Heterodimer aus p51 und p66 und besitzt mehrere Aktivitäten: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und eine RNaseH-Aktivität. Die Integration doppelsträngiger HIV-DNA in das Wirtszell-Chromosom wird von der Integrase p32 katalysiert, welche als Endonuklease sowie als Ligase wirkt. Die außerhalb des Kapsids lokalisierte Protease (PR) p11 ist ein Homodimer, weist strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Aspartatproteasen auf und prozessiert die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine in ihre funktionellen Bestandteile. Des Weiteren verpacken Viruspartikel ebenfalls die akzessorischen Proteine Nef, Vif und Vpr<sup>91,92,205,305</sup>.

### 1.1.4 Organisation des Genoms



**Abbildung 1.2:** (A) Aufbau des HIV-1 Genoms (verändert nach<sup>233</sup>). (B) Aufbau des 5' LTR's im HIV-1 Genom (verändert nach<sup>227</sup>). (C) Sekundärstruktur des 5' LTR Bereichs in der viralen RNA (verändert nach<sup>227</sup>).

Das aus zwei (+)RNA-Molekülen bestehende HIV-1 Genom besitzt eine Größe von in etwa 9,7 kb und weist mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf. Am 5' sowie am 3'-Ende wird die HIV-1 RNA von nicht translatierten (U5 bzw. U3) und repetitiven Sequenzen (R) flankiert, die während der reversen Transkription dupliziert werden. Nach Integration der proviralen DNA werden diese Sequenzen als LTRs (long terminal repeat) bezeichnet, welche Promotorsequenzen und Enhancer-Elemente enthalten und die virale Genexpression kontrollieren (Abb. 1.2 A und B)<sup>44,147,233</sup>.

Am 5'-Ende der HIV-1 RNA schließt sich an die Cap-Struktur die R-Region an, welche sich am 3'-Ende des Transkripts wiederholt. Die R-Region enthält die TAR- und Poly(A)-Sequenzen, die in Form von Stemloop-Strukturen vorliegen (Abb. 1.2 C). Die Bindung des Tat-Proteins (Transactivator of viral transcription) an TAR (Tat-responsive RNA-element) verstärkt die virale Transkriptionsrate um mehr als das Hundertfache. Die sich der TAR-Struktur anschließende Poly(A)-Stemloop-Struktur enthält das Polyadylierungssignal (AAUAAA) und reguliert die Polyadenylierung viraler Transkripte am 3'-Ende, was die Stabilität der viralen RNA erhöht <sup>57,110,205,227,298</sup>.

Stromabwärts der U5-Region, welche der R-Region folgt, befindet sich die Primer Bindungsstelle (PBS). Diese Stemloop-Struktur weist Komplementarität zum 3'-Ende zellulärer tRNA<sup>Lys</sup> auf, welche als Primer für die Reverse Transkription fungiert <sup>93,301</sup>. Die Sequenzfolge zwischen der PBS und dem Beginn des *gag*-Leserasters wird als Leaderregion bezeichnet. Diese Region enthält das  $\Psi$ -Signal (auch  $\Psi$ -Region), welches für die Verpackung viraler Partikel essentiell ist (Abb. 1.2 C) (Kapitel 1.3) <sup>22,48,123,180</sup>.

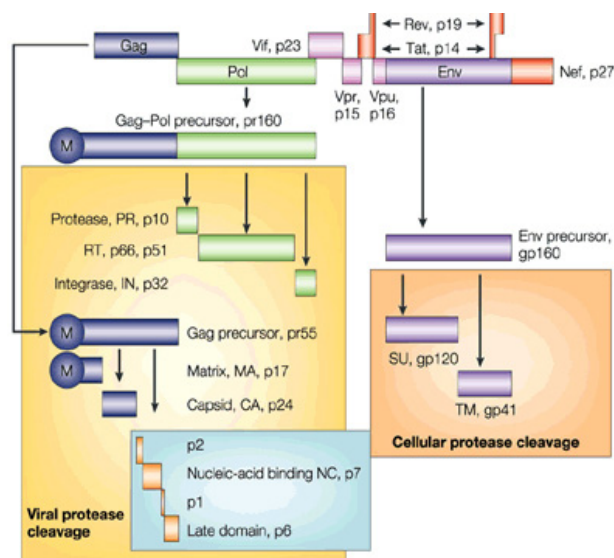
### 1.1.5 Virusproteine

Nach Integration in das Wirtszell-Chromosom enthält das HIV-Provirus offene Leseraster für 15 Proteine, welche von mehr als 30 mRNA Spezies translatiert werden und von einem primären Transkript abgeleitet sind. Die Verwendung überlappender Leseraster ermöglicht HIV, aus einem kleinem Genom eine große Vielfalt an genetischen Informationen zu erhalten. Die verschieden gespleißten mRNAs, werden dann zu den Vorläufern des Gag-, des Gag/Pol und des Env-Proteins sowie zu den regulatorischen und akzessorischen Proteinen translatiert <sup>91,233,325</sup>.

Die Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren für essentielle Enzyme und Vorläufer für strukturelle Proteine. Das *gag*-Gen kodiert für die Proteine Kapsid (CA, p24), Matrix (MA, p17), Nukleokapsid (NC, p7) sowie für das Linkerprotein p6. Diese Proteine werden als ein Vorläuferprotein p55<sup>Gag</sup> translatiert, das während des Reifungsprozesses der Virionen von der Protease in die einzelnen Bestandteile gespalten wird. Die Enzyme Reverse Transkriptase (RT, Dimer aus p51 und p66), Integrase (IN, p32) und Protease (PR, p11) werden von dem *pol*-Gen kodiert. Die Enzyme entstehen als ein Vorläuferprotein p160<sup>gag/pol</sup>, das durch eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters von der gleichen mRNA wie p55<sup>Gag</sup> translatiert wird. Das *env*-Gen kodiert für die viralen Hüllglykoproteine gp120 und

gp41 (Abb. 1.3). Die für gp120 kodierenden Sequenzen sind in unterschiedlichen HIV-Stämmen sehr variabel<sup>44,93,233</sup>.

Darüber hinaus enthält HIV-1 noch die beiden regulatorischen Proteine Tat (transactivator of viral transcription) und Rev (regulator of expression of viral proteins), welche für die Replikation *in vitro* essentiell sind. Tat interagiert mit zellulären Kinasen, wodurch die Pro-



**Abbildung 1.3:** HIV-1 Proteine. Die Pfeile unterhalb der Vorläuferproteine zeigen in die Richtung der Prozessierung zu reifen Proteinen (verändert nach<sup>233</sup>).

zessivität der RNA-Polymerase II während der Elongation der mRNA erhöht wird<sup>91,147,298</sup>. Das Rev-Protein bindet über die RNA-Struktur RRE (rev responsive element) an ungespleißte sowie an einfach gespleißte virale RNA und vermittelt deren Export in das Zytoplasma. Dadurch wird die Produktion von strukturellen Proteinen begünstigt, welche von ungespleißten und einfach gespleißten mRNAs kodiert werden. Zu den akzessorischen Proteinen gehören Nef (negative factor), Vif (viral infecti-

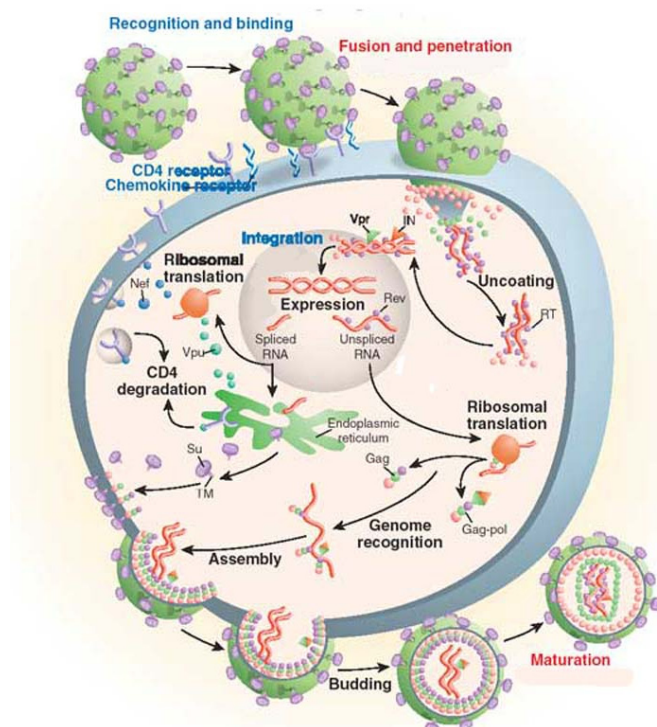
zessivität der RNA-Polymerase II während der Elongation der mRNA erhöht wird<sup>91,147,298</sup>.

zessivität der RNA-Polymerase II während der Elongation der mRNA erhöht wird<sup>91,147,298</sup>. Das Rev-Protein bindet über die RNA-Struktur RRE (rev responsive element) an ungespleißte sowie an einfach gespleißte virale RNA und vermittelt deren Export in das Zytoplasma. Dadurch wird die Produktion von strukturellen Proteinen begünstigt, welche von ungespleißten und einfach gespleißten mRNAs kodiert werden. Zu den akzessorischen Proteinen gehören Nef (negative factor), Vif (viral infecti-

### 1.1.6 Replikationszyklus

Die HIV-Infektion von Zellen wird als mehrstufiger Prozess beschrieben. Dabei wird zwischen der frühen und späten Phase der Infektion unterschieden. Die Infektion beginnt mit der hochaffinen Bindung des viralen Hüllglykoproteins gp120 an den CD4-Rezeptor von Zielzellen wie Makrophagen und T-Helferzellen. Daraufhin erfolgt eine Konformationsänderung des gp120, wodurch Bereiche von gp120 exponiert werden, die mit den Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 interagieren können. Daraus resultiert eine Konformationsänderung des viralen Transmembranproteins gp41, welches schließlich die Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran ermöglicht<sup>93,110,280,285</sup>. Nachfolgend wird das Viruskapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Im weiteren Verlauf der Infektion

wird das Viruskapsid aufgelöst und die Matrix- und Nukleokapsidproteine bilden mit der viralen RNA sowie den Enzymen Reverse Transkriptase und Integrase sowie dem akzessorischen Protein Vpr einen hochmolekularen Präintegrationskomplex. Währenddessen wird die virale ssRNA von der Reversen Transkriptase in dsDNA transkribiert. Die NLS-Sequenzen (nuclear localization signal) der Proteine Integrase, Matrix und Vpr ermöglichen dann den Transport des Präintegrationskomplexes in den Nukleus (Abb. 1.4). Anschließend katalysiert die virale Integrase die Integration der viralen dsDNA in das Wirtszellchromosom<sup>223,233,321</sup>. Dabei erfolgt die Integration präferentiell in der Nähe von aktiven Genen<sup>270</sup>.



**Abbildung 1.4:** Der HIV-1 Replikationszyklus (verändert nach<sup>235</sup>).

Die Transkription des integrierten HIV-1 Provirus durch die zelluläre RNA Polymerase II geht dann von Promotor- und Enhancersequenzen im 5'-LTR aus und wird am 3'-LTR terminiert. Für den Export der nicht- oder einfach gespleißten HIV-RNA Spezies aus dem Nukleus in das Zytoplasma ist das virale Protein Rev verantwortlich<sup>110,233,305,325</sup>. Die viralen Hüllglykoproteine werden als Vorläuferprotein gp160<sup>env</sup> im endoplasmatischen Retikulum translatiert und im Golgi-Apparat glykosyliert. Während des Transportes zur Zellmembran erfolgt die Spaltung von gp160 in gp120 und gp41. Ebenfalls zur Zellmembran transportiert werden die kotranslational myristylierten p55<sup>Gag</sup> und p160<sup>Gag/pol</sup> Vorläuferproteine. Die Modifikation mit Myristinsäure ist für die Membranbindung der Gag-Proteine notwendig, welche dort mit den Hüllglykoproteinen akkumulieren. Das p55<sup>Gag</sup>-Protein assoziiert im Zytoplasma über die NCp7-Domäne mit dem Verpackungssignal  $\Psi$ , das in ungespleißter viraler RNA enthalten ist, mit zwei genomischen RNA-Molekülen (Abb.1.4). Nach dem Transport der regulatorischen und akzessorischen viralen Proteine wird der Prozess des Zusammenbaus viraler Partikel abgeschlossen. Die Knospung und Freisetzung unreifer viraler Partikel von der Zellmembran wird von spezifischen Gag-Domänen sowie zellulären Faktoren vermittelt. Die Reifung zu infektiösen Viren erfolgt schließlich durch Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine mittels der viralen Protease<sup>44,93,206,280</sup>.



## 1.2 Therapeutische Strategien gegen HIV-1

### 1.2.1 Konventionelle Behandlung der HIV-1 Infektion

Der Replikationszyklus von HIV bietet mehrere Angriffspunkte zur antiviralen Intervention, beispielsweise den HIV-Eintritt, die Reverse Transkription und Integration sowie die Prozessierung der Vorläuferproteine durch die Protease<sup>59,221,235</sup>.

Zur Therapie der HIV-Infektion wurden eine Reihe von Substanzen entwickelt, welche auf eine Senkung der Viruslast sowie auf die Rekonstitution des Immunsystems abzielen.

Derzeit stehen zur Behandlung 25 zugelassene Medikamente aus mehreren Wirkstoffklas-

sen zu Verfügung (Abb. 1.5). Der HIV-

Eintritt in Zielzellen kann durch das seit 2003 zugelassene antivirale Peptid Enfuvirtide (T-20) unterbunden werden, das die Konformationsänderung des Transmembranproteins gp41 und somit die Fusion der viralen und zellulären Membran verhindert<sup>87,170</sup>. Zur

Inhibition der Reversen Transkriptase stehen Nukleosidanaloga (z.B. Azidothymidin, Lamivudin) sowie Nicht-nukleosidische Inhibitoren (z.B. Nevirapin, Efavirenz) zur Verfügung. Nach Einbau der Nukleosidanaloga in die cDNA, wird die reverse Transkription

abgebrochen, während Nicht-nukleosidischen Substanzen das aktive Zentrum der Reversen Transkriptase

Handelsname	Abk.	Substanzname	Hersteller	Jährliche Kosten
<b>Nukleos(t)idische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)</b>				
Combivir®	CBV	AZT+3TC	GSK	7.530
Emtriva®	FTC	Emtricitabin	Gilead	3.563
Epivir®	3TC	Lamivudin	GSK	3.563
Kivexa®	KVX	3TC+ABC	GSK	8.574
Retrovir®	AZT	Zidovudin	GSK	3.967
Trizivir®	TZV	AZT+3TC+ABC	GSK	13.540
Truvada®	TVD	FTC+TDF	Gilead	9.121
Videx®	DDI	Didanosin	BMS	3.994
Viread®	TDF	Tenofovir	Gilead	5.673
Zerit®	D4T	Stavudin	BMS	3.578
Ziagen®	ABC	Abacavir	GSK	5.011
<b>Non-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)</b>				
Rescriptor®	DLV	Delavirdin	Pfizer	nur als Import
Sustiva®	EFV	Efavirenz	BMS	4.984
Viramune®	NVP	Nevirapin	Boehringer-Ingelheim	4.885
<b>Protease-Inhibitoren (PIs)</b>				
Aptivus®	TPV	Tipranavir*	Boehringer-Ingelheim	14.133
Agenerase®	APV	Amprenavir*	GSK	5.009
Crixivan®	IDV	Indinavir*	MSD	4.258
Invirase 500®	SQV	Saquinavir*	Roche	8.150
Kaletra®	LPV	Lopinavir/ Ritonavir	Abbott	8.438
Norvir®	RTV	Ritonavir**	Abbott	1.312
Prezista®	DRV	Darunavir	Tibotec	10.550
Reyataz®	ATV	Atazanavir*	BMS	9.094
Telzir®	FPV	Fosamprenavir*	GSK	8.172
Viracept®	NFV	Nelfinavir	Roche/Pfizer	6.155
<b>Fusionsinhibitoren</b>				
Fuzeon®	T-20	Enfuvirtide	Roche	24.100

Jährliche Therapiekosten in Deutschland (in Euro, nach Roter Liste 2006)

\*Angaben inklusive der empfohlenen Ritonavir-Boosterung (100-400 mg Norvir®)

\*\*Booster-Dosis

**Abbildung 1.5:** Antiretrovirale Medikamente. Im Jahr 2007 waren zur Behandlung der HIV-Infektion 25 Medikamente aus vier Wirkstoffklassen zugelassen (verändert nach<sup>134</sup>).

hemmen. Als Inhibitoren der Protease werden peptidähnliche Hemmstoffe (z.B. Ritonavir, Lopinavir) eingesetzt, welche die Aktivität der viralen Protease inhibieren<sup>58,115,235,316</sup>.

Seit 1995 werden Inhibitoren der Reversen Transkriptase sowie der Protease zur hoch aktiven antiretroviralen Therapie HAART (highly active antiretroviral therapy) miteinander kombiniert. Diese Therapie ermöglicht eine Reduzierung der viralen Last, wodurch die Lebenserwartung HIV-Infizierter angestiegen ist<sup>118</sup>. Kritisch ist jedoch, dass die o.g. Inhibitoren auf HIV einen starken Selektionsdruck ausüben, so dass es zur Resistenzentwick-

lung kommt. Da die Reverse Transkriptase keine Korrekturleseaktivität besitzt, werden pro Replikationszyklus mit einer Wahrscheinlichkeit von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  falsche Basen in die neu-synthetisierte cDNA eingebaut. Unter Therapie werden diese Mutationen selektiert und die resistenten HIV-Varianten können sich ungehemmt vermehren und weitergegeben werden<sup>93,235</sup>. Es ist daher auch heute noch notwendig, neue Therapieansätze zu entwickeln und pharmazeutische Wirkstoffe zu identifizieren, welche sich gegen konservierte Strukturen von HIV richten, wie z.B. nicht-kodierende Bereiche der viralen genomischen RNA, die für die Replikation essentiell sind<sup>207</sup>.

HIV kontrolliert beispielsweise die Genexpression über die Interaktion strukturierter RNA-Elemente mit regulatorischen Proteinen. Dazu gehören die Protein-RNA Wechselwirkungen von Tat-TAR und Rev-RRE. Die Verpackung viraler RNA basiert auf einer spezifischen Interaktion zwischen NCp7 und dem Verpackungssignal  $\Psi$ . Diese RNA-Protein-Wechselwirkungen bieten somit einen Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer antiviraler Substanzen<sup>42,231</sup>.

### 1.2.2 RNA-Liganden als antivirale Moleküle

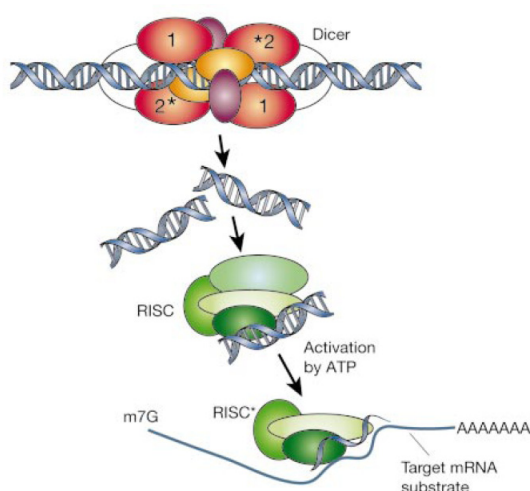
RNA besitzt die Fähigkeit, komplexe dreidimensionale Strukturen auszubilden und darüber spezifische Bindungen mit einem anderen Molekül einzugehen. Des Weiteren spielt RNA eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl biochemischer Prozesse, welche auf RNA-Protein-Wechselwirkungen beruhen. So wird RNA als funktionelles Element des Spleißosoms und des Ribosoms mit katalytischen Eigenschaften angesehen. Auch die Genexpression wird über RNA-Protein-Wechselwirkungen kontrolliert<sup>219,231</sup>.

In der Vergangenheit zielten pharmazeutische Wirkstoffe meist auf Proteine ab, da für das Design von Wirkstoffen Molekülstrukturen benötigt werden und diese in erster Linie von Proteinen vorlagen. Das Design therapeutisch wirksamer RNA-Liganden war aufgrund fehlender struktureller Informationen über RNA sowie RNA-Protein-Wechselwirkungen zurückgeblieben. In den letzten Jahren führten der technische Fortschritt in der Synthese und Strukturbestimmungen von RNA dazu, dass die Zahl der publizierten RNA-Strukturen stark anstieg<sup>128</sup>. Die Entwicklung neuer kombinatorischer Verfahren wie z.B. SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) oder die Phage Display Technologie ermöglichen die Selektion und Identifikation von zahlreichen RNA-Liganden mit teilweise therapeutischen Potenzial<sup>42</sup>. Auf das Prinzip der Phage Display Technologie wird in Kapitel 1.4 näher eingegangen.



Mittels des SELEX-Verfahrens werden aus einer Bibliothek von RNA-Sequenzen RNA-Aptamere selektiert, welche hochspezifisch an Proteine und andere Moleküle binden und diese inhibieren können<sup>199,292</sup>. Ein Beispiel für ein therapeutisch wirksames Aptamer ist das seit Ende 2004 zugelassene Therapeutikum Macugen<sup>®</sup>, das zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) eingesetzt wird. Das selektierte RNA-Aptamer bindet an eine bestimmte Isoform des Wachstumsfaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) und verhindert dessen Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor. Dies resultiert in einer effektiven Hemmung der Angiogenese, welche bei der AMD pathologisch verstärkt ist<sup>222,312</sup>. Der *in vitro* Selektion von Aptameren liegt das Wirkungsprinzip von RNA-Decoys zugrunde. Diese Moleküle kompetieren mit einem natürlichen Liganden und schalten somit das Protein aus. So führt z.B. die Expression von TAR- sowie RRE-Decoys zur kompetitiven Inhibition der Tat-/Rev-Proteinfunktionen, sowie zur nachfolgenden HIV-1 Replikationshemmung<sup>9,290,291</sup>.

Dass auch natürlich vorkommende kleine Moleküle als RNA-Liganden therapeutisch wirksam sein können, zeigen Aminoglykoside. Diese niedermolekularen Substanzen binden selektiv und spezifisch an RNA<sup>125</sup>. So bestehen Aminoglykosidantibiotika wie z.B. Streptomycin oder Neomycin aus glykosidisch miteinander verbundenen Aminoazuckern. Die Bindung der Aminoglykoside an die 16S rRNA in bakteriellen Ribosomen führt zum Abbruch der Proteinsynthese. Dabei binden Aminoglykoside hoch spezifisch an eubakterielle 16S rRNA, welche sich lediglich durch einen Basenaustausch von eukaryotischer rRNA unterscheidet<sup>127</sup>.



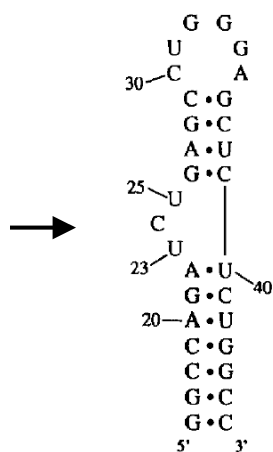
**Abbildung 1.6:** Modell der RNA-Interferenz. Das Enzym Dicer initiiert RNAi durch Spaltung von doppelsträngiger RNA in siRNAs, welche dann in den Enzymkomplex RISC eingebaut werden. Der aktivierte RISC-Komplex verwendet dann den „Guide“-Strang zur Erkennung der mRNA-Substrate (verändert nach<sup>119</sup>).

Im Rahmen einiger Studien konnte ebenfalls eine Bindung von Aminoglykosiden an virale RNA-Strukturen nachgewiesen werden. Neomycin inhibiert beispielsweise die Bindung des HIV-1 Tat-Proteins an die TAR-RNA sowie die Bindung des Rev-Proteins an die RRE-RNA<sup>167,319</sup>. Es wurde jedoch ebenfalls gezeigt, dass Aminoglykosidderivate zwar eine hohe Affinität für RNA aufweisen, jedoch wenig sequenzspezifisch an RNA binden<sup>141,193</sup>. Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen durch doppelsträngige RNA induzierten Mechanismus, welcher in der sequenzspezifischen Degradation von mRNA resultiert (Abb. 1.6). Zunächst wird die doppelsträngige

RNA von der RNase Dicer in 21 bis 23 nt lange siRNA-Fragmente prozessiert, welche dann in Nuklease-Komplex RISC (RNA-induced silencing complex) eingebaut werden. Anschließend erfolgt die Spaltung des „Sense“-Stranges und der aktivierte RISC-Komplex enthält nun den „Guide“-Strang, welcher an die komplementäre mRNA-Sequenz bindet. Dies resultiert dann in einer Spaltung der mRNA durch den RISC-Komplex. Das Ziel einer auf RNAi basierenden Therapie ist, den selektiven mRNA-Abbau zu aktivieren und somit die Expression eines bestimmten Gens zu hemmen. Hierfür eignen sich zum einen shRNAs (short hairpin RNAs), welche von einem viralen Vektor exprimiert werden. Zum anderen können auch synthetische siRNAs (small interfering RNAs) direkt in das Zytoplasma eingebracht werden<sup>60,119</sup>. Auch für therapeutischer Ansätze gegen HIV hat RNAi an Bedeutung gewonnen. So resultiert die Anwendung von shRNA oder siRNAs, welche gegen die Leaderregion, Gag/Pol, Tat/Rev, Nef oder Vif gerichtet sind in einer Hemmung der HIV-Replikation<sup>12,27,143,176</sup>.

Synthetische Oligonukleotide, Antisense-RNA und Ribozyme bilden eine weitere Gruppe therapeutisch wirksamer RNA-Liganden. Synthetische Oligonukleotidanaloga binden an die Ziel-RNA und blockieren deren Funktion sterisch<sup>142</sup>. Dazu zählen auch sogenannte Peptid-Nukleinsäuren (PNA, peptide nucleic acids). Dabei konnte bereits von zwei Arbeitsgruppen eine antivirale Aktivität dieser PNA nachgewiesen werden: Gegen die TAR-RNA gerichtete PNA hemmen die HIV-1 Transaktivierung und PNAs, welche auf die PBS-RNA abzielen, zeigen HIV-1 inhibitorische Eigenschaften<sup>302,306</sup>. Antisense-RNA und Ribozyme binden an komplementäre Sequenzabschnitte auf einer RNA. Dabei wird die Translation durch Antisense-RNA sterisch blockiert, während Ribozyme die Ziel-RNA spalten, welche dann abgebaut wird. Studien mit Ribozymen sowie Antisense-RNA, welche gegen die HIV-1 *env*-RNA sowie das erste Tat/Rev Exon gerichtet sind, resultieren in einer Hemmung der HIV-1 Replikation<sup>41,75,187,274</sup>.

Neben RNA besitzen auch Peptide und Proteine als RNA-Liganden ein therapeutisches Potenzial (Kapitel 1.2.3). Eine Vielzahl RNA-bindender Peptide sind stark basisch geladen und enthalten häufig die Aminosäure Arginin (ARM, arginine-rich motifs). In Abwesenheit eines Liganden sind Peptide meist unstrukturiert und weisen erst nach RNA-Bindung eine definierte Struktur auf. Diese, auch als „induced fit“ bezeichnete, konformelle Änderung resultiert in der Stabilisierung des Peptid-RNA-Komplexes, welcher dann eine bestimmte biologische Funktion vermittelt<sup>90,231,322,324</sup>. Dass die Peptid-RNA-Interaktion häufig auch auf einer elektrostatischen Komponente beruht zeigt z.B. die Bindung des argininreichen Tat-Proteins an die Bulge-Region der TAR-RNA (Abb. 1.7)<sup>77,90</sup>. Diese Interaktion kann durch Zugabe eines, von dem natürlichen Tat-Protein abgeleiteten, Peptids (Tat10) sowie durch ein Tripeptid mit der Sequenz [(L)Lys-(D)Lys-(L)Asn] verhindert werden<sup>43,140</sup>.



**Abbildung 1.7:** Sekundärstruktur der HIV-1 TAR-RNA. Die mit dem Tat-Protein interagierende Bulge-Region ist durch einen Pfeil angedeutet (verändert nach <sup>231</sup>).

Ferner hemmen Tripeptide, welche aus nicht-natürlichen Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten bestehen, die Tat/TAR-abhängige Genexpression und führen sogar zu einer Inhibition der HIV-Replikation <sup>192</sup>. Eine weitere Klasse von DNA- und RNA-bindenden Proteinen stellen die Zinkfinger-Motive dar, welche aus einer  $\alpha$ -Helix und einem  $\beta$ -Faltblatt bestehen. Die für Zinkfinger-Motive charakteristische Cys- und His-reichen Domänen chelatieren ein Zinkion, das die Proteinstruktur stabilisiert. Eine Einteilung in verschiedenen Unterklassen erfolgt anhand der Kombinationen der zinkbindenden Aminosäuren (z.B. CCHH-, CCCH oder CCHC Zinkfinger) <sup>90,194</sup>. So zählt z.B. das für die Verpackung viraler Partikel verantwortliche HIV-1 NCp7-Protein zu den CCHC Zinkfingern <sup>109,293</sup>.

### 1.2.3 Peptidtherapeutika

Obwohl es schon seit mehr als 40 Jahren möglich ist, Peptide chemisch zu synthetisieren, befinden sich bis heute nur wenige therapeutische Peptide in klinischer Anwendung. Schwierigkeiten in der Bioverfügbarkeit, in der Stabilität und in der Synthese der Peptide haben eine Kommerzialisierung erschwert. In den letzten Jahren ist jedoch aufgrund der Screening- und Optimierungsmöglichkeiten von Peptiden, die Anzahl der Peptide als Kan-

Product	Manufacturer	Year approved in USA	Indication(s)
Humulin®	Lilly	1994	Diabetes
Humalog® (human insulin)		1996	
Lupron® (leuprolide)	TAP Pharmaceuticals	1985	Prostate tumor, endometriosis, fibrosis, precocious puberty
Zestril®	AstraZeneca	1988	Hypertension
Prinivil® (lisinopril)	Merck	1987	Congestive heart failure
Zoladex® (goserelin)	AstraZeneca	1989	Breast cancer, prostate cancer, endometriosis
Sandostatin® (octreotide)	Novartis	1988	Acromegaly, diarrhea
Miacalcin® (calcitonin)	Novartis	1991	Hypercalcemia, osteoporosis, Pagets disease
Integrilin® (eptifibatide)	Millenium	1998	Angina, myocardial infarction
Natrecor® (nesiritide)	Scios	2001	Congestive heart failure
Angiomax® (bivalirudin)	Medicines Company	2000	Angina

**Abbildung 1.8:** Auswahl einiger peptidbasierender Medikamente auf dem US-Markt 2003 (verändert nach <sup>168</sup>).

didaten für klinische Anwendungen stark angestiegen. So ermöglichten z.B. die zunehmende Anwendung von Phage Display Peptidbanken sowie anderer kombinatorischer Peptid Banken die Identifizierung und Evaluierung therapeutischer Peptide. Neben dem HIV-1 Medikament Enfuvirtide befan-

den sich im Jahr 2003 bereits weitere Peptide zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen sowie Krebs auf dem US-Markt (Abb. 1.8)<sup>29,168,172,185</sup>.

Bei den meisten zugelassenen Peptidtherapeutika handelt es sich um Agonisten, welche nur in geringen Mengen benötigt werden um z.B. einen Zielrezeptor zu aktivieren. Zur Behandlung von Krebs oder viralen Infektionen steht die Suche nach antagonistischen Peptidliganden im Vordergrund, welche durch Konkurrenz mit dem natürlichen Liganden z.B. die Aktivierung eines Rezeptors verhindern. Voraussetzungen hierfür sind eine hohe Affinität, Spezifität und Stabilität. Kleine unstrukturierte Peptide können bereits innerhalb von fünf Minuten proteolytisch degradiert sein. Jedoch ermöglichen eine Vielzahl von Modifikationen wie z.B. PEGylierungen, Acetylierungen, Glykosylierungen sowie der Einbau unnatürlicher Aminosäuren eine Erhöhung der Stabilität<sup>168,172,185,265</sup>. Für Peptide, welche auf intrazelluläre Zielstrukturen abzielen, stellt der Transport über die Zellmembran eine weitere Schwierigkeit dar. Aufgrund der hydrophoben Natur der Plasmamembran ist diese impermeabel für hydrophile Makromoleküle. Jedoch besitzen einige, natürlich auftretende, kationische Peptide mit basischen Aminosäuren oder einem hohen Prolin-Gehalt, die Eigen-

CPP	Sequence in single-letter amino acid code
<b>Protein-derived peptides</b>	
Tat	GRKKRRQRRRPPQ <sup>a</sup>
Penetratin (Antp)	RQIKIWFQNRRMKWKK
VP22	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRV
<b>Amphipathic peptides (secondary and primary)</b>	
MAP	KLALKLALKALKAAALKLA
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
Transportan-10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL
KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKACEA
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV

<sup>a</sup> One selected fragment from the Tat family. aa, amino acids.

**Abbildung 1.9:** Auswahl einiger zellpenetrierender Peptide (verändert nach<sup>265</sup>).

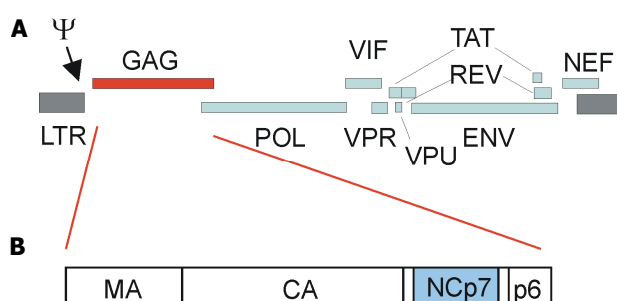
schaft die Lipiddoppelschicht zu überqueren. Auch synthetische Peptide mit amphipathischen Charakter sind membranpermeabel. Diese zellpenetrierenden Peptide (CPP, cell penetrating peptides) oder Proteintransduktionsdomänen (PTD) überqueren die Zellmembran und können dabei ein hydrophiles Cargomolekül transportieren. Zur Zeit werden CPPs in zwei Klassen eingeteilt (Abb. 1.9). So enthalten Penetratin und Tat, welche von natürlichen Proteinen abstammen, hauptsächlich Arginine während sich Transportan und amphipathische Peptide durch den Besitz eines hohen Lysinanteils auszeichnen. Im Rahmen einer Reihe von Studien wurden mittels CPPs biologisch aktive Nucleinsäuren, Peptide, Proteine sowie Antikörper in eine Vielzahl von Zelltypen transportiert<sup>195,213,265</sup>. Jedoch konnte der genaue Transportmechanismus der CPPs bislang nicht vollständig geklärt werden. Hierzu existieren einige kontroverse Studien. So wird zum einen ein rezeptor- sowie energie-unabhängiger Transport diskutiert, jedoch konnte zum anderen auch ein endozytotischer Aufnahmemechanismus gezeigt werden. Vermutlich existieren verschiedene Transport-Mechanismen abhängig von dem jeweiligen CPP, der Zelllinie sowie dem Cargo-Molekül<sup>66,70,126,265</sup>.

## 1.3 HIV-1 Genomverpackung

Die Erkennung viraler RNA-Genome stellt einen kritischen Schritt während des Zusammenbaus retroviraler Partikel dar. Während dieses Vorgangs, welcher auf RNA-Protein-Wechselwirkungen beruht, wird selektiv aus einer Unzahl von gespleißten, viralen RNAs und zellulären mRNAs, die ungespleißte, virale genomische RNA ausgewählt und in neu entstehende Viren verpackt<sup>23,54,146</sup>. Vermutlich findet diese Selektion der genomischen RNA durch das Gag<sup>p55</sup>-Polyprotein bereits im Zytoplasma infizierter Zellen statt, wo auch Gag-Oligomere nachweisbar sind<sup>177,178</sup>. Es wurde auch davon berichtet, dass die genomische RNA mit dem Gag<sup>p55</sup>-Polyprotein in der perinukleären Region kolokalisiert<sup>236</sup>. Nach dem Transport oligomerisierter Gag-Proteine und der gebundenen RNA an die Plasmamembran, findet dort die Multimerisierung der Gag-Proteine und nachfolgend die Assemblierung neuer Virionen statt. Im Gegensatz dazu wird auch vermutet, dass der Einbau viraler RNA erst an der Plasmamembran geschieht, wo bereits Gag-Moleküle gebunden sind. Jedoch fehlt bislang ein Beweis, wie genomische RNA unabhängig von Gag zur Plasmamembran transportiert werden könnte<sup>44,159,232,294</sup>.

Im Rahmen zahlreicher virologischer Studien konnte gezeigt werden, dass die Verpackung von HIV-1 RNA von Interaktionen zwischen der NCp7-Domäne des Gag-Polyproteins sowie einer als  $\Psi$ -Region bezeichneten hochkonservierten RNA-Struktur vermittelt wird (Abb. 1.10 A und 1.11)<sup>23,46,50,121,123,180</sup>.

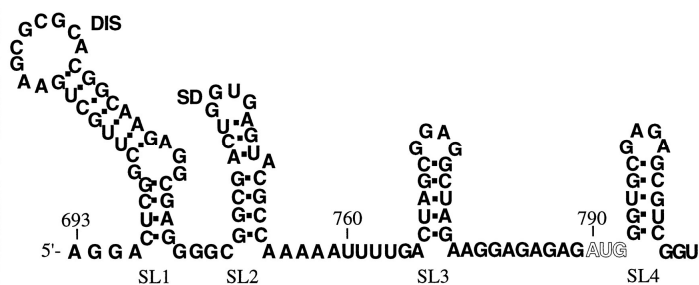
### 1.3.1 Die Beteiligung der viralen RNA



**Abbildung 1.10: (A)** Lokalisation der  $\Psi$ -Region im HIV-1 Genom. **(B)** Aufbau des Gag Polyproteins (verändert nach U. Dietrich).

Innerhalb der genomischen HIV-RNA wird die Sequenzfolge zwischen PBS und dem Beginn des *gag*-Gens als Leader-Region bezeichnet, welche auch die 120 nt lange, purinreiche  $\Psi$ -Region beinhaltet (Abb. 1.2 und 1.10 A). Diese, auch als Verpackungssignal bezeichnete, RNA-Struktur besitzt eine ausgeprägte Sekundärstruktur in Form von

vier Stemloop-Strukturen, welche durch 4 bis 13 nt lange Linker getrennt sind (Abb. 1.11)<sup>22,46,48,121</sup>. Die erste Stemloop-Struktur (SL1) enthält die Dimerisierungsinitierungs-

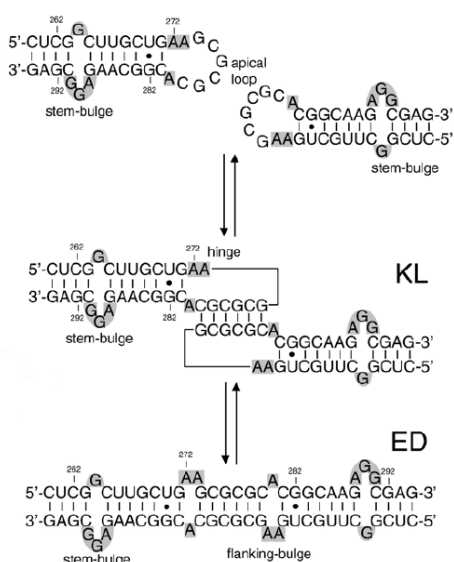


**Abbildung 1.11:** Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur der HIV-1<sub>NL4-3</sub> Ψ-Region (verändert nach <sup>61</sup>)

Stelle (DIS, dimerization initiation site). Diese GC-reiche Loop-Region vermittelt die Dimerisierung zweier RNA-Moleküle. Nach dem „Kissing Loop“ (KL) Modell binden die palindromischen Sequenzen zweier RNA-Moleküle aneinander. Das NCp7-Protein

bindet nicht mit hoher Affinität an SL1, katalysiert jedoch intermolekulare Basenpaarungen in den Stem-Bereichen beider RNA-Moleküle, was zur Entstehung eines als „Extended Duplex“ (EL) bezeichneten Komplexes führt (Abb. 1.12) <sup>54,108,174,204,228</sup>. Sowohl die Struktur des „Kissing Loops“ als auch die des „Extended Duplex“ Komplexes konnten strukturell aufgeklärt werden <sup>84,85,100,215</sup>.

Diverse Mutations- und Deletionsanalysen zeigten, dass SL1 essentiell für die HIV-1 Verpackung und Replikation ist <sup>21,49,122,173,183</sup>. Jedoch sind an der Dimerisierung zweier HIV-RNA-Moleküle noch weitere benachbarte RNA-Sequenzen, wie z.B. in der U5-Region oder Bereiche stromabwärts von SL2, beteiligt <sup>256,257</sup>. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Verpackung von HIV-1 RNA in monomerer Form möglich ist <sup>169,259-261</sup>. Da jedoch insgesamt die Menge verpackter viraler RNA in diesen Mutanten reduziert war, scheint die RNA-Dimerisierung eine Voraussetzung für die Verpackung infektiöser HIV-Partikel zu sein <sup>108,228,258</sup>.



**Abbildung 1.12:** Modell für die Dimerisierung von SL1. Dargestellt ist die Bildung des Kissing-Loop Komplexes (KL) sowie dessen Umwandlung in den Extended-Duplex Komplex (ED) (verändert nach <sup>308</sup>).

Die zweite Stemloop-Struktur (SL2) wird auch als SD (splice donor) bezeichnet und enthält die Spleiß-Donor Stelle. Die Überlappung dieser Spleiß-Donor Stelle mit der Ψ-Region gewährleistet, dass nur ungespleißte RNA verpackt wird, da gespleißter RNA ein Teil der Ψ-Region fehlt <sup>7,54,55,146</sup>.

Da SL3 alleine heterologe RNAs in virus-ähnliche Partikel verpacken kann, ging man lange Zeit davon aus, dass SL3 die zentrale Rolle in der Verpackung viraler RNA spielt <sup>123</sup>. Darüber hinaus zeigten einige Studien, dass die Deletion von SL3 oder Mutationen, welche die Basenpaarungen zerstören, die Verpackung stark beeinträchtigen <sup>49,122,200</sup>. Jedoch kann die Verpackungseffizienz durch ein mittels SELEX identi-

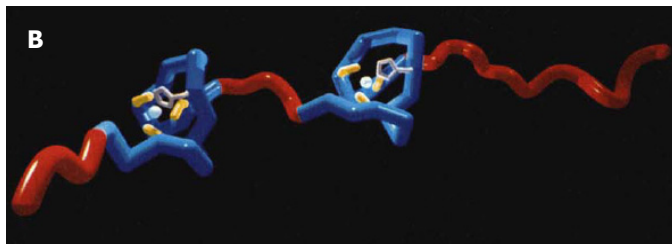
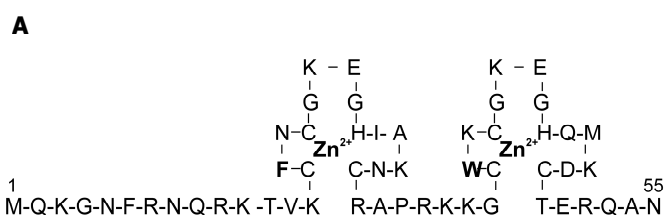
fiziertes NC-bindendes RNA-Fragment wieder hergestellt werden <sup>50</sup>. Da die Affinität von NCp7 für SL2 und SL3 fast gleich hoch ist, ist davon auszugehen, dass diese beiden Stemloop-Strukturen überlappende Funktionen in der RNA-Verpackung erfüllen (Kapitel 1.3.3) <sup>5,49,54,122,200</sup>.

Die sich stromabwärts befindende vierte Stemloop-Struktur (SL4) umgibt das *gag*-Startkodon AUG. Dabei stellt SL4 im Gegensatz zu SL2 und SL3 lediglich eine schwache Bindestelle für NCp7 dar. Des Weiteren ist  $\Psi$ -RNA mit einer SL4-Deletion konformell heterogen. Daher geht man davon aus, dass SL4 eine strukturelle Rolle bei der Verpackung viraler RNA spielt <sup>7,46,54</sup>.

Für eine effiziente Verpackung viraler RNA sind offensichtlich alle vier Stemloop-Strukturen notwendig. Da die Deletion einzelner Stemloop-Strukturen jedoch nicht zum vollständigen Abbruch der Verpackung führt, ist eine redundante Funktion dieser Stemloop-Strukturen anzunehmen <sup>5,7,169</sup>.

### 1.3.2 Die Rolle des Gag-Proteins

Neben der  $\Psi$ -Region spielt die NC-Domäne des Gag-Polyproteins bei der Verpackung viraler RNA eine kritische Rolle. Dabei ist die NC-Domäne C-terminal im Gag-Polyprotein lokalisiert und zeichnet sich durch ein konserviertes, 14 Aminosäuren langes, Motiv aus (Abb. 1.10 B und 1.13 A). Diese Cys-His Box (CCHC Motiv) hat die Sequenzfolge Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys und wiederholt sich ein zweites Mal innerhalb der NCp7-Domäne (Abb. 1.13 A



**Abbildung 1.13: (A)** Aminosäuresequenz von HIV-1 NCp7 Protein mit beiden Zink-Finger Motiven (verändert nach <sup>72</sup>). **(B)** Struktur des HIV-1 NCp7 Proteins. Rot dargestellt sind die flexiblen N- und C-terminalen Segmente, in blau die strukturierten Zink Finger Domänen (verändert nach <sup>293</sup>).

und B). Die Cys-His Box mit dem Motiv CCHC weist eine starke Homologie zu den Zinkfinger-Domänen auf, welche in vielen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren vorkommen, und besitzt ebenfalls die Fähigkeit Zinkionen zu komplexieren. Dabei sind die Zinkfinger-Motive direkt an der Erkennung und Verpackung viraler RNA beteiligt <sup>22,44,93</sup>. So resultieren Wirkstoffe, welche die Zinkfinger inaktivieren bzw. Mutationen in dieser

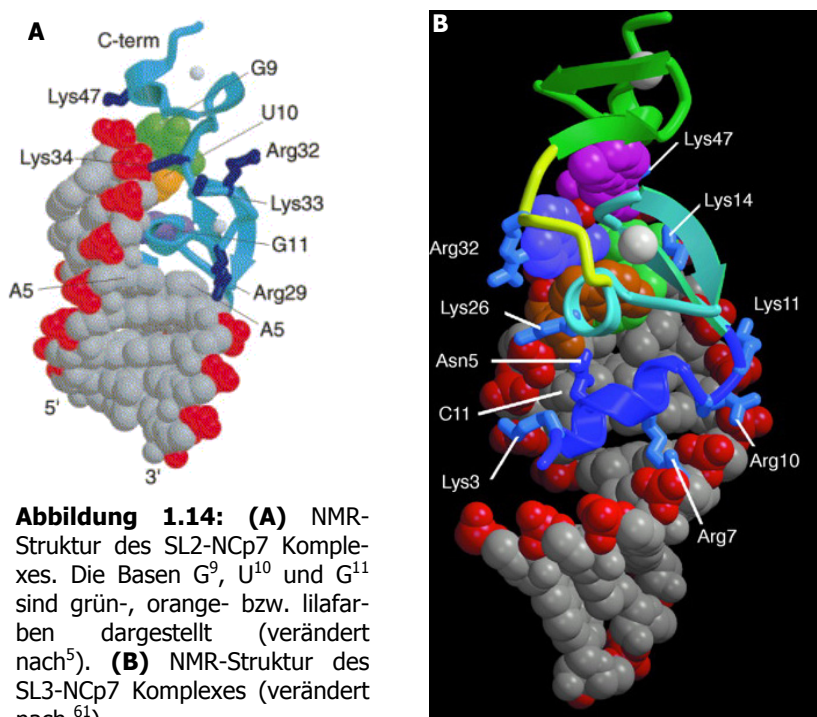


Region, in der Freisetzung nicht-infektiöser Virionen<sup>4,64,103,247,248,311</sup>. Flankierende basische Sequenzen hingegen vermitteln eine unspezifische Bindung an Nukleinsäuren. So geht man davon aus, dass NCp7 zunächst sequenzspezifisch mit der  $\Psi$ -RNA interagiert und anschließend weitere Gag-Moleküle sequenzunabhängig an der viralen RNA assemblieren<sup>44,61,92,93,231</sup>. Darüber hinaus spielt NCp7 als Nukleinsäurechaperon eine Rolle bei einer Reihe von weiteren Prozessen im HIV-1 Lebenszyklus. NCp7 fördert die Anlagerung des tRNA<sup>Lys</sup>-Primers an die PBS Stemloop-Struktur und löst während der Reversen Transkription die Sekundärstruktur viraler RNA auf. Des Weiteren destabilisiert NCp7 die TAR/cTAR Stemloop-Strukturen und ermöglicht so den DNA-Strangtransfer während der cDNA-Synthese<sup>11,17,19,24,52,243,301</sup>.

### 1.3.3 Strukturelle Studien der Genomverpackung

Die Aufklärung der NCp7-Struktur über NMR gelang 1992 sowohl der Gruppe um Bernard Roques aus Paris als auch Larry Arthur und seinen Mitarbeitern aus Frederick in den USA (Abb. 1.13 B). Auffällig war die Ähnlichkeit der CCHC-Zinkfinger mit eisenbindenden Domänen von Rubredoxinen sowie die konformelle Labilität der N- und C-terminalen Enden von NCp7<sup>211,293</sup>. Im Rahmen erster struktureller Studien zur Genomverpackung gelang es 1998 der Gruppe von Michael Summers am Howard Hughes Medical Institut in Baltimore

in den USA, die NCp7-SL3-RNA Interaktion aufzulösen. Die NMR-Struktur zeigt, dass am N-terminalen Ende von NCp7 die Reste Lys<sup>3</sup> bis Arg<sup>10</sup> eine  $3_{10}$  Helix bilden (in blau dargestellt), welche dann an die große Furche der SL3-RNA bindet (Abb. 1.14 B). Dies ermöglicht die Bindung beider Zinkfinger über die Komplexierung jeweils eines Zinkions an



**Abbildung 1.14:** (A) NMR-Struktur des SL2-NCp7 Komplexes. Die Basen G<sup>9</sup>, U<sup>10</sup> und G<sup>11</sup> sind grün-, orange- bzw. lilafarben dargestellt (verändert nach<sup>5</sup>). (B) NMR-Struktur des SL3-NCp7 Komplexes (verändert nach<sup>61</sup>).



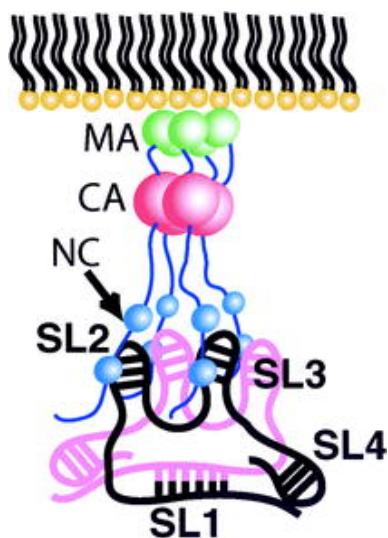
die 4 Purine im GGAG-Loop der SL3-RNA. Dabei interagiert G<sup>9</sup> der SL3-RNA spezifisch mit dem ersten Zinkfinger (F1) über Bindung an die hydrophobe Rinne in NCp7, welche von Val<sup>13</sup>, Phe<sup>16</sup>, Ile<sup>24</sup>, und Ala<sup>25</sup> gebildet wird. Auf ähnliche Weise bindet die Base G<sup>7</sup> an den zweiten Zinkfinger (F2) über Interaktionen mit Trp<sup>37</sup>, Gln<sup>45</sup> und Met<sup>46</sup> <sup>61</sup>. Vorherrschend sind dabei vermutlich Bindungen von Phe<sup>16</sup> an G<sup>9</sup> sowie von Trp<sup>37</sup> an G<sup>7</sup>, da Punktmutationen in diesen NCp7 Bereichen die Produktion von HIV-1 Partikeln verringern <sup>74,318</sup>. Die Base G<sup>6</sup> der SL3-RNA interagiert nicht mit NCp7, während das in vielen HIV-Stämmen hochkonservierte Arg<sup>32</sup> in NCp7 an A<sup>8</sup> der SL3-RNA bindet (Abb. 1.14 B). So führen z.B. Mutationen in Arg<sup>32</sup> zur Reduzierung der Verpackung <sup>225</sup>. Dieser hochaffinen NCp7 Bindung an SL3 folgt schließlich die Destabilisierung der RNA-Sekundärstruktur, was die Bindung weiterer NCp7-Moleküle an die RNA ermöglicht <sup>5,154,305,326</sup>.

Die Affinitäten des NCp7-Proteins für die anderen Stemloop-Strukturen der  $\Psi$ -Region wurden im Rahmen weiterer Studien analysiert (Tab. 1.1). Die ebenfalls in der Gruppe von Michael Summers durchgeführte Auflösung der NCp7-SL2-RNA-Struktur über NMR zeigte, dass SL2 ebenfalls spezifisch mit NCp7 interagiert. Dabei binden beide Zinkfinger die Basen G<sup>9</sup> und G<sup>11</sup> in der G<sup>8</sup>G<sup>9</sup>U<sup>10</sup>G<sup>11</sup>-Schleife der SL2-RNA (Abb. 1.14 A). Auffällig ist, dass Trp<sup>37</sup> nicht nur an SL3-RNA bindet, sondern ebenfalls an der Bindung an SL2 beteiligt ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass Trp<sup>37</sup> an G<sup>9</sup> in der SL2-RNA bindet, wobei die an dieser Interaktion beteiligten Stapelkräfte schwächer sind als die an der Bindung von NCp7 an SL3-RNA beteiligten Kräfte <sup>5,196</sup>. Diese ähnlichen Bindungscharakteristika des NCp7-Proteins für SL2- und SL3-RNA werden als ein Grund dafür angesehen, dass die Dissoziationskonstanten von NCp7 für SL2- sowie SL3-RNA etwa im gleichen Größenbereich liegen. Die K<sub>D</sub>-Werte von NCp7 für SL2- sowie SL3-RNA befinden sich im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich, wobei hier Unterschiede in der Höhe der Dissoziationskonstante abhängig von der verwendeten Methode zu beobachten sind (Tab. 1.1) <sup>7,277</sup>. Im Gegensatz dazu bindet NCp7 nur mit relativ geringer Affinität an SL1-RNA. Jedoch destabilisiert das NCp7-Protein den Stembereich von SL1 (durch Bindung an den Bulge) und katalysiert die Umwandlung des „Kissing loop“-Komplexes in den „Extended duplex“-Komplex (Kapitel 1.3.1) <sup>54,117,174,204,216,277</sup>. Am geringsten ist die Affinität von NCp7 für SL4-RNA, weshalb für SL4 eine eher strukturelle Rolle in der viralen Verpackung postuliert wird (Tab. 1.1) <sup>7,277</sup>.

RNA	Protein	Methode	Affinität	Referenz
SL2/SL3/SL4	NCp7	ESI-FTMS	62/178/1300 nM	116
SL1/SL2/SL3/SL4	NCp7	Fluoreszenz-Titration	100/23/28/320 nM	277
SL2/SL3	NCp7	Isothermische Kalorimetrie	110/170 nM	5
Psi	NCp7/p55	Radioaktive Filterbindung	je ca. 50 nM	46
SL1/SL2/SL3/SL4	NCp7		200/400/200/200 nM	
Psi/SL3	NCp7	Radioaktive Filterbindung	58 nM /1450 nM	20

**Tabelle 1.1:** Affinitäten von RNA-Sequenzen aus der  $\Psi$ -Region zum NCp7-Protein

Die strukturelle Aufklärung der  $\Psi$ -Region sowie die Affinitätsbestimmung einzelner Elemente, ermöglichte die Aufstellung eines Modells für den initialen Komplex der Verpackung viraler RNA (Abb. 1.15). Die Zinkfinger-Motive des NCp7-Proteins vermitteln dabei die spezifische  $\Psi$ -RNA Bindung, während basische Reste unspezifisch mit der RNA interagieren und für Gag-Gag-Interaktionen während der Assemblierung verantwortlich



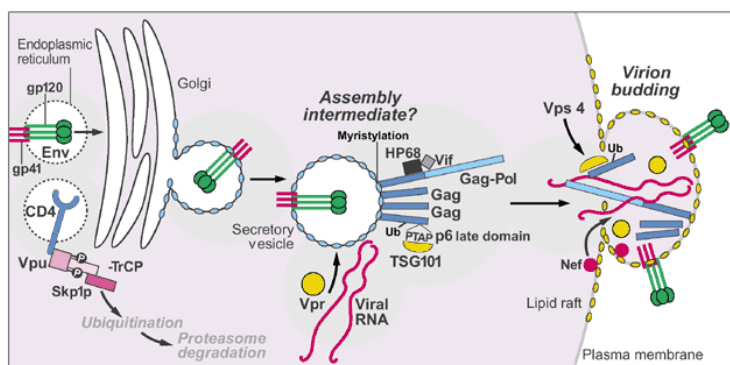
**Abbildung 1.15:** Modell des initialen Komplexes, welcher zwischen den NC-Domänen der Gag-Proteine und der dimeren  $\Psi$ -Region der viralen RNA ausgebildet wird (verändert nach <sup>7</sup>).

sind <sup>45,269</sup>. Über SL1 wird ein Duplex gebildet, welcher die dimere Form des Genoms stabilisiert. SL4 partizipiert an RNA-RNA-Interaktionen und erfüllt strukturelle Aufgaben, wie die Stabilisierung der tertiären Struktur der  $\Psi$ -Region, interagiert jedoch vermutlich nicht direkt mit NCp7. Es ist jedoch auch denkbar, dass SL1 und SL4 als sekundäre NCp7-Bindestellen dienen <sup>253</sup>. Dem Modell liegt ein adaptiver Bindungsmechanismus zugrunde, wonach durch die Umfaltung der  $\Psi$ -Region die Schleifen von SL2 und SL3 für die Bindung an die NC-Domänen eines Gag-Multimers exponiert werden. Im dargestellten Modell besteht der Komplex zur Verpackung viraler RNA aus vier Gag Molekülen, die an die dimerisierte  $\Psi$ -Region gebunden sind. Durch Bindung weiterer Gag-Moleküle (insgesamt ca. 2000-5000 pro Virion) über schwächere und unspezifische

NCp7-RNA Interaktionen wird die gesamte RNA mit NC bedeckt und assembliert schließlich in Viruspartikel (Kapitel 1.3.4). Heute geht man nicht mehr davon aus, dass für die HIV-1 Verpackung ein einzelnes Verpackungssignal verantwortlich ist. Vielmehr wird die RNA-Verpackung vermutlich von multiplen schwachen und redundanten Verpackungssignalen vermittelt <sup>5,7,31,154,159,326</sup>.

### 1.3.4 Zusammenbau und Knospung viraler Partikel

Der Verpackung viraler RNA folgt der Zusammenbau und die Knospung infektiöser HI-Virionen an der Zelloberfläche. Für diesen Prozess sind neben den bereits beschriebenen Gag-RNA-Interaktionen, ebenso Gag-Gag-, Gag-Lipid-sowie Gag-Hüllprotein- Interaktionen essentiell. Die Bildung des Gag-RNA Komplexes begünstigt nachfolgend weitere Gag-Gag-Interaktionen, welche durch die C-terminale Kapsid-, die Matrix- und die N-terminale



**Abbildung 1.16:** Zusammenbau von HIV-1. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass sekretorische Vesikel am Zusammenbau von HIV beteiligt sind (verändert nach <sup>110</sup>).

basische NCp7-Domäne sowie das p2-Spacer-Peptid vermittelt werden. Anschließend inseriert Gag über die N-terminale Myristilierung des Matrix-Proteins in die Zellmembran. Die Rekrutierung des Hüllproteins findet über den zytoplasmatischen Teil des gp41 Transmembranproteins statt, welches an die Matrix-Domäne von Gag bindet <sup>44,93,237,244,266</sup>. Während der Knospung werden die viralen Partikel schließlich von der infizierten Zelle freigesetzt (Abb. 1.16).

Bei Retroviren sind für diesen Prozess spezifische Sequenzen, sogenannte L-Domänen (late) verantwortlich, welche im Gag-Polyprotein kodiert sind. Bei HIV-1 ist diese L-Domäne innerhalb des p6-Proteins lokalisiert (Abb. 1.10 B). Die Arbeitsgruppe um Eric Freed aus Bethesda in den USA identifizierte 1995 das sogenannte PTAP-Motif als verantwortlich für die Knospung von HIV-1 <sup>137</sup>. Mutationsanalysen in diesem hochkonservierten, im N-terminalen Bereich des p6-Proteins lokalisierten Motivs, führten zur reduzierten Freisetzung von Viren, welche sich nicht von den Zellen abschnürten <sup>105,212,217</sup>. Darüber hinaus konnte eine Interaktion der L-Domänen mit zellulären Faktoren nachgewiesen werden, welche in den Ubiquitin-Signalweg involviert sind. So bindet auch das zelluläre Protein TSG101 (tumor susceptibility gene 101), welches eine Komponente der zellulären Endozytose-Maschinerie ist, an die L-Domäne in p6. Die Knospung und Reifung von infektiösen HIV ist sogar direkt von der *tsg101*-Genexpression abhängig <sup>26,65,98,102,197,266</sup>.

Eine weitere Rolle in der Knospung spielt Ubiquitin, welches in HIV-1 Partikel eingebaut wird. Proteasom-Inhibitoren, welche Ubiquitin inaktivieren, verhindern eine Knospung viraler Partikel. Eine Theorie ist, dass die Ubiquitinierung des p6-Proteins notwendig für die

Rekrutierung zellulärer Kofaktoren wie TSG101 ist, welche dann die virale Knospung einleiten<sup>224,271</sup>.

Es gab in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Studien und kontroverse Diskussionen darüber, in welchem zellulären Kompartiment die HIV-Assemblierung stattfindet. Zahlreiche Veröffentlichungen postulierten, dass HIV sekretorische Vesikel zur Bildung und Knospung viraler Partikel nutzt (Abb. 1.16)<sup>112,186,212,217,237,244,276,317</sup>. Im Rahmen neuer Studien wurde jedoch festgestellt, dass die Plasmamembran die Stelle des Zusammenbaus von HIV ist. Die zuvor beobachtete endosomale Lokalisation des Gag-Proteins rührt von der Internalisierung von Virionen an der Plasmamembran her<sup>149,323</sup>. Nach Abschnüren der HI-Virionen von der Zelloberfläche erfolgt die Reifung zu infektiösen HIV über die proteolytische Prozessierung des Gag-Polyproteins durch die virale Protease<sup>34,44</sup>.

### 1.3.5 Die $\Psi$ -RNA-NCp7-Interaktion als antivirales Ziel

Die  $\Psi$ -NCp7 Interaktion stellt ein Beispiel dar, wie spezifische RNA-Protein-Interaktionen komplexe Prozesse wie die Verpackung viraler RNA regulieren. Da es sich hierbei um einen essentiellen Schritt im Lebenszyklus von HIV handelt, bieten sich molekulare Interventionen zur Ableitung von Therapeutika an. Dabei kann die Verpackung sowohl durch Moleküle inhibiert werden, welche sich gegen die konservierte  $\Psi$ -RNA Struktur richten als auch durch Agenzien, die an nicht-variable Bereiche von NCp7 binden. So konnten im Rahmen diverser vorangegangener Studien, Liganden für die  $\Psi$ -RNA und das NCp7-Protein selektiert bzw. identifiziert werden, welche zum Teil eine antivirale Wirkung zeigten.

#### 1.3.5.1 RNA-Aptamere/Antisense-RNA/Ribozyme

Die SELEX-Technologie ermöglichte beispielsweise die Selektion von RNA-Aptameren für das NCp7-Protein, welche zum Teil die Bindung der  $\Psi$ -RNA kompetieren<sup>20,158,188</sup>. Dass dieser Ansatz erfolgsversprechend ist, wird durch zwei Studien unterstützt. So führt die intrazelluläre Expression eines NCp7-Aptamers zu einer Reduktion der HIV-1 RNA in viralen Überständen<sup>157</sup>. Eine Hemmung der HIV-Replikation konnte ebenfalls durch die Überexpression von  $\Psi$ -RNA-Decoys in HIV-infizierten Zellen erreicht werden<sup>76</sup>.

Auch für Antisense-RNA konnte eine antivirale Wirkung nachgewiesen werden. Gegen SL1 gerichtete Antisense-RNA verhindert *in vitro* die RNA-Dimerisierung und gegen die voll-

ständige  $\Psi$ -RNA gerichtete Antisense-RNA übt sogar eine HIV-1 Replikationshemmung aus<sup>40,281</sup>. Ein weiterer, interessanter Ansatz sind Ribozyme, welche auch als katalytisch aktive RNAs bezeichnet werden. Gegen die  $\Psi$ -RNA gerichtete Ribozyme, führen zu deren Spaltung sowie zur Inhibition von HIV-1<sup>114</sup>.

### 1.3.5.2 Zinkfinger-Inhibitoren

Diese Substanzklasse entfernt die Zinkionen aus NCp7, was zur irreversiblen Vernetzung der Cystein-Reste führt und somit das Protein inaktiviert. Bereits Mitte der 1990er Jahre veröffentlichte William Rice am Laboratory of Antiviral Drug Mechanisms in Frederick, USA, dass Nitrosobenzamide und weiter entwickelte Disulfid-substituierte Derivate spezifisch die Zinkionen von NCp7 in HI-Viren entfernen und eine breite antivirale Aktivität aufweisen<sup>62,146,246,247,311</sup>. Die Entfernung der Zinkionen geht einher mit dem Verlust der Bindung von NCp7 an die  $\Psi$ -RNA<sup>303,304</sup>. Um die *in vivo* Stabilität zu erhöhen, erfolgte die Weiterentwicklung zu Dithian- bzw. Thioester- substituierten Wirkstoffen, welche diverse HIV-Isolate sowie resistente Stämme hemmten<sup>144,245,310</sup>. Schließlich wurden mit der verbesserten und selektiv wirkenden Substanz Azodicarbonamid (ADA) klinische Phase I und II Studien durchgeführt<sup>136,248,313</sup>. Obwohl in Patienten die CD4-Zellzahl anstieg und die virale Last reduziert war, wurden letztlich Zinkfinger-Inhibitoren aufgrund toxischer, renaler Nebenwirkungen nicht mehr eingesetzt<sup>59,62</sup>.

### 1.3.5.3 Aminoglykoside

Die 16S rRNA des prokaryotischen Ribosoms war die erste RNA, welche als Angriffspunkt für kleine Moleküle wie z.B. polykationische Aminoglykoside angesehen wurde, die selektiv die prokaryotische Proteinsynthese hemmen<sup>129,289</sup>. Darüber hinaus interagieren Aminoglykoside auch mit der TAR- und RRE-RNA (Kapitel 1.2.2). Im Rahmen diverser Studien konnten Aminoglykosidanaloga (wie die Neomycinanaloga Neo-Guanidino, Neo-Acridino und Neo-Neo sowie Neomycin B und Paromomycin) ebenfalls als Liganden für die  $\Psi$ -RNA identifiziert werden<sup>201-203,307</sup>. Dabei stellt SL1, welche eine auffällige strukturelle Ähnlichkeit zur ribosomalen A-Seite (Aminoacyl-tRNA-Seite) von Prokaryoten aufweist, eine Bindestelle für Aminoglykoside dar. Dieses Phänomen ist vermutlich eine Erklärung dafür, dass eine Reihe von Aminoglykosiden wie z.B. Paromomycin, Neomycin und Neamin spezifisch an den von SL1 gebildeten „Kissing-Loop“ Komplex binden. Dabei ist die Affinität für SL1 im gleichen Größenbereich wie die für die ribosomale A-Seite<sup>81-83</sup>.

Für Neomycin B konnte sogar eine Bindung im mikromolaren Bereich an andere Elemente der  $\Psi$ -RNA wie SL2, SL3 und SL4 gezeigt werden. Darüber hinaus hemmt Neomycin die NCp7-Bindung an SL3 und SL4<sup>307,309</sup>. Da jedoch Neomycin auch an die TAR- sowie RRE-RNA Strukturen bindet, scheint es sich nicht um eine besonders sequenzspezifische Bindung zu handeln (Kapitel 1.2.2). Darüber hinaus gelang es bis heute nicht, eine HIV-Replikationshemmung mittels Aminoglykosidantibiotika zu erreichen. Ein Grund hierfür ist möglicherweise die schlechte Aufnahme von Aminoglykosiden in eukaryotische Zellen, was vermutlich an ihrer Größe und Ladung begründet ist<sup>81</sup>.

#### 1.3.5.4 Peptide

Spezifische Peptidliganden mit einer erhöhten Affinität für die  $\Psi$ -RNA könnten ebenfalls entweder selbst in die HIV Therapie eingesetzt werden, um die angewendeten Therapieansätze zu ergänzen oder durch Modifikationen weiter optimiert werden (Kapitel 1.2.3). Darüber hinaus könnte ein  $\Psi$ -RNA-bindendes Peptid ebenfalls als Leitstruktur für die Selektion und Generierung höher affiner Moleküle dienen, welche die  $\Psi$ -RNA-NCp7-Interaktion inhibieren.

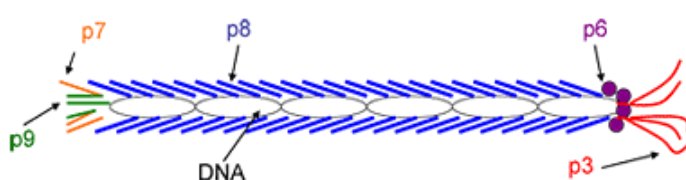
Im Rahmen von Vorarbeiten wurden mittels der Phage Display Technologie für die  $\Psi$ -RNA sowie für die einzelnen Stemloop-Strukturen spezifische Peptide selektiert. Dabei enthielten die identifizierten Peptide häufig ein Motiv aus einem Cluster von aromatischen Aminosäuren, das mit positiven Aminosäuren kombiniert war. Ein daraus abgeleitetes Konsensus-Peptid (HWWPWW) kompetierte sogar mit der Bindung des NCp7-Proteins an die  $\Psi$ -RNA. Jedoch lag die Affinität des HWWPWW-Peptids für die  $\Psi$ -RNA im mittleren mikromolaren Bereich und benötigt daher für therapeutische Anwendungen eine Optimierung<sup>71,239,240</sup>. Eine umfassende funktionelle Charakterisierung der an die  $\Psi$ -RNA bindenden Peptide, wie z.B. die Analyse der antiviralen Wirkung, stand noch aus.

## 1.4 Die Phage Display Technologie

Die Anwendung der Phage Display Technologie zur Identifizierung von Liganden für eine Vielzahl von Zielmolekülen, wie z.B. Antikörper, Rezeptoren und Proteine ist bereits seit Jahren etabliert<sup>8,56,138,151,161,286</sup>. Darüber hinaus fand die Phage Display Technologie ebenfalls erfolgreichen Einsatz bei der Identifizierung von Liganden für RNA wie z.B. der Isolierung eines single-chain Antikörpers (scFv) für die U1 snRNA aus scFv-exprimierenden

Phagenbanken<sup>133,299</sup>. Andere Phagenbanken ermöglichten die Identifizierung von TAR-RNA-bindenden Peptiden sowie eines RRE-bindenden Zinkfinger-Proteins<sup>94,160</sup>. Ein weiteres Beispiel für die Anwendung und Weiterentwicklung der Phage Display Technologie zur Identifizierung von RNA-Liganden stammt aus einer Arbeitsgruppe, welche zunächst Peptidliganden für tRNA<sup>Phe</sup> aus Hefe isolierte und die Technik dann benutzte, um Liganden für humane tRNA<sup>Lys</sup> zu selektieren, welche als Primer für die Reverse Transkriptase von HIV fungiert<sup>3,86</sup>.

Ermöglicht wurde die vielfältige Anwendung der Phage Display Technologie zur Identifizierung von Liganden für eine Reihe von Zielstrukturen, durch die Entwicklung eines Expressionsvektors für den filamentösen M13 Bakteriophagen Mitte der 1980er Jahre von George Smith an der Universität von Missouri in den USA<sup>282</sup>. Dieser Vektor ermöglicht die Expression fremder Peptide auf der Oberfläche des Bakteriophagen, wodurch Phagenbanken erstellt werden können, die theoretisch alle möglichen Sequenzen eines kurzen Peptids auf der Hüllproteinoberfläche tragen.



**Abbildung 1.17:** Aufbau des Bakteriophagen M13. Der Phage besitzt eine Länge von etwa 1  $\mu\text{m}$  und einen Durchmesser von circa 5-6 nm. Das Kapsid besteht aus 5 verschiedenen Proteinen: p3, p6, p7 und p9 sowie p3 und p8. Zur Expression fremder Proteine auf der Phagenoberfläche werden hauptsächlich p3 und p8 genutzt (verändert nach <http://hu.cnsi.ucsb.edu/>).

Im Rahmen von „Biopannings“ werden dann peptidtragende Phagen aufgrund ihrer Affinität für eine Zielstruktur selektiert und angereichert<sup>273</sup>.

Neben Phagenbanktypen, welche Antikörperfragmente, Hormone oder Proteine an der Oberfläche

exprimieren werden randomisierte Peptidphagenbanken zahlreich genutzt<sup>8,13,279,295</sup>. Dabei sind die permutierten Peptid-kodierenden Sequenzen im M13-Phagengenom an die Gene der Hüllproteine pIII oder pVIII kloniert (Abb. 1.17). Die Peptidexpression erfolgt dann N-terminal als Fusionsprotein mit pIII bzw. pVIII. Bei einer Fusion mit dem pVIII Hüllprotein wird die Peptidsequenz mit 2700 Kopien pro Phage exprimiert, während bei einer pIII-Fusion die Kopienzahl pro Phage bei fünf liegt<sup>153,283</sup>.

Zur Selektion von Peptidliganden für die HIV-1  $\Psi$ -RNA im Rahmen vorangegangener Studien wurden kommerziell erhältliche M13 Phagenbanken eingesetzt, welche an pIII-gekoppelte, randomisierte Peptide exprimieren. Die Diversität der verwendeten Phagenbanken (New England Biolabs) lag bei  $2 - 4 \cdot 10^9$  unabhängiger Klone. Die Selektion erfolgte anhand von Phagenbanken, welche lineare Peptidsequenzen mit einer Länge von sieben bzw. zwölf Aminosäuren bzw. zyklische Peptidsequenzen exprimierten<sup>71,239,240</sup>.

## 1.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Während der Verpackung des HIV Genoms wird aus einer Vielzahl von zellulären RNAs die genomische, virale RNA selektiv ausgewählt. Da es sich hierbei um einen hochspezifischen und essentiellen Schritt im HIV-Replikationszyklus handelt, bieten sich antivirale Interventionen an dieser Stelle an.

Im Rahmen von Vorarbeiten wurden bereits mittels der Phage Display Technologie Peptidliganden für die HIV-1  $\Psi$ -RNA selektiert. Da die Affinität der selektierten, tryptophanreichen Peptide für die  $\Psi$ -RNA lediglich im mittleren mikromolaren Bereich lag, benötigte diese für etwaige therapeutische Anwendungen eine Optimierung. Das Ziel der Arbeit war die umfassende funktionelle Charakterisierung der optimierten Peptidliganden sowie die Analyse der antiviralen Aktivität *in vitro*. Dies erforderte insbesondere die Entwicklung verschiedener Testsysteme, welche die intrazelluläre Expression bzw. Aufnahme der Peptide ermöglichten.

Diese Arbeit kann somit als ein Ausgangspunkt für die Weiterentwicklung eines Wirkstoffes dienen, welcher mit der Verpackung viraler RNA interferiert und in die späte Phase des HIV-Replikationszyklus eingreift.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### Modell

ABIPRISM 3100-Avant Genetic Analyzer

Autoklav 2540 EL

Brutschrank FunctionLine

ELISA-Lesegerät SpectraMax 340

ELISA-Waschgerät EL<sub>x</sub>405

FACS-Calibur

FACS-Aria

Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE300

Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRBE

Geldokumentationssystem 2000

Hypercassette™ RPN 11642 18x24 cm

Kamera Digital Sight DS-U1

Kühl- und Gefrierschränke

Luminometer LumiStar Galaxy

Magnetrührer KMO2

Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell

NanoDrop

pH-Meter HI 9321

Schüttelinkubator SM25

Spannungsgeber Power Pac 200

Sterilbank Microflow

Sterilbank Holten Lamin Air

##### Hersteller/Vertrieb

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Tuttnauer, Tel Aviv, Israel

Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA

Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall

Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg

Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg

Nikon GmbH, Düsseldorf

Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

GE Healthcare Europe GmbH, München

Nikon GmbH, Düsseldorf

Liebherr Holding GmbH, Biberach

BMG LABTECH GmbH, Offenburg

IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA

HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein

Johanna Otto GmbH, Hechingen

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Bio-Flow Technik, Meckenheim

Bio-Flow Technik, Meckenheim

<b>Modell</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Thermocycler T 3000	Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
True Confocal Scanner Leica TCS SL	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zellzählgerät Casy® TT	Schärfe GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Biofuge 17RS	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Mikro 20	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Beckmann Avanti J-20	Beckamnn Instruments Inc., CA, USA

### 2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), VWR International GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen.

Bestandteile der Nährmedien und Agar zur Anzucht von Bakterien wurden von Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) sowie Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen. Zur Plasmid-DNA-Isolierung und Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurden Kits von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren) und Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) verwendet. DNA und Protein-Größenstandards stammten von New England Biolabs GmbH (Frankfurt) sowie Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen). Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden von Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien), PAA-Laboratories GmbH (Pasching, Österreich), PAN Biotech GmbH (Aidenbach) und Gibco-Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen. Einwegartikel für die Zellkultur stammten von Corning (NY, USA) sowie Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen).

### 2.1.3 Kits

#### Produkt

Kalzium-Phosphat Transfektionskit  
 ECL Western blotting detection  
 reagents and analysis system  
 Innostest<sup>®</sup> HIV Antigen mAb  
 Nucleo Bond PC 500 Kit  
 Nucleo Spin Extract II Kit  
 PeqGold Plasmid Miniprep-Kit I  
 QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit  
 Via Light<sup>®</sup> Plus Kit

#### Hersteller/Vertrieb

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
 GE Healthcare Europe GmbH, München  
  
 Innogenetics GmbH, Heiden  
 Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren  
 Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren  
 Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen  
 Qiagen GmbH, Hilden  
 Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien

### 2.1.4 Lösungen und Medien

#### Bezeichnung

LB-Medium/Agar

#### Zusammensetzung

5 g NaCl  
 5 g Hefeextrakt  
 10 g Trypton  
 15 g Agar (nur für Agarplatten)  
 Ad 1 L Aqua dest, pH 7,0;  
 autoklavieren

10x PBS

80 g NaCl  
 2 g KCl  
 2 g KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 11,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 Ad 1 L Aqua dest., pH 7,5;  
 autoklavieren

<b>Bezeichnung</b>		<b>Zusammensetzung</b>
50x TAE	242 g 57,1 ml 100 ml	Tris Essigsäure (100%) EDTA (0,5 M) Ad 1 L Aqua dest., pH 8,0; autoklavieren
Ampicillin-Stammlösung [100 µg/ml]	1 mg	Ampicillin Ad 10 ml Aqua dest.; aliquotieren, bei -20°C lagern
1% FACS-Fixpuffer	1,3 ml	37% Formaldehyd Ad 50 ml PBS
FACS-Waschpuffer	5 ml	FCS Ad 0,5 L PBS
2% PFA/PBS	1 g	Paraformaldehyd Ad 50 ml PBS, pH 7,0
Mowiol	2,4 g 6 g 6 ml 12 ml 0,1 %	Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich) Glycerol Aqua dest. 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 DABCO™ (Sigma-Aldrich) Bei 50°C rühren; aliquotieren, bei -20°C lagern
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	72,7 g	Tris Ad 0,4 L Aqua dest., pH 8,8; autoklavieren
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	24,3 g	Tris Ad 400 ml Aqua dest., pH 6,8; autoklavieren

<b>Bezeichnung</b>		<b>Zusammensetzung</b>
10% SDS	10 g	SDS Ad 100 ml Aqua dest.
10% APS	1 g	Ammoniumperoxodisulfat Ad 10 ml Aqua dest.; aliquotieren, bei -20°C lagern
10x TGS Laufpuffer (SDS-PAGE)	30 g 144 g 10 g	Tris Glycin SDS Ad 1 L Aqua dest.
Western Blot Lysispuffer	0,8 g 0,9 g 0,5 ml 10 ml  0,1 ml 1 ml 1 ml	Tris-HCl, pH 8,0 NaCl Triton X-100 Glycerol Ad 100 ml Aqua dest.; autoklavieren, Inhibitoren vor Gebrauch zugeben  1 M DTT 100 mM Pefablock (Roth) Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich)
10x Probenpuffer (SDS-PAGE)	4 ml 3,2 ml 1 ml 0,16 ml 0,16 ml	Glycerin 10% SDS 1 M Tris-HCl, pH 6,8 1% Bromphenolblau 5 M DTT Ad 16 ml Aqua dest.; aliquotieren, bei -20°C lagern

<b>Bezeichnung</b>		<b>Zusammensetzung</b>
4% Sammelgel	25 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	9,8 ml	40% Acrylamid/Bisacrylamid
	1 ml	10% SDS
		Ad 100 ml Aqua dest.
		Für 2 Gele à 2,5 ml: 25 µl APS + 12 µl TEMED
12% Trenngel	25 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
	30 ml	40% Acrylamid/Bisacrylamid
	1 ml	10% SDS
		Ad 100 ml Aqua dest.
		Für 2 Gele à 5 ml: 50 µl APS + 25 µl TEMED
10x Towbin Transfer Puffer (Western Blot)	30 g	Tris
	144 g	Glycin
		Ad 1 L Aqua dest.
1x Towbin Puffer	50 ml	10x Towbin Puffer
	100 ml	Methanol
		Ad 0,5 L Aqua dest.
1x PBS/ 0,05 % Tween Waschlösung	100 ml	10x PBS
	0,5 ml	Tween-20
		Ad 1 L Aqua dest.
5 % Milchpulver	5 g	Milchpulver
		Ad 100 ml 1x PBS/0,05% Tween-20
0,5 M Strippingpuffer	48 g	Zitronensäure
		Ad 0,5 L Aqua dest.

<b>Bezeichnung</b>		<b>Zusammensetzung</b>
Harvestpuffer	5 ml	Glycerin
	2,5 ml	1 M MES-Tris, pH 7,8
	50 µl	1 M DTT
	500 µl	10% Triton X-100
		Ad 50 ml Aqua dest.
β-Galaktosidase Reaktionspuffer	15 µl	1 M MgCl <sub>2</sub>
	3 ml	0,5 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
	150 µl	100x Galakton <sup>®</sup> (Applied Biosystems)
		Ad 15 ml Aqua dest.; aliquotieren, bei -20°C lagern
β-Galaktosidase Amplifier	100 µl	NaOH
	500 µl	10x Emerald <sup>™</sup> (Applied Biosystems)
		Ad 5 ml Aqua dest.
Luziferase-Puffer	5 ml	1 M MES-Tris, pH 7,8
	1 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>
	96 mg	ATP
		Ad 40 ml Aqua dest.; aliquotieren, bei -20°C lagern
Luziferin	10 mg	Luziferin (Promega) Ad 36 ml 5 mM KHPO <sub>4</sub> , pH 7,8; aliquotieren, lichtgeschützt bei -20°C lagern

### 2.1.5 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron GmbH (Ulm) bezogen.

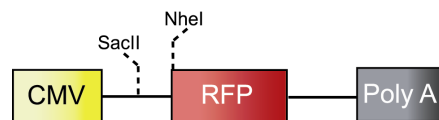
Bezeichnung	5'-3' Sequenz
Annetsche I	GAG CTC GTT TAG TGA ACC GT
RFP seq	GGC TCC AAG GTG TAC GTG AA
M218-4218	GCT CCG CCA CTG TCC GAG
HKWPWW d	GGA TGC ATA AGT GGC CTT GGT GGG GTG GAG GTG
HKWPWW r	CTA GCA CCT CCA CCC CAC CAA GGC CAC TTA TGC ATC CGC
GSGSGS d	GGA TGG GTT CTG GAA GTG GTT CGG GTG GAG GTG
GSGSGS r	CTA GCA CCT CCA CCC GAA CCA CTT CCA GAA CCC ATC CGC
HKWPWW-RFP fwd	GAT CGA ATT CGC CAC CAT GCA TAA GTG GCC
GSGSGS-RFP fwd	GAT CGA ATT CGC CAC CAT GGG TTC TGG AAG
RFP-universal rwd	ACT AGA ATT CCT ACA GGA ACA GGT G
PSI-cDNA	AAC AGG CCA GGA TTA ACT GC
PSI-fwd	AGG ACT CGG CTT GCT GAA

### 2.1.6 Plasmide und Vektorkarten

Name	Beschreibung	Referenz
pF25-RFP	Expressionsplasmid für das RFP-Protein	<sup>72</sup>
pHRSEWcPPT	Lentiviraler Transfervektor, enthält das HIV-1 $\Psi$ -Signal sowie ein verpackbares <i>gfp</i> -Gen	<sup>63</sup>
pCMV $\Delta$ R8.91	Expressionsplasmid der HIV-1 Gag/Pol-Proteine zur Verpackung lentiviraler Vektoren	<sup>327</sup>
pMD2.VSV.G	Expressionsplasmid des VSV.G-Hüllproteins zur pseudotypisierung viraler Partikel	<sup>327</sup>



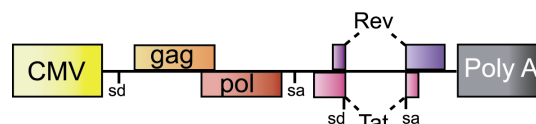
Name	Beschreibung	Referenz
pSRS11SFGFPpre	Gammaretroviraler Transfektor, enthält das MESV $\Psi$ -Signal sowie ein verpackbares <i>gfp</i> -Gen	<sup>267</sup>
pcDNA3.MLV g/p	Expressionsplasmid der MLV Gag/Pol-Proteine zur Verpackung gammaretroviraler Vektoren	Dr. A. Schambach, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
M 377	Gammaretroviraler Transfektor, enthält das MESV $\Psi$ -Signal sowie eine Klonierungsstelle	<sup>130</sup> , verändert von AG von Laer, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt
GaLV env	Expressionsplasmid des GaLV Hüllproteins zur pseudotypisierung viraler Partikel	<sup>287</sup>
M288	Expressionsplasmid mit CMV-Promotor und Klonierungsstelle	AG von Laer, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt



**Abbildung 2.1:** pF25-RFP. Expressionsvektor für das RFP Protein, enthält die SacII/NheI-Schnittstellen für die Klonierung der Peptide.



**Abbildung 2.2:** pHRSEWcPPT. Selbstinaktivierender, lentiviraler Transfektor, enthält das HIV-1  $\Psi$ -Signal und ein verpackbares *gfp*-Gen zur Herstellung lentiviraler Partikel.



**Abbildung 2.3:** pCMV $\Delta$ R8.91. Vektor mit den HIV-1 *gag/pol*-Genen unter CMV-Promotorkontrolle zur Herstellung replikationsinkompetenter lentiviraler Partikel.



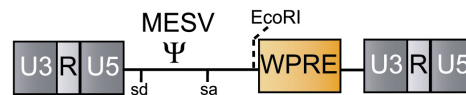
**Abbildung 2.4:** pMD2.VSV.G. Vektor mit dem VSV.G-Hüllprotein (vesicular stomatitis virus glycoprotein), zur Pseudotypisierung lentiviraler sowie retroviraler Partikel.



**Abbildung 2.5:** pSRS11SFGFPpre. Selbstinaktivierender, gammaretroviraler Transfervektor, enthält das MESV (mouse embryonic stem cell virus) Ψ-Signal und ein verpackbares *gfp*-Gen zur Produktion von replikationsinkompetenten Retroviren.



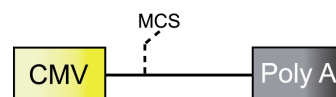
**Abbildung 2.6:** pcDNA3.MLV g/p. Expressionsvektor der MLV *gag/pol*-Gene zur Produktion replikationskompetenter retroviraler Partikel.



**Abbildung 2.7:** M377. Gammaretroviraler Transfervektor, enthält das MESV Ψ-Signal sowie die EcoRI Schnittstelle zur Klonierung der Peptid-RFP-Fusionsproteine.



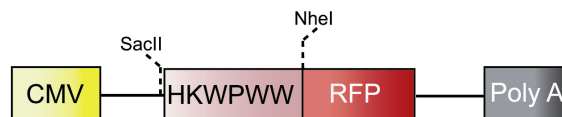
**Abbildung 2.8:** GaLV env. Vektor mit dem GaLV-Hüllprotein (gibbon ape leukemia virus) unter FB29-Promotorkontrolle (friend murine leukemia virus). Dient der Pseudotypisierung retroviraler Partikel für die Transduktion von PM1 Zellen.



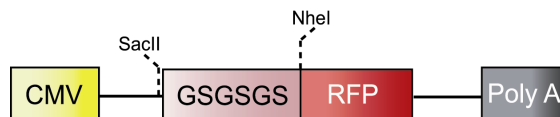
**Abbildung 2.9:** M288. Expressionsvektor mit dem CMV-Promotor, Klonierungsstelle (MCS) und Polyadenylierungsstelle. Das Plasmid dient dazu, in jedem Transfektionsansatz die Plasmid-DNA-Menge auf die gleiche DNA-Gesamtmenge anzugleichen.

## 2.1.7 Generierte Konstrukte

Konstrukt	Klonierung
pF25-HKWPWW-RFP	HKWPWW d/r Oligonukleotide in SacII/NheI geöffneten pF25-RFP-Vektor ligiert
pF25-GSGSGS-RFP	GSGSGS d/r Oligonukleotide in SacII/NheI geöffneten pF25-RFP-Vektor ligiert
M377-HKWPWW-RFP	HKWPWW-RFP mit HKWPWW-RFP fwd/RFP-universal rwd Oligonukleotiden aus pF25-HKWPWW-RFP amplifiziert und in EcoRI geöffneten M377-Vektor ligiert
M377-GSGSGS-RFP	GSGSGS-RFP mit GSGSGS-RFP fwd/RFP universal rwd Oligonukleotiden aus pF25-GSGSGS-RFP amplifiziert und in EcoRI geöffneten M377-Vektor ligiert



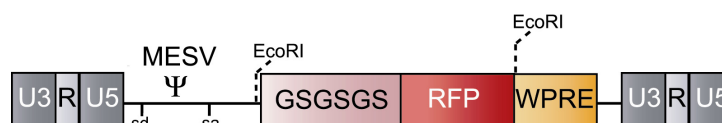
**Abbildung 2.10:** pF25-HKWPWW-RFP. Der Vektor exprimiert das HKWPWW-Peptid N-terminal in Fusion mit dem RFP-Protein.



**Abbildung 2.11:** pF25-GSGSGS-RFP. Der Vektor exprimiert das GSGSGS-Peptid N-terminal in Fusion mit dem RFP-Protein.



**Abbildung 2.12:** M377-HKWPWW-RFP. Gammaretroviraler Transfervektor, enthält das verpackbare *hkwpww-rfp*-Gen zur Produktion replikationsinkompetenter Retroviren.



**Abbildung 2.13:** M377-GSGSGS-RFP. Gammaretroviraler Transfervektor, enthält das verpackbare *gsgsgs-rfp* Gen zur Produktion replikationsinkompetenter Retroviren.

### 2.1.8 Peptide

Folgende Peptide wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Schwalbe am Institut für Organische Chemie, J. W. Goethe-Universität Frankfurt synthetisiert:

Ac-HKWPWW-SQP-KRRKK-Tamra

Ac-GSGSGS-SQP-KRRKK-Tamra

Die Kopplung des Fluorophors Tamra (5,6 Tetramethylrhodamin) erfolgte C-terminal über die Seitenkette des Lysins.

### 2.1.9 Enzyme

#### Restriktionsenzyme

Die in der Arbeit verwendeten DNA-Restriktionsenzyme sowie die zugehörigen Puffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

#### Ligasen

T4-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
-----------	--------------------------------

#### Polymerasen

High Fidelity Taq DNA-Polymerase	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Natu Tec GmbH, Frankfurt

#### Andere

SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNaseOUT	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNaseI, RNase-frei	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

### 2.1.10 Antikörper

α-p24 (human)	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Germantown, USA Cat.No #530
α-GAPDH (murin)	Chemicon, Temecula, USA
Peroxidase-konjugiertes Esel α-Human IgG (H+L)	Dianova, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Ziege α-Maus IgG (H+L)	Dianova, Hamburg
α-CXCR4 (murin)	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Germantown, USA Cat.No #3439
α-CD4 (murin)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
APC-konjugiertes Ziege α –Maus IgG (H+L)	Caltag Laboratories, Burlingame, USA

### 2.1.11 Rekombinante Proteine

HIV-1SF2 p55 Gag (exprimiert in Hefe)	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Germantown, USA Cat.No #5109
---------------------------------------	--

### 2.1.12 Bakterien und Anzuchtbedingungen

Für molekularbiologische Arbeiten wurde der *Escherichia coli* Stamm TOP10 von Invitrogen (Karlsruhe) mit folgenden Genotyp verwendet:

F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mmr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galJ* *galK* *rpsL* (*Str<sup>R</sup>*) *endA1* *nupG*

Transformierte Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 200 rpm in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angezogen.

### 2.1.13 Zellkulturmedien

DMEM-Komplettmedium	500 ml	DMEM Medium
	10%	FCS (50 ml)
	2%	L-Glutamin (10 ml)
	1%	Penicillin/Streptomycin (5 ml)
RPMI-Komplettmedium	500 ml	RPMI Medium
	10%	FCS (50 ml)
	2%	L-Glutamin (10 ml)
	1%	Penicillin/Streptomycin (5 ml)

### 2.1.14 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz	Medium
293T	Humane embryonale Nierenepithelzelle, exprimiert stabil das große SV40 T-Antigen. Plasmide mit SV40-Replikationsursprung werden nach Transfektion hoch amplifiziert.	LGC Promochem GmbH, Wesel ATCC No #CRL-11268	DMEM-Komplettmedium
PM1	Humane T-Zell Suspensionszelle	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Germantown, USA Cat.No #3038	RPMI-Komplettmedium
P4.R5 MAGI	Humane Zervixkarzinomzelle (HeLa), exprimiert stabil die Chemokinrezeptoren CCR5 und CD4 sowie $\beta$ -Galaktosidase unter HIV-1 LTR-Kontrolle. CXCR4 wird endogen exprimiert.	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Germantown, USA Cat.No #3580	DMEM-Komplettmedium

Zelllinie	Ursprung	Referenz	Medium
TZM-bl	Humane Zervixcarzinomzelllinie (He-La), exprimiert stabil CCR5 und CD4 sowie $\beta$ -Galaktosidase und Luziferase unter HIV-1 Promotorkontrolle. CXCR4 wird endogen exprimiert.	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Germantown, USA Cat.No #8129	DMEM-Komplettmedium

### 2.1.15 Generierte Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Medium
PM1-HKWPWW-RFP	Verpackung des retroviralen Transfervektors M377-HKWPWW-RFP in 293T Zellen mit pCDNA.3 MLV g/p, Pseudotypisierung mit dem GaLV-Hüllprotein. Anschließend Transduktion von PM1-Zellen und FACS-Sortierung RFP-positiver Zellen.	RPMI-Komplettmedium
PM1-GSGSGS-RFP	Verpackung des retroviralen Transfervektors M377-GSGSGS-RFP in 293T Zellen mit pCDNA.3 MLV g/p, Pseudotypisierung mit dem GaLV-Hüllprotein. Anschließend Transduktion von PM1-Zellen und FACS-Sortierung RFP-positiver Zellen.	RPMI-Komplettmedium

### 2.1.16 HIV-1 Stämme

Virus	Subtyp	Referenz
HIV-1 <sub>LAI</sub> (auch als HIV-1 <sub>BRU</sub> bezeichnet)	B	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Germantown, USA, Cat.No #2522
HIV-1 <sub>NL4-3</sub>	B	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Germantown, USA, Cat.No #114

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen**

Restriktionsenzyme schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen. Der Verdau erfolgt in dem mitgelieferten Puffer nach Angaben des Herstellers. Die vorliegende DNA (Plasmid-DNA oder PCR-Produkt) wird dabei 20-fach überverdaut und das Restriktionsenzym dann bei 65°C für 20 min inaktiviert. Anschließend erfolgt die Überprüfung der Qualität des Verdaus durch Agarose-Gelelektrophorese.

### **2.2.2 Agarose Gelelektrophorese**

Mit Hilfe der Agarose Gelelektrophorese werden Restriktionsfragmente sowie PCR-Produkte in Abhängigkeit von der Größe aufgetrennt. Dabei werden abhängig von der Größe des zu trennenden Fragments 1 - 2%ige TAE-Agarosegele verwendet. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Beleuchtung wird eine Endkonzentration von 0,005% Ethidiumbromid zugegeben. Die Auftrennung erfolgt im elektrischen Feld bei einer Spannung von 100 V.

Bei einer Verwendung der DNA-Fragmente für Ligationen werden die aufgetrennten, linearisierten Banden mittels eines Skalpells aus dem Gel geschnitten. Die DNA-Fragmente werden anschließend mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits der Firma Macherey-Nagel (Nucleo Spin Extract II Kit) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### **2.2.3 Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden**

Die Hybridisierung zweier komplementärer DNA-Oligonukleotide erfolgt in einem Endvolumen von 22,5 µl mit jeweils 10 µl [10 pmol/µl] der einzelnen Oligonukleotide und 2,5 µl T4-Ligase-Puffer. Zunächst werden die Oligonukleotide bei 95°C für fünf Minuten denaturiert und dann eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Hybridisierung erfolgt. Anschließend werden die hybridisierten Oligonukleotide in die Ligation eingesetzt.



## 2.2.4 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten. Hierfür werden gegenläufige Primer, welche die Zielsequenz flankieren, im Überschuss eingesetzt. Die Reaktion wird mit der High Fidelity Taq DNA-Polymerase der Firma Roche nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### PCR-Reaktionsansatz

Komponente	50 µl Ansatz
5x Amplifikationspuffer	10 µl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	3 µl
dNTPs [10 mM]	1 µl
Primer fwd [10 pmol/µl]	1 µl
Primer RFP universal rwd [10 pmol/µl]	1 µl
Q-Solution	10 µl
High Fidelity Taq DNA-Polymerase [5 u/µl]	0,5 µl
Plasmid-DNA [50 ng/µl]	1 µl
H <sub>2</sub> O	22,5 µl

### Temperaturprofil

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1	1	95°C	2 min	Denaturierung
2	25	95°C	30 s	Denaturierung
		52°C	30 s	Hybridisierung
		74°C	60 s	Elongation
3		74°C	10 min	Vervollständigung

Nach Verdau und Aufreinigung der generierten DNA-Fragmente werden diese in einen linearisierten Vektor ligiert (Kapitel 2.2.1 und 2.2.2).

### 2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgt mittels der T4-Ligase in dem mitgelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl nach Angaben des Herstellers. Der Vektor und das Insert werden in einem molaren Verhältnis von 1:10 eingesetzt, über Nacht bei 22°C inkubiert und anschließend in *E.coli* transformiert.

### 2.2.6 Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Chemokompetente *E. coli* Bakterien (Stamm: Top10) werden auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl Bakteriensuspension werden 10 µl des Ligationsansatzes bzw. 200 ng des zu transformierenden Plasmids gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C, wobei die DNA von den Bakterien aufgenommen wird. Nach kurzer Inkubation auf Eis werden 500 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien bei 37°C und 225 rpm für eine Stunde geschüttelt. Anschließend wird die Vorkultur bei 9000 rpm eine Minute zentrifugiert, 400 µl des Überstandes werden verworfen. Das Bakterienpellet wird in dem Restvolumen resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin [100 µg/ml] ausgestrichen. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C im Brutschrank können Einzelkolonien für das Animpfen von Mini-/Maxikulturen verwendet werden. Hierfür wird LB-Ampicillin-Medium [100 µg/ml] mit einer *E. coli* Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm rotiert.

### 2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

#### **Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)**

Für analytische Zwecke wird die Plasmid-DNA aus einer 2ml Bakterien-Flüssigkultur mit dem PeqGold Plasmid Miniprep-Kit I von Peqlab aufgereinigt.

#### **Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Maxi- Präparation)**

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (400–600 µg) wird diese aus einer 250 ml Übernachtskultur mittels des Maxi-Kits der Firma Macherey-Nagel (Nucleo Bond PC 500 Kit) aufgereinigt.

### 2.2.8 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Das Absorptionsmaximum einer verdünnten DNA-Lösung (in der Regel 1:10 verdünnt) liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm und ermöglicht die Konzentrationsbestimmung der präparierten Plasmid-DNA. Dabei entspricht eine Absorptionseinheit (AU) von 1,0 bei 260 nm 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Konzentration der Probe errechnet sich daher folgendermaßen:

$$\text{DNA Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Absorption}_{260 \text{ nm}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 50$$

Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt, kann der Quotient aus  $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$  zur Beurteilung der Reinheit der DNA-Präparation benutzt werden. Liegt der Wert unter 1,8, so weist dies auf eine Verunreinigung der DNA-Präparation mit Proteinen hin.

### 2.2.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte erfolgt in der Sequenzierabteilung des Georg-Speyer-Hauses (Margot Landersz, Dr. U. Dietrich) auf einem ABI 3100 Sequenzierautomaten. Die angewendete Methode basiert auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al.<sup>263</sup>. Zur Sequenzierung von Mini-/Maxipräparationen wird ein Ansatz aus 15 µl (0,5 µg) DNA und 1 µl 10 µM Primerlösung verwendet.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Auftauen und Einfrieren von Säugerzellen

Um Säugerzellen aus der Kryokonservierung aufzutauen, werden diese für zwei bis drei Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach dem Auftauen erfolgt die Aufnahme der Zellen in 10ml Kompletmedium sowie die Zentrifugation bei 1500rpm für fünf Minuten. Anschließend wird der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml Komplet-Medium re-suspendiert und die Zellen in einer Kulturflasche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zum Einfrieren werden etwa  $5 \cdot 10^7$  konfluente Zellen mit 4 ml Trypsin/EDTA von Gibco-Invitrogen GmbH (Karlsruhe) von dem Flaschenboden abgelöst bzw. die entsprechende Menge Suspensionszellen aus einer Kulturflasche entnommen. Die Zellen werden abzentrifugiert und das Zellpellet anschließend in Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO) re-suspendiert. Die präparierten Zellen werden in Aliquots à  $1 \cdot 10^7$  Zellen über Nacht bei -80°C gelagert und dann in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt.

### 2.3.2 Kultivierung von Säugerzellen

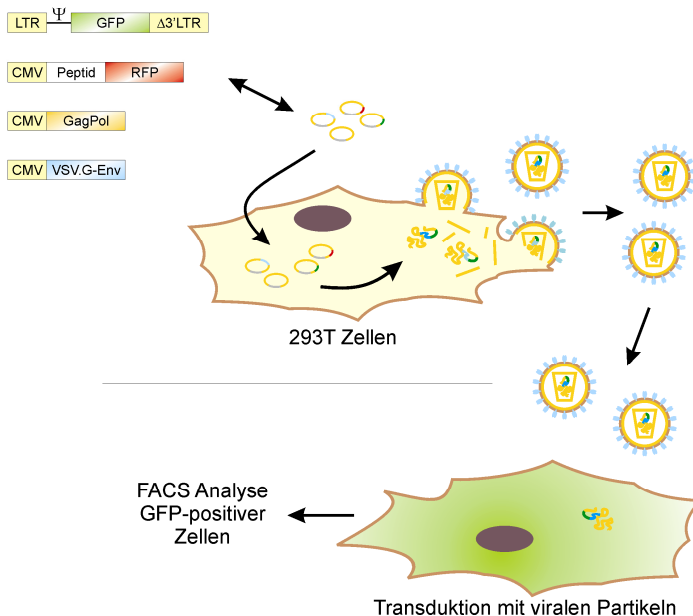
Die Kultivierung adhärenter Zelllinien wie 293T-, P4.R5 MAGI- sowie TZM-bl-Zellen erfolgt in DMEM-Kompletmedium, in einem Inkubator bei 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 37°C. Sobald die Zellen konfluent sind, werden diese 1x mit PBS gewaschen und drei bis fünf Minuten mit 4 ml Trypsin/EDTA bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen ablösen lassen. Das Trypsin/EDTA-Gemisch wird durch die Zugabe von DMEM-Kompletmedium inaktiviert. Anschließend werden die Zellen 1:5 bis 1:10 verdünnt und weiter passagiert. Suspensionszelllinien, wie PM1-Zellen, werden alle drei bis vier Tage 1:3 bis 1:5 in RPMI-Kompletmedium verdünnt und weiter kultiviert (Kapitel 2.1.14 und 2.1.15).

### 2.3.3 Retrovirale Vektoren

Die Verwendung retroviraler Vektoren in der Gentransfertechnologie begann etwa vor 20 Jahren und hat sich mittlerweile zu einer Standardmethode entwickelt. Der Erfolg retroviraler Vektoren beruht hauptsächlich auf der Einfachheit ihres Genoms sowie ihrer Eigenschaft, in das Zellgenom zu integrieren, welches eine Transgenexpression über einen langen Zeitraum in transduzierten Zellen sowie deren Nachkommen ermöglicht. Am häufigsten werden bislang von dem MoMLV (moloney murine leukaemia virus) abstammende Vektoren verwendet. Das Design der Vektoren basiert auf der Trennung von cis- und trans-aktiven Sequenzen auf verschiedenen Plasmiden. Dabei kodiert ein Konstrukt für die Transfervektor-RNA, welche keine viralen Proteine mehr exprimiert. Die viralen Proteine (Gag/Pol) sowie ein Hüllprotein (Env) werden in trans von zwei weiteren Plasmiden exprimiert, welche nicht in retrovirale Partikel verpackt werden. Da die entstehenden viralen Partikel nur das Vektorkonstrukt verpacken, ist der Infektionsprozess auf eine Runde limitiert (Transduktion). Ein weiterer Fortschritt in der Erhöhung der Biosicherheit wurde durch die Generierung selbst-inaktivierender (SIN) Vektoren erreicht. Bei diesen Transfervektoren ist ein großer Bereich der U3-Region, welche virale Enhancer und Promotoren enthält, im 3'-LTR Bereich deletiert. Die Transduktion solcher Transfervektoren resultiert während der Reversen Transkription in der Duplikation der Deletion im Bereich der 5'-LTR und schließlich zur transkriptionellen Inaktivierung beider LTRs. Dabei wird in transduzierten Zellen die Expression des Transgens von einem internen Promotor initiiert. Obwohl prinzipiell alle Vektoren, welche von der Familie der *Retroviridae* abstammen, retrovirale Vektoren sind, wird diese Bezeichnung in erster Linie für onkoretrovirale Vektoren verwendet. Lentivirale Vektoren unterscheiden sich von onkoretroviralen Vektoren dadurch, dass sie sich nicht-teilende sowie terminal differenzierte Zellen effizient transduzieren können.

Sowohl onkoretrovirale als auch lentivirale Vektoren können mit heterolog exprimierten Hüllproteinen pseudotypisiert werden. Das VSV.G-Hüllprotein (vesicular stomatitis virus glycoprotein) ermöglicht einen breiten Zielzelltropismus sowie die Produktion eines hohen Vektortiters. Durch Pseudotypisierung mit dem Gibbonaffenleukämievirus-Hüllprotein ist auch ein Gentransfer in schwer transduzierbare Zellen, wie z.B. primäre Zellen des hämatopoetischen Systems, möglich <sup>15,89,229,314</sup>.

### 2.3.3.1 Verpackung lentiviraler Vektoren



**Abbildung 2.14:** Schema zur Verpackung VSV.G-pseudotypierter, lentiviraler Vektoren. Es folgt die Transduktion von 293T Zellen und die FACS-Analyse GFP-positiver Zellen.

FACS-Analyse GFP-positiver, transduzierter Zellen (Abb. 2.14, Kapitel 2.3.6.1). Zur Verpackung lentiviraler Vektor-Genome in infektiöse Partikel werden folgende fünf Plasmide in 293T-Zellen transfiziert:

#### a) Transfervektor:

Der SIN Transfervektor pHRSEWcPPT enthält das verpackbare Transgen *gfp* sowie alle Sequenzen, welche für den Transfer und die Integration des Genoms in Zielzellen notwendig sind, wie das HIV-1 Verpackungssignal  $\Psi$  und die LTRs (Abb. 2.2). Dieser Vektor kodiert für keine viralen Gene. In transduzierten Zellen wird die Transkription des *gfp*-Transgens von einem internen SFFV-Promotor (spleen focus forming virus) initiiert. Das WPRE-Element (woodchuck hepatitis virus postregulatory element) am 3`Ende des Vektorgenoms führt zu einem gesteigerten Export der Vektor-mRNA in das Zytoplasma und verstärkt deren Polyadenylierung. Dadurch wird die Rate der verpackten RNA erhöht.

#### b) Verpackungskonstrukt:

Das Plasmid pCMVΔR8.91 kodiert für alle viralen Gene, welche für die Verpackung lentiviraler Vektoren notwendig sind (*gag*, *pol*, *rev* und *tat*). Die Expression der HIV-1 gruppenspezifischen Antigene (Gag), der Enzyme (Pol) sowie der regulatorischen Proteine Rev und Tat erfolgt unter CMV-Promotorkontrolle (Abb. 2.3).

Die funktionelle Analyse des identifizierten HKWPWW-Peptids als  $\Psi$ -RNA-Ligand erfolgt zunächst mittels des lentiviralen Drei-Plasmid Systems. Dabei werden lentivirale Pseudoviren, welche das Marker-gen *gfp* (green fluorescent protein) verpacken, in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins bzw. des GSGSGS-RFP-Kontrollproteins sowie des RFP-Proteins (red fluorescent protein) alleine produziert. Anschließend erfolgt die Bestimmung des infektiösen Titers der Pseudoviren über

**c) Hüllproteinkonstrukt:**

Zur Pseudotypisierung des pHRSEWcPPT Vektors wird das VSV.G-Hüllprotein von einem separaten Konstrukt, dem pMD2.VSV.G-Plasmid, exprimiert (Abb. 2.4). Die heterologe Expression des VSV.G Hüllproteins ermöglicht die Produktion von Vektoren mit hohem Titer und großer Partikelstabilität sowie mit einem breiten Zielzelltropismus<sup>89</sup>.

**d) Vektor zur Peptidexpression:**

Zur Expression des HKWPWW- bzw. des GSGSGS-Kontrollpeptids wird der pF25-RFP-Vektor verwendet (Abb. 2.1). Die für die Peptide kodierenden Oligonukleotide werden über SacII- und NdeI-Schnittstellen in den pF25-RFP-Vektor kloniert. Dieser Vektor exprimiert unter CMV-Promotorkontrolle das entsprechende Peptid N-terminal in Fusion mit RFP (pF25-X-RFP, X=Peptid) (Abb. 2.10 und 2.11).

**e) M288:**

Dieses eukaryontische Expressionsplasmid enthält einen CMV-Promotor und eine Klonierungsstelle (Abb. 2.9). Das Konstrukt wurde verwendet, um in jedem Transfektionsansatz die Plasmid-DNA-Menge auf die gleiche DNA-Gesamtmenge anzugleichen. Jeder Ansatz enthält dann die gleiche Menge an Plasmiden mit einem CMV-Promotor. Somit können etwaige Promotorinterferenzen oder unspezifische DNA-Effekte als Erklärung für unterschiedlich hohe Vektortiter ausgeschlossen werden.

**2.3.3.2 Verpackung retroviraler Vektoren**

Um zu überprüfen, ob HKWPWW-RFP spezifisch die Verpackung lentiviraler Vektor-RNA inhibiert, werden auch gammaretrovirale Pseudoviren in Anwesenheit des Peptides produziert und deren Titer bestimmt. Der verwendete gammaretrovirale Vektor pSRS11SFGFPpre stammt von dem murinen Leukämievirus (MLV) ab, verpackt ebenfalls das *gfp*-Markergen und wird mit VSV.G pseudotypisiert. Wenn das HKWPWW-RFP-Fusionsprotein spezifisch die Verpackung lentiviraler Vektoren hemmt, sollte kein Einfluss auf die Verpackung gammaretroviraler Vektoren zu beobachten sein. Die Versuchsdurchführung ist dabei analog zu der Verpackung lentiviraler Vektoren (Kapitel 2.3.3.1). Neben den Peptid-kodierenden pF25-X-RFP-Plasmiden, dem M288-Konstrukt sowie dem pMD2.VSV.G-Plasmid werden der gammaretrovirale Transfervektor sowie ein Konstrukt zur Expression der MLV Gag/Pol Proteine in 293T Zellen transfiziert:

**a) Transfervektor:**

Der SIN gammaretrovirale Transfervektor pSRS11SFGFPpre enthält das verpackbare Transgen *gfp* sowie das Verpackungssignal  $\Psi$  des MESV (murine embryonic stem cell virus). Die U3-Region im 5'-LTR Bereich stammt von dem Rous-Sarkoma-Virus (RSV), die Transkription in transduzierten Zellen erfolgt wie bei dem lentiviralen Transfervektor ebenfalls von einem internen SFFV-Promotor (Abb. 2.5).

**b) Verpackungskonstrukt:**

Das Plasmid pcDNA3.MLV g/p exprimiert die gruppenspezifischen Antigene sowie die Enzyme des murinen Leukämievirus, welche für die Verpackung gammaretroviraler Vektoren notwendig sind (*gag/pol*) unter CMV-Promotorkontrolle (Abb. 2.6).

**2.3.4 Transiente Kalzium-Phosphat Transfektion von 293T-Zellen zur Produktion lentiviraler/gammaretroviraler Pseudoviren**

Einen Tag vor der Transfektion werden  $1 \cdot 10^6$  293T-Zellen in 2 ml DMEM-Komplettmedium pro Loch in eine 6-Loch Zellkulturplatte ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen zu 70% bis 80% konfluent sein. Etwa zwei Stunden vor der Transfektion wird das Medium durch DMEM-Komplettmedium mit 25  $\mu$ M Chloroquine ersetzt. Jede Transfektion wird in Duplikaten angesetzt. Für die Herstellung des  $\text{CaPO}_4$ -DNA Präzipitats werden pro Ansatz zunächst folgende Komponenten gemischt:

2-4  $\mu$ g Plasmid-DNA (Transfervektor, Verpackungs- sowie Hüllproteinkonstrukt, pF25-X-RFP-Plasmide sowie M288-Plasmid) (Tab. 2.1 und 2.2)

6  $\mu$ l 2,5 M  $\text{CaCl}_2$

ad 60  $\mu$ l Aqua dest.

Anschließend werden 60  $\mu$ l 2x HeBS (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,1) zugegeben, die Ansätze gründlich gevortext und fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wird das  $\text{CaPO}_4$ -DNA Präzipitat tropfenweise auf den 293T-Zellen verteilt.



Plasmid-DNA	Ansatz			
	Ohne RFP-Konstrukt	HKWPWW-RFP	GSGSGS-RFP	RFP
<b>pHRSEWcPPT</b>	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg
<b>pCMVΔR8.91</b>	0,4 µg	0,4 µg	0,4 µg	0,4 µg
<b>VSV.G</b>	0,9 µg	0,9 µg	0,9 µg	0,9 µg
<b>pF25-X-RFP</b>	-	0,25 – 2,5 µg	0,25 – 2,5 µg	0,25 – 2,5 µg
<b>M288</b>	ad 2,77 µg	ad 2,77 µg	ad 2,77 µg	ad 2,77 µg

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung der Transfektionsansätze zur Herstellung lentiviraler Pseudoviren

Plasmid-DNA	Ansatz			
	Ohne RFP-Konstrukt	HKWPWW-RFP	GSGSGS-RFP	RFP
<b>pSRS11 SF GFPpre</b>	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
<b>pcDNA.3 MLV g/p</b>	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
<b>VSV.G</b>	0,9 µg	0,9 µg	0,9 µg	0,9 µg
<b>pF25-X-RFP</b>	-	0,25 – 0,75 µg	0,25 – 0,75 µg	0,25 – 0,75 µg
<b>M288</b>	ad 3,87 µg	ad 3,87 µg	ad 3,87 µg	ad 3,87 µg

**Tabelle 2.2:** Zusammensetzung der Transfektionsansätze zur Herstellung gammaretroviraler Pseudoviren

Nach Inkubation über Nacht wird das Medium gewechselt und die Transfektionseffizienz an einem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Die Virusüberstände werden 24 Stunden nach dem Mediumwechsel abgenommen (42 Stunden nach der Transfektion), über 0,22 µm Filter filtriert und in Aliquots bei –80°C gelagert. Diese Aliquots werden dann zur Bestimmung des Virustiters mittels Transduktion, zur p24-Konzentrationsbestimmung sowie zur Präparation viraler RNA verwendet.

### 2.3.5 Analyse der Viabilität transfizierter 293T-Zellen

Zunächst werden  $1 \cdot 10^6$  293T-Zellen in 2 ml DMEM-Komplettmedium pro Loch in eine 6-Loch Zellkulturplatte ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70% bis 80% werden die 293T-Zellen wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben mit 2,5 µg der pF25-X-RFP-Konstrukte transfiziert. Dabei erfolgen die Transfektionen in Duplikaten. 42 Stunden nach der Transfektion werden die transfizierten Zellen mit 100 µl Trypsin/EDTA pro Loch abgelöst und in 500 µl DMEM-Komplettmedium aufgenommen. Von dieser Zellsuspension mit einer Konzentration von etwa  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml werden 10 µl entnommen, in 10 ml Pufferlösung verdünnt und die Zellen an einem Casy<sup>®</sup>-Zellzählgerät der Firma Schärfe GmbH gemessen. Dabei misst das Casy<sup>®</sup>-Zellzählgerät über die digitale Analyse des elektrischen

Widerstands die Viabilität der Zellen in Prozent. Als Referenzwert werden in die Messung der Viabilität nicht-transfizierte 293T-Zellen eingesetzt. Aus den in Duplikaten durchgeführten Transfektionen erfolgt die Berechnung der mittleren Viabilitäten sowie die Standardabweichungen.

### 2.3.6 FACS-Analysen

Die Durchflusszytometrie (FACS) beruht auf der Messung fluoreszenzmarkierter Zellen nach der Laseranregung. Dabei erfolgt die Aufnahme unterschiedlicher Fluoreszenzen in separaten Kanälen. Das am Georg-Speyer-Haus zur Verfügung stehende FACS-Calibur-Gerät besitzt zur Anregung einen 488 nm sowie einen 635 nm Laser und vier Kanäle zu Detektion. Nach der Einstellung des FACS-Gerätes mit unbehandelten Zellen werden von jeder Probe 10.000 Zellen gezählt. Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzwerte sowie mittleren Fluoreszenzintensitäten erfolgt mittels der „Cell Quest Pro“-Software von BD Biosciences.

#### 2.3.6.1 Titerbestimmung viraler Vektoren

Die Titerbestimmung lenti- sowie retroviraler Vektorpartikel erfolgt mittels FACS-Analyse transduzierter Zellen. Hierzu wird die Expression des Reportergens *gfp* in den transduzierten Zellen herangezogen. Zunächst werden in einer 24-Loch Platte pro Loch  $1 \cdot 10^5$  293T-Zellen in 1 ml DMEM-Komplettmedium ausgesät. Am nächsten Tag werden Verdünnungsreihen der Vektorüberstände in DMEM Komplettmedium mit 8 µg/ml Polybrene angelegt. Dabei werden retrovirale Überstände 1:2 bis 1:20 verdünnt, während bei lentiviralen Überständen der Verdünnungsbereich bei 1:10 bis 1:200 liegt. Nach Zugabe der Vektorüberstände zu den 293T Zellen, werden diese drei Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend werden die transduzierten Zellen mit 100 µl Trypsin/EDTA pro Loch abgelöst und in FACS-Röhrchen mit 1 ml FACS-Puffer pro Ansatz überführt. Nach Zentrifugation bei 1500 rpm für fünf Minuten, folgt das Waschen mit FACS-Puffer und schließlich die Aufnahme der Zellen in 200 µl 1% FACS-Fixpuffer. Für die FACS-Analyse wird das GFP-Protein mit dem 488 nm Laser angeregt und im ersten Kanal (FL1) im Bereich von 515 – 545 nm nachgewiesen. Eine FACS-Probe wird ausgewertet, wenn der Anteil transduzierter Zellen zwischen 5% und 20 % liegt. Hierfür werden die produzierten Überstände entsprechend verdünnt. Der infektiöse Vektortiter errechnet sich wie folgt:

$$\text{Titer [tdu/ml]} = \left( \frac{\% \text{ GFP - positive Zellen}}{100} \right) \cdot 2 \cdot \text{ausgesäte Zellzahl} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

**Gleichung 2.1:** Formel zu Berechnung des infektiösen Titers in Zellkulturüberständen ausgehend von dem Anteil GFP-positiver Zellen in der FACS-Analyse.

Aus den Vektortitern der in Duplikaten durchgeführten Transfektionen werden die Mittelwerte errechnet und diese auf den mittleren Titer von 293T-Zellen bezogen, welche nicht mit pF25-X-RFP-Konstrukten kotransfiziert sind und nur Pseudoviren produzieren (Gleichung 2.2 A). Nach Berechnung der Standardabweichung (StabW) (Gleichung 2.2 B) erfolgt die Angabe des relativen Titers [%].

$$\mathbf{A} \quad \text{relativer Titer [\%]} = \left( \frac{\text{Mittelwert Titer}_{\text{Probe}}}{\text{Mittelwert Titer}_{\text{ohneRFP-Konstrukt}}} \right) \cdot 100$$

$$\mathbf{B} \quad \text{StabW [\%]} = \left( \frac{\text{StabW Titer}_{\text{Probe}}}{\text{Mittelwert Titer}_{\text{ohneRFP-Konstrukt}}} \right) \cdot 100$$

**Gleichung 2.2: A:** Formel zur Berechnung des relativen Titers in Zellkulturüberständen. **B:** Gleichung zur Berechnung der Standardabweichung.

### 2.3.6.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Der Anteil 293T-Zellen, welche mit den pF25-X-RFP-Konstrukten sowie den drei Plasmiden zur Produktion pseudotypisierter Lentiviren transfiziert sind, wird über FACS-Analyse bestimmt (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). Analog zur Absammlung der Überstände 42 Stunden nach der Transfektion werden pro Ansatz circa  $5 \cdot 10^5$  transfizierte 293T-Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und die Proben wie in Kapitel 2.3.6.1 beschrieben, aufgearbeitet. Anschließend erfolgt die FACS-Analyse der GFP-, RFP- sowie doppelt positiver-Zellen. Die Detektion des GFP-Proteins erfolgt in FL1, wie in Kapitel 2.3.6.1 beschrieben. Die RFP-Fusionsproteine werden ebenfalls mit dem 488 nm Laser angeregt und im zweiten Kanal (FL2) im Bereich von 585 – 606 nm detektiert.

### **2.3.6.3 FACS-Analyse und Sortierung stabiler Peptid-exprimierender PM1-Zellen**

Pro Zelllinie (PM1-HKWPWW-RFP und PM1-GSGSGS-RFP) werden etwa  $5 \cdot 10^5$  transduzierte PM1-Zellen in 1 ml FACS-Puffer suspendiert und die Proben wie in Kapitel 2.3.6.1 beschrieben vorbereitet. Es erfolgt die FACS-Analyse RFP-positiver Zellen wie in Kapitel 2.3.6.2 beschrieben. Die Sortierung RFP-positiver, transduzierter PM1-Zellen erfolgt an einem FACS-Aria Gerät. Es werden etwa  $5 \cdot 10^6$  transduzierte PM1-Zellen pro Sortierung eingesetzt.

Für die FACS-Sortierung werden von den transduzierten Zellen verschiedene Populationen ausgewählt, um die Expressionsraten der RFP-Konstrukte aneinander anzugleichen. Von den, das HKWPWW-RFP-Protein exprimierenden, PM1-Zellen wird die Population mit einer hohen Expressionsrate für die Sortierung ausgewählt. Hingegen erfolgt von den GSGSGS-RFP-exprimierenden Zellen die Selektion der schwach RFP-exprimierenden Zellen. Nach der Sortierung von etwa  $2 \cdot 10^4$  Zellen ist diese abgeschlossen und es folgt die Expansion und Kryokonservierung der PM1-Zelllinien.

### **2.3.6.4 Oberflächenantigenfärbung stabiler Peptid-exprimierender PM1-Zelllinien**

Mittels spezifischer Antikörper werden auf den stabilen PM1-Zelllinien (PM1-HKWPWW-RFP, PM1-GSGSGS-RFP sowie PM1 nativ) die für der HIV-Eintritt verantwortlichen CD4- sowie CXCR4-Rezeptoren angefärbt. Pro Ansatz werden  $5 \cdot 10^5$  PM1-Zellen in 1 ml FACS-Puffer suspendiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von jeweils 1  $\mu\text{g}$  murinen  $\alpha\text{-CD4}$  bzw.  $\alpha\text{-CXCR4}$  in separaten Ansätzen für eine Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunklen. Es folgt das zweimalige Waschen mit FACS-Puffer und die Zugabe von 150 ng APC-konjugierten (Allophycocyanin)  $\alpha\text{-Maus}$  Antikörpers pro Ansatz für eine Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunklen. Nach erneuten zweimaligen Waschen, werden die Zellen in 200  $\mu\text{l}$  1% FACS-Fixpuffer aufgenommen und am FACS analysiert. Die Messung RFP-positiver Zellen erfolgt wie in Kapitel 2.3.6.2 beschrieben. APC-positive Zellen werden mit dem 635 nm Laser angeregt und im vierten Kanal (FL4) im Bereich von 645 – 677 nm aufgenommen.

### **2.3.7 ELISA zur Bestimmung der p24-Konzentration in Zellkulturüberständen**

Ein Maß für die Produktion lentiviraler Partikel, welche von HIV-1 abstammen, ist die p24-Konzentration in Zellkulturüberständen. Dabei erfolgt die Detektion und Quantifizierung der p24-Konzentration in Zellüberständen mit dem Innotest<sup>®</sup> HIV Antigen mAb Kit der Firma Innogenetics nach Angaben des Herstellers. Der ELISA basiert dabei auf der Erkennung des HIV-1 Kapsidproteins p24 durch murine anti-p24-Antikörper.

Das Kit enthält ebenfalls eine Standardlösung, welche aus rekombinanten HIV-1 p24-Proteinen mit bekannter p24-Proteinkonzentration besteht. Um die p24-Konzentration in den Zellkulturüberständen zu ermitteln, wird eine Verdünnungsreihe der Standardlösung erstellt. Die zu testenden Zellkulturüberstände werden so verdünnt, dass die Absorptionswerte im linearen Bereich liegen (Extinktion < 2,5). Der Test wird anschließend nach Herstellerangaben durchgeführt. Es erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm sowie bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Nach Erstellung einer Standardkurve erfolgt mittels der linearen Regression die Quantifizierung der p24-Konzentration in den unbekanntenen Proben. Jede Probe wird in Duplikaten in den ELISA eingesetzt, anschließend erfolgt die Berechnung der Mittelwerte.

### **2.3.8 Semiquantitative PCR zum Nachweis viraler RNA in Zellkulturüberständen**

Um virale RNA in Zellkulturüberständen zu quantifizieren wird eine semiquantitative PCR durchgeführt. Es werden Zellkulturüberstände von 293T-Zellen verwendet, welche mit 0,75 µg der pF25-X-RFP-Konstrukte sowie mit den drei Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren transfiziert sind (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). Ziel ist es, mit spezifischen Primern für den pHRSEWcPPT-Vektor, die in Viren verpackte RNA zu quantifizieren. Daher werden für die Präparation der viralen RNA einheitliche p24-Mengen eingesetzt. Zunächst wird somit die Bestimmung der p24-Antigenkonzentration in den Überständen vorgenommen (Kapitel 2.3.7).

### 2.3.8.1 Präparation viraler RNA aus Zellkulturüberständen

Die virale RNA wird aus den Zellkulturüberständen mittels des QIAamp®RNA Mini Kits (Qiagen GmbH) nach Angaben des Herstellers präpariert. Für die Präparation der RNA wird die gleiche Menge des p24-Antigens eingesetzt (2 ng p24). Aus jedem Überstand wird die RNA in Duplikaten separat präpariert. Anschließend wird die isolierte RNA mit 2 µl (1 u/µl) DNase (Fermentas GmbH) bei 37°C für 60 Minuten behandelt um eine Kontamination der Proben mit Plasmid-DNA zu vermeiden. Nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 20 Minuten kann die virale RNA in die cDNA-Synthese eingesetzt werden.

### 2.3.8.2 Umschreiben der viralen RNA in cDNA

Vor der Quantifizierung der viralen RNA in der PCR wird diese zunächst mittels der Superscript™ II Reversen Transkriptase (Invitrogen GmbH) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wird der Primer PSI-cDNA verwendet, welcher spezifisch an die mRNA des Vektors pHRSEWcPPT bindet. Die aus dem MoMLV stammende Reverse Transkriptase weist eine reduzierte RNaseH-Aktivität sowie eine erhöhte thermische Stabilität auf.

Die Reaktion findet in dem mitgelieferten Puffer, in einem Endvolumen von 25 µl, statt. Die RNA wird vor der Zugabe zum Reaktionsansatz für zehn Minuten bei 80°C zur Auflösung von Tertiärstrukturen denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert.

#### RT-Reaktionsansatz:

Komponente	25 µl Ansatz
5x RT Puffer	5 µl
dNTPs [10 mM]	2 µl
Primer PSI cDNA [10 pmol/µl]	1 µl
Reverse Transkriptase [200 u/µl]	1 µl
RNase Out [40 u/µl]	1 µl
DTT [0,1 M]	2,5 µl
RNA	10 µl
H <sub>2</sub> O	2,5 µl

Die Reaktionsansätze werden zunächst zehn Minuten bei 25°C und anschließend 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Die cDNA wird dann in verschiedenen Verdünnungen in die semi-quantitative PCR eingesetzt.

### 2.3.8.3 Durchführung semiquantitativer PCRs

Die Quantifizierung viraler RNA in lentiviralen Überständen erfolgt mittels einer semi-quantitativen PCR (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). Die cDNA wird unverdünnt, 1:2, 1:4 sowie 1:10 verdünnt in die semi-quantitative PCR eingesetzt. Hierfür werden Primer verwendet, welche spezifisch für den pHRSEWcPPT-Vektor sind und um die HIV-1 Ψ-Region ein 251 bp langes Fragment amplifizieren. Die Reaktion wird mit der Taq DNA-Polymerase (Natu Tec GmbH) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### Reaktionsansatz:

Komponente	20 µl Ansatz
10x Amplifikationspuffer	2 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
Primer PSI-cDNA [10 pmol/µl]	0,5 µl
Primer PSI-fwd [10 pmol/µl]	0,5 µl
Taq DNA-Polymerase [5 u/µl]	0,5 µl
cDNA	2 µl
H <sub>2</sub> O	14 µl

#### Temperaturprofil

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1	1	95°C	3 min	Denaturierung
2	30	95°C	30 s	Denaturierung
		55°C	30 s	Hybridisierung
		72°C	30 s	Elongation
3		74°C	4 min	Vervollständigung

Nach Beendigung der PCR werden die Ansätze mit 6 µl 6x DNA-Probenpuffer versetzt und davon 9 µl auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt (Kapitel 2.2.2).

### 2.3.9 Detektion der HIV-1 Gag-Proteine mittels Western Blot

In 293T-Zellen, welche mit 0,75 µg der pF25-X-RFP-Konstrukte sowie mit den drei Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren transfiziert sind, wird die Expression des für die virale RNA-Verpackung verantwortliche HIV-1 Gag-Proteins mittels Western Blot nachgewiesen (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird mit einem 4%igen Sammelgel sowie einem 12%igen Trenngel in einer Bio-Rad Mini-PROTEAN<sup>®</sup>3 Kammer durchgeführt. Zur Probenvorbereitung werden  $2 \cdot 10^6$  transfizierte 293T-Zellen in 100 µl Western Blot Lysispuffer lysiert. Nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile bei 13000 rpm für fünf Minuten, wird eine Proteinbestimmung des Lysats an einem Nano Drop<sup>®</sup> Spektrophotometer durchgeführt. Das Lysat wird hierfür 1:5 verdünnt und anschließend die Absorption bei 280 nm gemessen. Dabei entspricht einer Absorptionseinheit von 1,0 bei 280 nm einer Proteinkonzentration von 1 µg/µl. Von jedem Transfektionsansatz werden 150 µg Gesamtprotein pro Tasche des SDS-Gels aufgetragen (x µl Probe, 2 µl 10x Probenpuffer, mit Aqua dest. auf 20 µl auffüllen). Nach dem Befüllen der Gelkammer mit 500 ml TGS, läuft das Gel eineinhalb Stunden bei 130 V. Anschließend werden das Gel sowie Nitrozellulosemembran und Whatman-Papier in Towbin Transfer-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgt mittels des Semi-Dry Verfahrens der Firma Bio-Rad. Die Proteine werden bei einer konstanten Stromstärke von 120 mA auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Dann folgt das Blocken mit 5% Milchpulver/PBST für eine Stunde bei Raumtemperatur sowie die Inkubation der Membran über Nacht bei 4°C mit einem humanen anti-p24 Antikörper (1:1500 in 5% MPBST). Am nächsten Tag wird die Membran fünfmal mit PBST gewaschen, es folgt die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Antikörper (1:2000 in PBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach fünfmaligen Waschen mit PBST wird die Western Blot Membran mit ECL-Lösung der Firma GE Healthcare nach Herstellerangabe auf einem Hyperfilm entwickelt.

Zum Entfernen der Antikörper wird die Nitrozellulosemembran 10 Minuten bei Raumtemperatur in 0,5 M Strippingpuffer inkubiert. Nach dem fünfmaligen Waschen mit Aqua dest. wird die Membran erneut mit 5% MPBST geblockt und über Nacht mit einem murinen anti-GAPDH Antikörper (1:7000 in 5% MPBST) inkubiert. Es folgt, wie oben beschrieben, das Waschen der Membran, die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Antikörper sowie abschließend die erneute Entwicklung der Western Blot Membran.



### 2.3.10 CLSM-Untersuchungen

Die konfokale Laserrastermikroskopie (CLSM) zeichnet sich durch ein besonders hohes Auflösungsvermögen aus. Dies wird dadurch ermöglicht, dass im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie nur Licht aus der Brennebene des Objektivs zur Bildentstehung beiträgt. Um ein vollständiges Bild des Objekts zu erhalten, wird das Objekt punktweise mit einem Laserstrahl abgerastert.

Das konfokale Prinzip ermöglicht eine genaue räumliche Detektion verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe sowie fluoreszierender Proteine. Mehrere Fluoreszenzsignale (z.B. bei Doppelmarkierungen) werden im identischen Präparat sequentiell aufgenommen. Dabei ist jedoch darauf zu achten, dass die Absorptionsmaxima der verschiedenen Fluorochrome bei unterschiedlichen Wellenlängen liegen. Durch das nachträgliche Übereinanderlegen der getrennt aufgenommen Kanäle mittels der Leica Software wird dann ein Mischbild erstellt. Die Aufnahmen werden mit einem 63x Objektiv durchgeführt und Schnittebenen in z- bzw. y-Richtung gewählt, die sich im Inneren der Zellen befinden.

#### 2.3.10.1 Zellfärbung zur Lokalisation der Peptid-RFP-Fusionproteine

Am CLSM wird das RFP-Protein mittels des 543 nm Lasers angeregt und im Bereich von 560 – 620 nm detektiert. Zur Färbung der Zellmembran wird Alexa Fluor 488 konjugiertes Concanavalin A (Invitrogen GmbH) mit einem  $Abs_{max}$  bei 495 nm verwendet. Die Anregung dieses Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt mit dem 488 nm Laser und die Detektion im Bereich von 500-530 nm. Die Zellkernfärbung wird mit dem Farbstoff TO-PRO<sup>®</sup>-3 (Invitrogen GmbH) durchgeführt, dessen Absorptionsmaximum bei 661 nm liegt. Am CLSM wird der Farbstoff mit dem 633 nm Laser angeregt und im Bereich von 650 – 690 nm detektiert.

In eine Mikroskopie-Schale mit Glasboden werden  $1 \cdot 10^6$  293T-Zellen in DMEM-Komplettmedium ausgesät und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag werden die Zellen mit 0,75 µg der Peptid-kodierenden pF25-X-RFP-Plasmide transfiziert und weiter kultiviert (Kapitel 2.3.4). Zwei Tage nach der Transfektion, werden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 2% PFA/PBS 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und danach erneut gewaschen. Zu den Zellen werden anschließend die 1:500 in PBS verdünnten Fluoreszenzfarbstoffe gegeben. Nach fünf Minuten lichtgeschützter Inkubation, werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und anschließend am CLSM analysiert.

### 2.3.10.2 Zellfärbung zur Lokalisation Rhodamin-konjugierter Peptide

In Chamber Slides werden am ersten Tag pro Loch  $1 \cdot 10^4$  P4.R5 MAGI-Zellen in DMEM-Komplettmedium ausgesät und über Nacht kultiviert. Analog zu dem Infektionsversuch erfolgt jeweils am dritten und vierten Tag die Zugabe von  $40 \mu\text{M}$  der Rhodamin-konjugierten Peptide ( $\text{Abs}_{\text{max}}$ : 543 nm) in serum-freien DMEM-Medium, wobei die Zellen nicht mit HIV-1 infiziert werden (Kapitel 2.3.13.3). Nach vier Stunden werden  $20 \mu\text{l}$  50% FCS/DMEM zugegeben. Am Tag fünf wird das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 2% PFA/PBS 20 Minuten fixiert. Nach dem Waschen und der Färbung der Zellmembran mit AlexaFluor488-konjugierten Concanavalin A werden die Objekte in Mowiol eingebettet und mit Deckgläschen eingedeckelt (Kapitel 2.3.10.1). Die Anregung und Detektion des ConA-AlexaFluor488-Konjugats erfolgt wie in Kapitel 2.3.10 beschrieben. Beide Rhodamin-konjugierten Peptide HKWPWW und GSGSGS werden mit dem 543 nm Laser angeregt und im Bereich von 570 nm bis 630 nm detektiert.

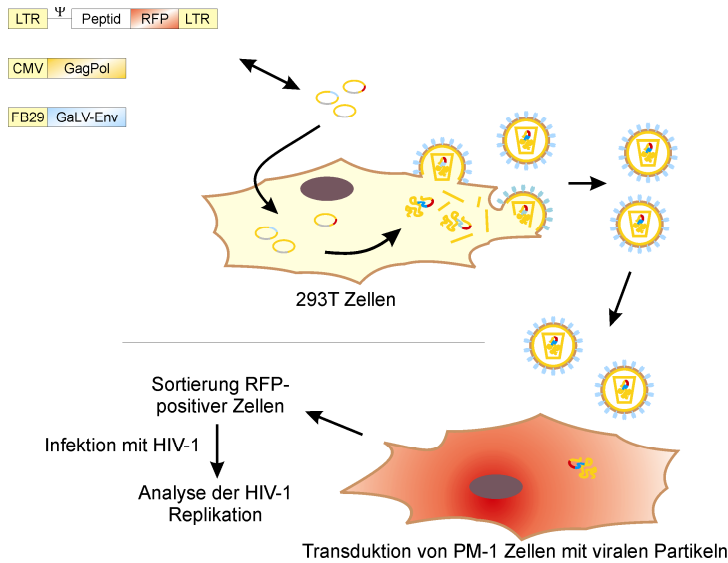
### 2.3.11 Generierung stabiler Peptid-exprimierender T-Zelllinien

Die Herstellung stabiler Peptid-exprimierender T-Zelllinien, beruht auf der Transduktion von PM1-Zellen mit den gammaretroviralen Transfervektoren M377-HKWPWW-RFP bzw. M377-GSGSGS-RFP (Abb. 2.12 und 2.13).

Es erfolgt die Pseudotypisierung der Vektoren mit dem GaLV-Hüllprotein, welches insbesondere für die Transduktion von PM1-Zellen geeignet ist. Zur Herstellung gammaretroviraler Pseudoviren, werden in 10 cm Zellkulturschalen  $6 \cdot 10^6$  293T-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit folgenden Plasmiden transfiziert:

12,5  $\mu\text{g}$  pcDNA.3 MLV g/p  
 1  $\mu\text{g}$  GaLV env  
 7,5  $\mu\text{g}$  M377-HKWPWW-RFP oder M377-GSGSGS-RFP  
 ad 500  $\mu\text{l}$  Aqua dest.

Die Herstellung der  $\text{CaPO}_4$ -DNA-Präzipitate erfolgt, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  2,5 M  $\text{CaCl}_2$  sowie 500  $\mu\text{l}$  2x HeBS.



**Abbildung 2.15:** Schema zur Verpackung retroviraler Vektoren, welche Peptid-RFP-Fusionsproteine exprimieren. Es folgt die Transduktion von PM1-Zellen mit Peptid-exprimierenden Vektoren und die Sortierung RFP-positiver Zellen.

Die Virusüberstände werden 24 Stunden nach dem Mediumwechsel abgesammelt, über 0,22  $\mu\text{m}$  Filter filtriert und zur Transduktion von PM1-Zellen verwendet (Abb. 2.15). In eine 24-Loch Platte werden  $1 \cdot 10^5$  PM1-Zellen pro Loch in 0,5 ml RPMI-Komplettmedium ausgesät. Anschließend werden pro Loch 0,5 ml Virusüberstand zugegeben, die Platte bei 2700 rpm und 31°C für eine Stunde zentrifugiert. Nach drei Tagen Kultivierung der transduzierten

PM1-Zellen, wird von jedem Ansatz ein Aliquot entnommen (ca.  $1 \cdot 10^5$  Zellen) und für die FACS-Analyse RFP-positiver Zellen verwendet. Die transduzierten PM1-Zellen werden expandiert, am FACS sortiert und kryokonserviert (Kapitel 2.3.6.3).

### 2.3.12 HIV-Infektion stabiler Peptid-exprimierender PM1-Zelllinien

In einer 24 Loch-Platte werden pro Loch  $1 \cdot 10^5$  stabile PM1 Zelllinien (PM1-HKWPWW-RFP, PM1-GSGSGS-RFP sowie PM1 nativ) in 500  $\mu\text{l}$  RPMI-Komplettmedium ausgesät. Anschließend erfolgt über Nacht bei 37°C die Infektion in Triplikaten mit dem CXCR4-tropen HIV-1 Stamm NL4-3 bei einer MOI (multiplicity of infection) von 0,013. Am nächsten Tag werden die infizierten Zelllinien dreimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen und anschließend 200  $\mu\text{l}$  Überstand zur p24-Antigenbestimmung abgenommen (Kapitel 2.3.7). Die erneute Abnahme von Überständen zur p24-Antigenbestimmung erfolgt fünf Tage nach der Infektion.

### 2.3.13 Analyse der antiviralen Aktivität Rhodamin-konjugierter Peptide

Um eine mögliche inhibitorische Wirkung des Rhodamin-konjugierten Peptids HKWPWW-SQP-KRRKK auf die HIV-1 Replikation zu analysieren, werden P4.R5 MAGI-Zellen verwendet. Nach Infektion dieser Zellen mit HIV-1 in vierfachen Ansätzen sowie Zugabe der Peptide, wird die Infektiosität der produzierten Überstände bestimmt. Hierfür werden die Überstände auf der Indikatorzelllinie TZM-bl getitert. Diese exprimieren das Reportergenym Luziferase über einem HIV-1 Promotor (Kapitel 2.1.14). Die Luziferase-Expression in den Zelllysaten ist ein direktes Maß für den Titer der viralen Präparation.

#### 2.3.13.1 Infektionstest mit HIV-1<sub>LAI</sub>

P4.R5 MAGI-Zellen werden in vierfachen Ansätzen mit verschiedenen Mengen HIV-1<sub>LAI</sub> infiziert sowie die Länge der Infektion variiert. Nach dem Aussäen von  $1 \cdot 10^4$  P4.R5 MAGI-Zellen pro Loch in einer 96-Loch Platte in DMEM-Komplettmedium (Tag 1) erfolgt am zweiten Tag die Infektion mit verschiedenen Virusmengen für vier Stunden bzw. über Nacht. Das Virus wird nach diesem Zeitraum mit PBS ausgewaschen. Darauf werden im Abstand von jeweils 24 Stunden über einen Zeitraum von sechs Tagen die Überstände abgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.3.13.2 Titerbestimmung auf TZM-bl Zellen

Pro Loch werden  $1 \cdot 10^4$  TZM-bl-Zellen in DMEM-Komplettmedium einer 96-Loch Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgt die Entfernung des Mediums von den Zellen sowie die 1:2 Verdünnung der HIV-1-haltigen Überstände in DMEM-Komplettmedium mit  $8 \mu\text{g/ml}$  Polybrene. Anschließend werden die Überstände auf die Zellen gegeben und nach der Zentrifugation für eine Stunde bei  $31^\circ\text{C}$  und 2700 rpm erfolgt die Kultivierung der Zellen für weitere 44 Stunden.

Nach Abnahme des Mediums werden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und pro Loch für 15-20 Minuten mit  $110 \mu\text{l}$  Harvestpuffer lysiert. Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität werden pro Loch  $20 \mu\text{l}$  Zelllysate in weiße 96-Loch Luminometer-Platten übertragen. Nach Mischung von Luziferin sowie Luziferase-Puffer im Verhältnis 1:1, werden hiervon pro Loch  $50 \mu\text{l}$  injiziert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgt an einem Luminometer (BMG Labtech GmbH) mit folgenden Einstellungen:

<i>Microplate:</i> Dynatech 96	<i>Starinterval:</i> 1
<i>No. of intervals:</i> 30	<i>Stopinterval:</i> 30
<i>Measurement Interval time:</i> 0,25 s	<i>Test Type:</i> well mode
<i>Positioning delay:</i> 0,1 s	<i>Reading direction:</i> horizontal
<i>Total measurement time/well:</i> 7,5 s	<i>Evaluation type:</i> sum
<i>Gain:</i> 255	

Aus den gemessenen Werten der Luziferaseaktivität (LU, light units) erfolgt die Berechnung der Mittelwerte. Bei den Experimenten zur Testung der antiviralen Wirksamkeit werden die Mittelwerte auf die mittlere Luziferaseaktivität von TZM-bl-Zellen normiert, welche nur mit virushaltigen Überständen inkubiert wurden (ohne vorherige Peptidzugabe):

$$\mathbf{A} \quad \text{relative Luziferaseaktivität [\%]} = \left( \frac{\text{Mittelwert LU}_{\text{Probe}}}{\text{Mittelwert LU}_{\text{ohnePeptid}}} \right) \cdot 100$$

$$\mathbf{B} \quad \text{StabW [\%]} = \left( \frac{\text{StabW LU}_{\text{Probe}}}{\text{Mittelwert LU}_{\text{ohnePeptid}}} \right) \cdot 100$$

**Gleichung 2.3: A:** Formel zur Berechnung der relativen Luziferaseaktivität als Maß des infektiösen Titers von Zellkulturüberständen. **B:** Formel zur Ermittlung der Standardabweichung.

Nach Berechnung der Standardabweichung (Gleichung 2.3 B) erfolgt die Angabe der relativen Luziferaseaktivität [%].

### 2.3.13.3 Transduktion infizierter P4.R5 MAGI-Zellen mit Peptiden

In einer 96-Loch Platte werden am ersten Tag pro Loch  $1 \cdot 10^4$  P4.R5 MAGI-Zellen ausgesät und am nächsten Tag über Nacht bei 37°C mit HIV-1<sub>LAI</sub> bei einer MOI von 0,5 infiziert. Am dritten Tag folgt nach dem Waschen mit PBS die erste Zugabe von 100 µl Rhodamin-konjugierter Peptide pro Loch in serum-freien DMEM-Medium in vierfachen Ansätzen. Nach vier Stunden Inkubation werden pro Loch 20 µl 50% FCS/DMEM zugegeben und die Zellen weitere 20 Stunden inkubiert. Es erfolgt anschließend die Abnahme der Peptidlösung (am vierten Tag) und die erneute Zugabe Rhodamin-konjugierter Peptide wie oben beschrieben. Nach weiteren 24 Stunden (am fünften Tag) werden die peptidhaltigen Überstände von den P4.R5 MAGI-Zellen abgenommen, verdünnt und damit TZM-bl-Zellen infiziert, um den Titer der viralen Präparationen zu bestimmen (Kapitel 2.3.13.2).

### 2.3.13.4 Zytotoxizitätstest Peptid-behandelter P4.R5 MAGI- und TZM-bl-Zellen

Um zu bestimmen, ob die Rhodamin-konjugierten Peptide toxische Effekte auf P4.R5 MAGI-, TZM-bl- bzw. 293T- Zellen ausüben, erfolgt die Bestimmung der Zellproliferation mittels des Zytotoxizitätskits ViaLight<sup>®</sup> Plus der Firma Cambrex. Das Kit basiert auf der luminometrischen Messung von ATP in lebenden Zellen.

Der Zytotoxizitätstest von peptidbehandelten P4.R5-MAGI- bzw. TZM-bl-Zellen erfolgt analog wie die Testung der antiviralen Aktivität der Peptide in diesen Zellen in vierfachen Ansätzen, wobei die Zellen nicht mit HIV-1 infiziert werden (Kapitel 2.3.13.2 und 2.3.13.3). Am Tag fünf erfolgt die Abnahme der Überstände und die Messung der Viabilität der P4.R5. MAGI-Zellen. Die abgenommenen peptidhaltigen Überstände werden anschließend 1:2 verdünnt für weitere 44 Stunden auf TZM-bl-Zellen gegeben, darauf wird die Viabilität der TZM-bl-Zellen gemessen.

Für die Analyse der Viabilität von 293T-Zellen werden diese, korrespondierend zu der Analyse der virolytischen Aktivität, über einen Zeitraum von drei Tagen mit den verdünnten Rhodamin-konjugierten Peptiden inkubiert (Ansätze in Triplikaten).

Zur Bestimmung der Viabilität werden die Zellen mit 50 µl Lyse-Reagenz pro Loch 10 Minuten lysiert. Dann erfolgt die Übertragung der Proben in weiße Luminometer-Platten und die weitere Durchführung des Tests nach Angaben des Herstellers. Die luminometrische Messung der Toxizität erfolgt ohne Substratinjektion. Folgende Einstellungen sind hierfür am Luminometer vorzunehmen:

<i>Microplate:</i> Dynatech 96	<i>Starinterval:</i> 1
<i>No. of intervals:</i> 40	<i>Stopinterval:</i> 40
<i>Measurement Interval time:</i> 0,25 s	<i>Test Type:</i> well mode
<i>Positioning delay:</i> 0,5 s	<i>Reading direction:</i> horizontal
<i>Total measurement time/well:</i> 10 s	<i>Evaluation type:</i> sum
<i>Gain:</i> 190	

Nach Bestimmung der Luziferaseaktivität (LU) der Proben erfolgt die Berechnung der Mittelwerte und der Bezug dieser auf die mittlere Luziferaseaktivität von unbehandelten Zellen (Gleichung 2.4).

$$\text{Viabilität [\%]} = \left( \frac{\text{Mittelwert LU}_{\text{Probe}}}{\text{Mittelwert LU}_{\text{unbehandelte Zellen}}} \right) \cdot 100$$

**Gleichung 2.4:** Formel zur Berechnung der Viabilität von Zellen nach der Peptidbehandlung.

Die Berechnung der Standardabweichungen erfolgt analog zu Gleichung 2.3 B, anschließend wird die prozentuale Viabilität der Zellen angegeben.

### 2.3.13.5 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in infizierten P4.R5 MAGI-Zellen

P4.R5 MAGI-Zellen exprimieren  $\beta$ -Galaktosidase unter HIV-1 Promotorkontrolle. Die Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Reporterenzym ist somit ein Maß für die Tat-abhängige Aktivierung des HIV-1 Promotors. Um eine mögliche Inhibition der frühen Replikationsschritte von HIV-1 zu analysieren, werden in einer 96-Loch Platte am  $1 \cdot 10^4$  P4.R5 MAGI-Zellen ausgesät (Tag 1). Am nächsten Tag erfolgt die Infektion der Zellen für zwei Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  mit HIV-1<sub>LAI</sub> bei einer MOI von 1,4. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS werden in vierfachen Ansätzen pro Loch 100  $\mu\text{l}$  Rhodamin-konjugierter Peptide in serum-freien DMEM-Medium zugegeben. Nach vier Stunden Inkubation werden pro Loch 20  $\mu\text{l}$  50% FCS/DMEM zugegeben und die Zellen weitere 46 Stunden inkubiert. Es folgt anschließend die Abnahme der Peptidlösung (am vierten Tag), das Waschen der Zellen und die Zelllyse in 50  $\mu\text{l}$  Harvestpuffer pro Loch. Zur Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität werden pro Loch 6  $\mu\text{l}$  Lysat in weiße Luminometer-Platten übertragen, in welche pro Loch 34  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Galaktosidase-Reaktionspuffer vorgelegt wurden. Anschließend erfolgt die Injektion von 25  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Galaktosidase Amplifier pro Loch sowie die luminometrische Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mit folgenden Geräteeinstellungen:

<i>Microplate:</i> Dynatech 96	<i>Starinterval:</i> 1
<i>No. of intervals:</i> 50	<i>Stopinterval:</i> 50
<i>Measurement Interval time:</i> 0,2 s	<i>Test Type:</i> well mode
<i>Positioning delay:</i> 0,5 s	<i>Reading direction:</i> horizontal
<i>Total measurement time/well:</i> 10 s	<i>Evaluation type:</i> sum
<i>Gain:</i> 250	

Aus den gemessenen Werten der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (LU) werden die Mittelwerte berechnet und auf die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von HIV-infizierten, jedoch nicht mit Pepti-

den behandelten P4.R5 MAGI-Zellen normiert (Gleichung 2.5). Die Errechnung der Standardabweichung erfolgt analog zu Gleichung 2.3 B und die Darstellung der relativen Galaktosidaseaktivität [%].

$$\text{relative } \beta\text{-Galaktosidaseaktivität } [\%] = \left( \frac{\text{Mittelwert LU}_{\text{Probe}}}{\text{Mittelwert LU}_{\text{ohne Peptid}}} \right) \cdot 100$$

**Gleichung 2.5:** Formel zur Berechnung der relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in mit HIV-infizierten P4.R5 MAGI-Zellen

### 2.3.14 Analyse der virolytischen Aktivität Rhodamin-konjugierter Peptide

Zunächst werden, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, lentivirale Pseudoviren hergestellt, welche das *gfp*-Gen verpacken. Wobei keine pF25-RFP-Plasmide kotransfiziert werden. Zur Bestimmung einer möglichen virolytischen Aktivität der Rhodamin-konjugierten Peptide werden diese in 10  $\mu$ l PBS verdünnt und mit 10  $\mu$ l der lentiviralen Überstände für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Um die Infektiosität der Viren nach der Peptidbehandlung zu bestimmen, werden die Überstände anschließend auf 293T-Zellen getitert. Zur Transduktion wird das Gemisch 1:200 verdünnt und in Duplikaten auf 293T-Zellen gegeben. Nach drei Tagen erfolgt die Bestimmung des viralen Titers mittels FACS-Analyse transduzierter, GFP-positiver Zellen wie in Kapitel 2.3.6.1 beschrieben. Es erfolgt die Normierung der Titer auf den mittleren Titer von Pseudoviren, welche nicht mit Peptiden behandelt wurden (Gleichung 2.6). Nach Berechnung Standardabweichungen analog zu Gleichung 2.3 B wird der relative Titer [%] angegeben.

$$\text{relativer Titer } [\%] = \left( \frac{\text{Mittelwert Titer}_{\text{Probe}}}{\text{Mittelwert Titer}_{\text{ohne Peptid}}} \right) \cdot 100$$

**Gleichung 2.6:** Formel zur Berechnung des relativen Titers von Pseudoviren nach Peptidbehandlung.



### 3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die zuvor mittels der Phage Display Technologie selektierten Peptidliganden für die  $\Psi$ -RNA zunächst hinsichtlich ihrer Affinität optimiert werden. Ferner erfolgte die funktionelle Charakterisierung und die Testung der antiviralen Aktivität eines optimierten Peptids, welches dann die Interaktion mit dem p55<sup>Gag</sup>-Polyprotein inhibieren und die Verpackung von HIV-1 RNA in knospende Viruspartikel verhindern sollte.

#### 3.1 Optimierung selektierter Peptidliganden

Die Affinität der in vorangegangenen Arbeiten selektierten Peptide lag lediglich im höheren mikromolaren Bereich. So lagen die  $K_D$ -Werte des am besten bindenden Peptids (HWWPWW) bei etwa 25  $\mu$ M für die gesamte  $\Psi$ -RNA bzw. bei 34  $\mu$ M für SL3-RNA. Auch konnte für dieses Peptid keine konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkung auf die Verpackung von HIV-1 nachgewiesen werden<sup>71,239,240</sup>. Für etwaige therapeutische Anwendungen stand zunächst die Optimierung der Affinität der selektierten Peptidliganden im Vordergrund.

In Kooperation mit Prof. Harald Schwalbe aus dem Institut für Organische Chemie sowie PD Joachim Koch aus dem Institut für Biochemie an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt wurde eine Methode zur Optimierung der Bindungsaffinität der Peptide an die  $\Psi$ -RNA etabliert (sogenannte Spot-Synthese-Peptidmembranen). Hierfür erfolgte die Synthese von permutierten Peptidsequenzen des zuvor selektierten HWWPWW-Peptids auf Nitrozellulose-Membranen. Die *in vitro* transkribierte  $\Psi$ -RNA sowie eine Kontroll-RNA (ein Teil der mRNA des humanen CCR5-Rezeptors) wurden mit einem HRP-konjugierten DNA-Oligo hybridisiert. Nach Inkubation des Peptid-Arrays mit der komplexierten  $\Psi$ -RNA wurde dieser mit RNase behandelt, gewaschen und anschließend mit CCR5-RNA inkubiert. Der Nachweis gebundener RNA über Chemilumineszenz zeigte, dass nur Peptide mit einem Arginin oder Lysin an einer Position innerhalb des 6mer Peptids spezifisch mit  $\Psi$ -RNA reagierten. Das Peptid HKWPWW wurde aufgrund der Löslichkeit sowie dessen Bindungseigenschaften für die  $\Psi$ -RNA für die weitergehenden Analysen ausgewählt<sup>72</sup>.

## 3.2 Bindungseigenschaften des optimierten HKWPWW-Peptids

Die Analyse der Affinität des optimierten HKWPWW-Peptids für SL3-RNA erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Yves Mély über Fluoreszenz-Spektroskopie an der Universität Louis Pasteur in Straßburg, Frankreich. Dabei erfolgte die Messung des Quenchings der Tryptophan-Fluoreszenz des HKWPWW-Peptids nach Zugabe der SL3-RNA. Die Titration steigender Mengen SL3-RNA zu einer konstanten Menge Peptid ergab eine Affinität von  $1,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$  des HKWPWW-Peptids für SL3-RNA. Somit ist die Affinität des optimierten Peptids etwa 30-fach höher als die des zuvor selektierten Peptids <sup>72</sup>.

Des weiteren gelang es, über NMR-Analysen in der Gruppe von Prof. Schwalbe die Bindung des HKWPWW-Peptids an SL3-RNA weiter zu charakterisieren. So konnte eine spezifische Bindung des Peptids an den GGAG-Loop der SL3-RNA nachgewiesen werden. Das HKWPWW-Peptid bindet somit an die gleiche Region der SL3-RNA wie der natürliche Ligand NCp7 <sup>61</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaft sowie der verbesserten Affinität, war das Ziel der Arbeit, eine mögliche antivirale Aktivität des Peptids auf die HIV-1-Verpackung umfassend zu analysieren. Hierfür wurden drei Ansätze gewählt: Zunächst wurde die Peptidkodierende Sequenz in Fusion mit dem *rfp*-Gen über klassische DNA-Transfektion in 293T-Zellen exprimiert, welche gleichzeitig lentivirale Pseudoviren produzierten. Des weiteren erfolgte die Etablierung einer stabilen peptid-exprimierenden T-Zelllinie, welche mit replikations-kompetenten HIV-1 infiziert werden kann. Darüber hinaus wurde ein Transportsystem für das freie Peptid in eukaryotische Zellen etabliert. Hierfür erfolgte die Transduktion des Rhodamin-kojugierten Peptids mittels einer Proteintransduktionsdomäne in mit HIV-1 infizierte Zellen.

## 3.3 Expression des HKWPWW-Peptids in Fusion mit RFP über transiente Transfektion

### 3.3.1 Assay zur Testung der antiviralen Aktivität des HKWPWW-Peptids

Im Rahmen der funktionellen Analyse des Peptids wurde der Effekt auf die Verpackung lentiviraler Vektoren untersucht. Dieses Vektorsystem beruht auf der Produktion von Pseudoviren, welche in Anwesenheit der HIV-1 Gag/Pol-Proteine sowie der VSV.G-

Hüllproteine die RNA-Genome des GFP-Vektors (enthält das HIV-1  $\Psi$ -Signal) verpacken (Abb. 2.14). Die Affinität des natürlichen Liganden NCp7 für die  $\Psi$ -RNA liegt bei etwa 50 nM und ist somit 20-fach höher als die des optimierten HKWPWW-Peptids<sup>20,46,72</sup>. Aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit von Peptiden, war eine Voraussetzung für die Erzielung einer antiviralen Wirksamkeit eine möglichst stabile und hohe Expressionrate des Peptids<sup>172,265</sup>. Des Weiteren war die zytoplasmatische Expression des Peptids erforderlich, um eine Inhibition der in diesem Kompartiment stattfindenden Gag- $\Psi$ -RNA-Interaktion zu erreichen (Kapitel 1.3)<sup>44,159,232,294</sup>. Ferner sollte die Expression der Peptid-RFP-Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bzw. konfokaler Laserrastermikroskopie nachweisbar sein. Um diese Herausforderungen zu erfüllen, wurde der pF25-RFP-Vektor ausgewählt (Abb. 2.1). Es erfolgte die Klonierung der Peptidkodierenden Oligo-Sequenzen des HKWPWW- sowie des GSGSGS-Kontrollpeptids N-terminal in Fusion mit dem *rfp*-Gen. Zur Analyse der antiviralen Wirksamkeit wurde das pF25-HKWPWW-RFP-Konstrukt sowie die drei Plasmide zur Produktion pseudotypisierter Lentiviren in 293T-Zellen transfiziert (Abb. 2.10, Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). Als negative Kontrollen dienten das pF25-GSGSGS-RFP- sowie das pF25-RFP-Konstrukt (Abb. 2.11 und 2.1). Bei einer inhibitorischen Aktivität des HKWPWW-Peptids, sollten in dessen Anwesenheit weniger infektiöse Pseudoviren produziert werden als in Gegenwart des GSGSGS-RFP- bzw. des RFP-Proteins. Daher wurden nach der Transfektion zum einen der infektiöse Titer sowie zum anderen die Pseudoviruskonzentration in den Zellkulturüberständen gemessen (Kapitel 3.3.8 und 3.3.9). Ferner erfolgte die Untersuchung der generierten Pseudoviren auf deren  $\Psi$ -RNA Gehalt (Kapitel 3.3.10). Um die Spezifität der Inhibition für lentivirale Partikel zu analysieren, wurden in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Fusionsproteins gammaretrovirale Pseudoviren hergestellt und deren Titer bestimmt (Kapitel 3.3.12).

### 3.3.2 Titration der Plasmide zur Produktion pseudotypisierter Lentiviren

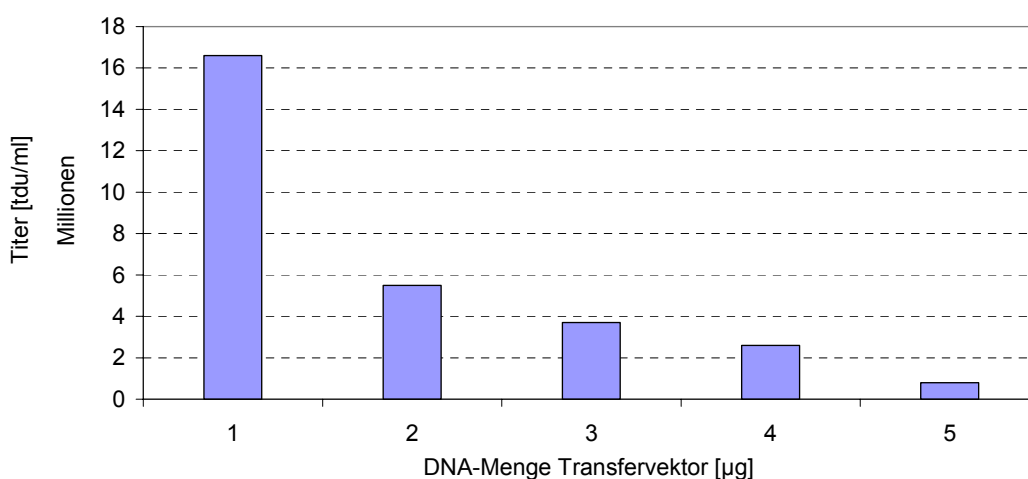
Da die Affinität des HKWPWW-Peptids 20-fach geringer ist als die des Gag-Proteins für die  $\Psi$ -RNA, sollten in den Inhibitionsexperimenten die  $\Psi$ -RNA sowie das Gag-Protein nicht in einem großen Überschuss vorliegen (Kapitel 1.3 und 3.2)<sup>20,46,72</sup>.

Zunächst wurde der das HIV-1  $\Psi$ -Signal enthaltende Transfervektor pHRSEWcPPT titriert (Abb. 2.2). Ziel war es, zu analysieren, welche Menge des Transfervektors transfiziert werden muss, um einen moderaten Titer zu produzieren. Hierfür wurden konstante Men-

gen der Gag/Pol- und Hüllprotein-kodierenden Plasmide in die Transfektion eingesetzt (1,6  $\mu\text{g}$  pCMV $\Delta$ R8.91 und 0,9  $\mu\text{g}$  pMD2.VSV.G), während die Menge des pHRSEWcPPT-Vektors variierte (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). 42 h nach der Transfektion erfolgte die Ab-sammlung der virushaltigen Überstände sowie die Titration auf 293T-Zellen. Der Titer der viralen Präparationen errechnet sich aus der FACS-Analyse GFP-positiver Zellen über folgende Formel (Kapitel 2.3.6.1):

$$\text{Titer [tdu/ml]} = \left( \frac{\% \text{ GFP - positive Zellen}}{100} \right) \cdot 2 \cdot \text{ausgesäte Zellzahl} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

**Gleichung 3.1:** Formel zur Berechnung der Titer viraler Präparationen über FACS-Analyse GFP-positiver, transduzierter Zellen.

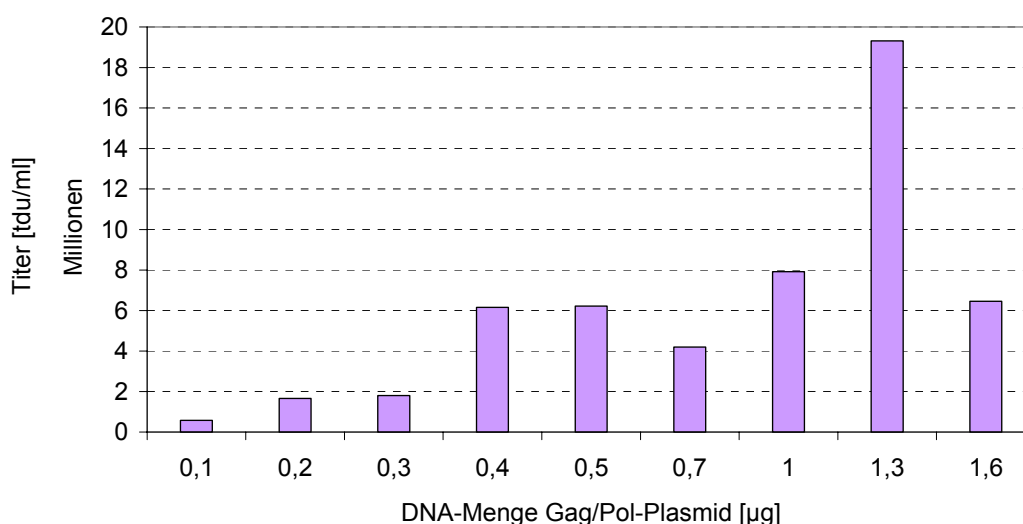


**Abbildung 3.1:** Titration des lentiviralen Transfervektors pHRSEWcPPT. Für die Transfektion von 293T-Zellen wurden konstanten Mengen des HIV-1 Gag/Pol- (1,6  $\mu\text{g}$ ) sowie des VSV.G-Plasmids (0,9  $\mu\text{g}$ ) verwendet, während die Menge des GFP-Transfervektors variierte. Die Bestimmung des Virustiters der Überstände erfolgte 42 Stunden nach der Transfektion über Transduktion von 293T-Zellen und nachfolgender FACS-Analyse GFP-positiver Zellen.

Die Transfektion steigender Mengen des Transfervektors führt zu einer Abnahme des viralen Titers (Abb. 3.1). Der höchste Titer mit  $1,6 \cdot 10^7$  tdu/ml (transducing units) ist bei der Transfektion von 1  $\mu\text{g}$  des Transfervektors zu beobachten. Die Transfektion größerer Mengen des Transfervektors resultiert in einer Abnahme der Produktion lentiviraler Pseudoviren. Dies deutet darauf hin, dass sich die Expression der  $\Psi$ -RNA unter den gegebenen Gag/Pol- und Hüllproteinkonzentrationen bereits bei der Transfektion von 1  $\mu\text{g}$  Transfektor in der Sättigung befindet. Für die weiteren Experimente wird daher eine Menge von 0,5  $\mu\text{g}$  des Transfervektors ausgewählt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Titration des Gag/Pol-kodierenden pCMV $\Delta$ R8.91-Plasmids (Abb. 2.3). Es war das Ziel, zu untersuchen, welche Menge des pCMV $\Delta$ R8.91-Plasmids

transfiziert werden muss, um einen moderaten Titer zu erreichen. Es wurde hierfür die oben ermittelte Menge des Transfervektors eingesetzt. Bei konstanten Mengen des Transfervektors und des pMD2.VSV.G-Plasmids (0,5 µg pHRSEWcPPT und 0,9 µg pMD2.VSV.G), erfolgte die Variierung der Mengen des Gag/Pol-Plasmids pCMV $\Delta$ R8.91 im Bereich von 0,1 bis 1,6 µg. Nach Absammlung der Überstände und deren Titration auf 293T-Zellen erfolgte die Bestimmung des Virustiters (Kapitel 2.3.4 und 2.3.6.1).



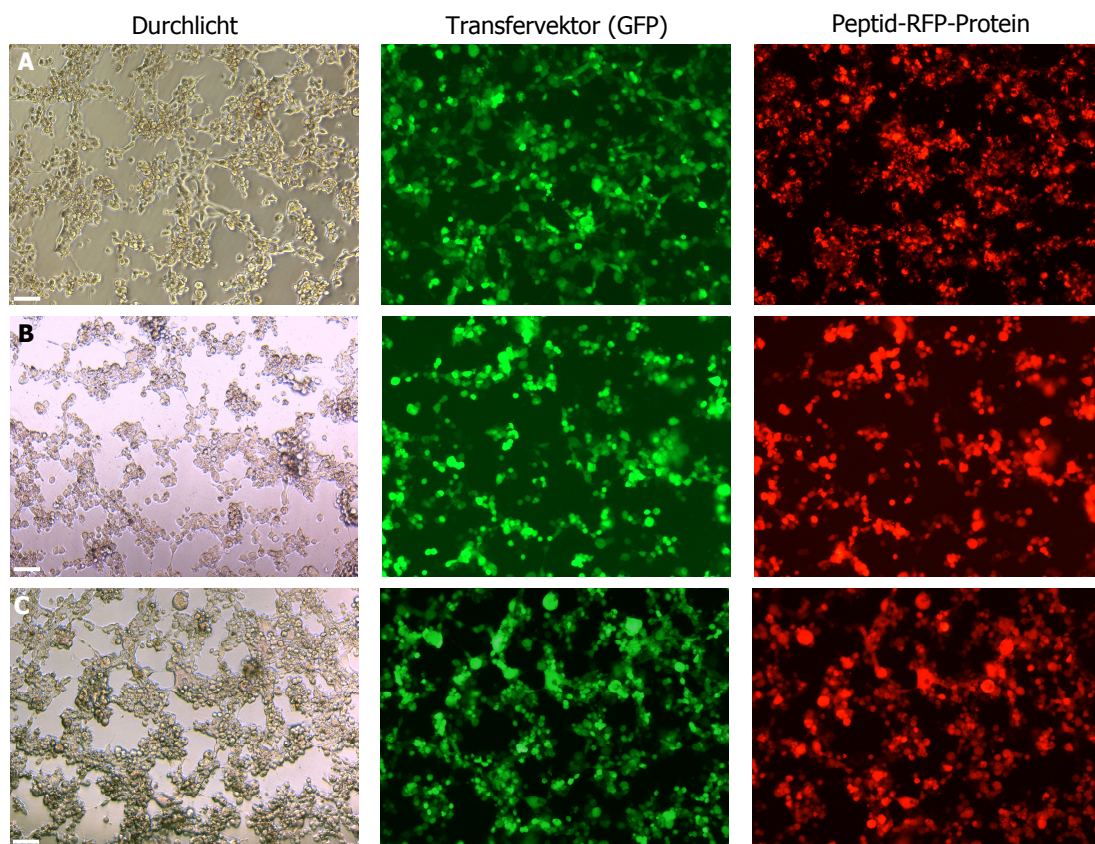
**Abbildung 3.2:** Titration des Gag/Pol-Plasmids pCMV $\Delta$ R8.91. Es wurden konstante Mengen des lentiviralen GFP-Transfervektors (0,5 µg) sowie des VSV.G-Plasmids (0,9 µg) transfiziert, während die Menge des pCMV $\Delta$ R8.91-Plasmids variierte. Der Virustiter wurde über die FACS-Analyse GFP-positiver, transduzierter Zellen bestimmt.

Die Transfektion steigender Mengen des Gag/Pol-Expressionsplasmids führt zu einer Erhöhung des Titers. In hohen Konzentrationen (über 1,3 µg) ist dann eine Abnahme der Virusproduktion zu beobachten (Abb. 3.2). Bei der Transfektion von 0,4 bzw. 0,5 µg Verpackungsplasmid liegt der Titer in einem mittleren Bereich von etwa  $6 \cdot 10^6$  tdu/ml. Da davon auszugehen ist, dass die Expression des Gag-Proteins dann ebenfalls moderat ist, wird für weitere Experimente eine Menge von 0,4 µg pCMV $\Delta$ R8.91 ausgewählt.

Für die folgenden Inhibitionsexperimente wurden somit pro Ansatz 0,5 µg des GFP-Transfervektors pHRSEWcPPT, 0,4 µg des Gag/Pol-Plasmids pCMV $\Delta$ R8.91 sowie 0,9 µg des VSV.G-Plasmids transfiziert. Dazu erfolgt die Koftransfektion der pF25-X-RFP-Plasmide nach dem in Tab. 2.1 dargestellten Schema in einem Mengenbereich von 0,25 – 2,5 µg (Kapitel 2.3.4).

### 3.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Transfektionseffizienz

Zur Generierung von Pseudoviren wurden 293T-Zellen mit dem pMD2.VSV.G-Plasmid sowie mit den in Kapitel 3.3.2 ermittelten Mengen des Gag/Pol-Plasmids pCMV $\Delta$ R8.91 und des Transfervektors pHRSEWcPPT transfiziert. Dabei erfolgte zur Analyse der Transfektionseffizienz die Kotransfektion von 0,75  $\mu$ g der pF25-X-RFP-Konstrukte (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). Vor der Abnahme der Überstände zur Bestimmung der darin enthaltenen Virusmenge bzw. RNA, wurde an einem Fluoreszenzmikroskop die Transfektionseffizienz überprüft.



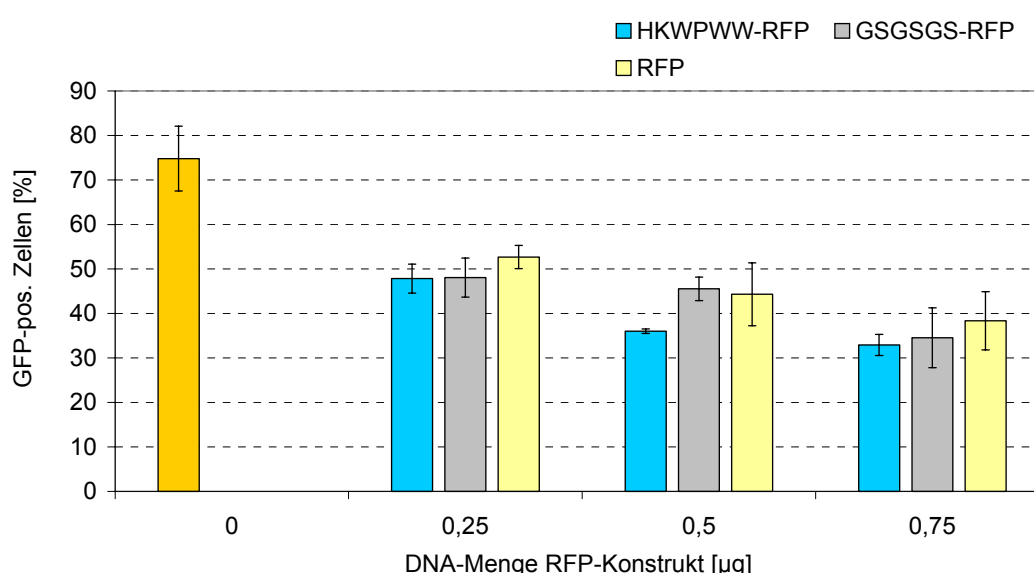
**Abbildung 3.3:** Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion mit 0,5  $\mu$ g pHRSEWcPPT, 0,4  $\mu$ g pCMV $\Delta$ R8.91, 0,9  $\mu$ g pMD2.VSV.G und 0,75  $\mu$ g der pF25-X-RFP-Plasmide. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von 293T-Zellen 42 Stunden nach der Transfektion. Die GFP-Expression des Transfervektors pHRSEWcPPT ist grün dargestellt. **A:** Expression des HKWPWW-RFP-Fusionsproteins (rot). **B:** Expression des GSGGS-RFP-Fusionsproteins (rot). **C:** Expression des RFP-Proteins. Maßstab: 50  $\mu$ m

Abb. 3.3 zeigt, dass die 293T-Zellen effizient mit dem Transfektor pHRSEWcPPT sowie den pF25-X-RFP Plasmiden transfiziert sind. Dabei zeigt die GFP-Expression (grün) die Transfektionseffizienz des pHRSEWcPPT-Plasmids an, während die RFP-Fluoreszenz (rot) ein Maß für die Expression der Peptid-RFP-Fusionsproteine ist.

Die GFP- sowie RFP-Expression ist in allen drei Ansätzen vergleichbar. Es sind somit keine auffälligen Unterschiede in der Transfektionseffizienz der pF25-HKWPWW-RFP-, pF25-GSGSGS-RFP- und pF25-RFP-Plasmide erkennbar.

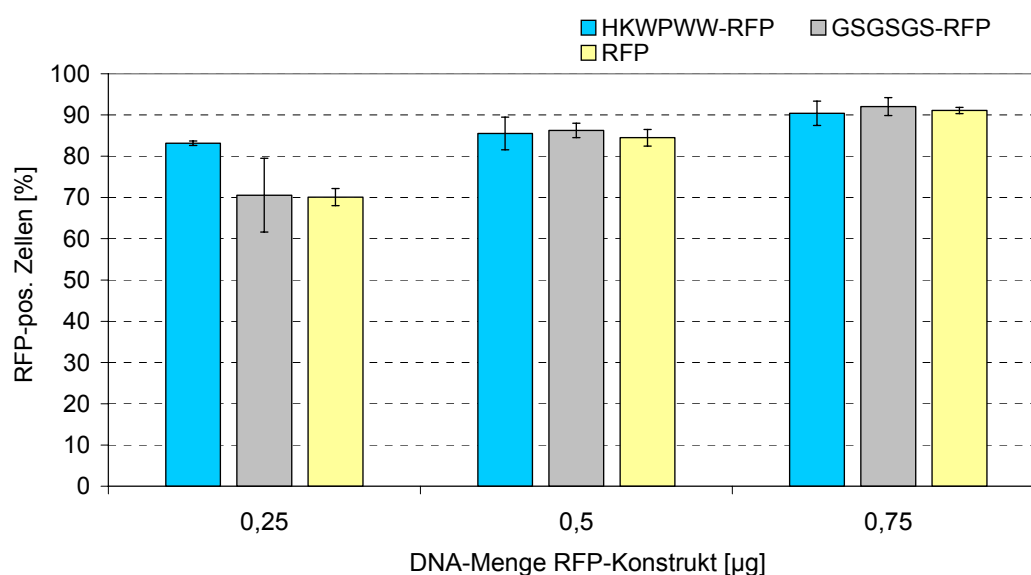
### 3.3.4 Quantifizierung der Transfektionseffizienz über FACS-Analyse

Die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung ermöglicht lediglich eine Abschätzung der Transfektionseffizienzen (Abb. 3.3). Mittels der FACS-Analyse lassen sich die Transfektionseffizienzen des HIV-1 GFP-Transfervektors sowie die der pF25-X-RFP-Plasmide quantifizieren. Hierfür wurden Pseudoviren-produzierende 293T-Zellen verwendet, welche mit 0,5 µg des GFP-Transfervektors, 0,4 µg des Gag/Pol- sowie 0,9 µg des VSV.G-Plasmids und variablen Mengen der pF25-X-RFP-Konstrukte (0,25 - 0,75 µg) transfiziert waren (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). Analog zur Abnahme der Virusüberstände erfolgte die Ernte der transfizierten Zellen 42 Stunden nach der Transfektion und nachfolgend die Messung GFP-, RFP- sowie GFP+RFP-positiver Zellen am FACS-Gerät. Aus den in Duplikaten durchgeführten Transfektionen wurde der Anteil fluoreszierender Zellen an der gesamten Zellpopulation für jeden Ansatz bestimmt und daraus die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet (Kapitel 2.3.6.2).



**Abbildung 3.4:** Transfektionseffizienz des GFP-Transfervektors. Pseudoviren-produzierende 293T-Zellen wurden 42 Stunden nach der Transfektion geerntet und der Anteil GFP-positiver transfizierter 293T-Zellen am FACS-Gerät analysiert. Alle GFP-positiven Zellen exprimieren den lentiviralen Transfervektor pHSEWcPPT und produzieren verpackbare RNA.

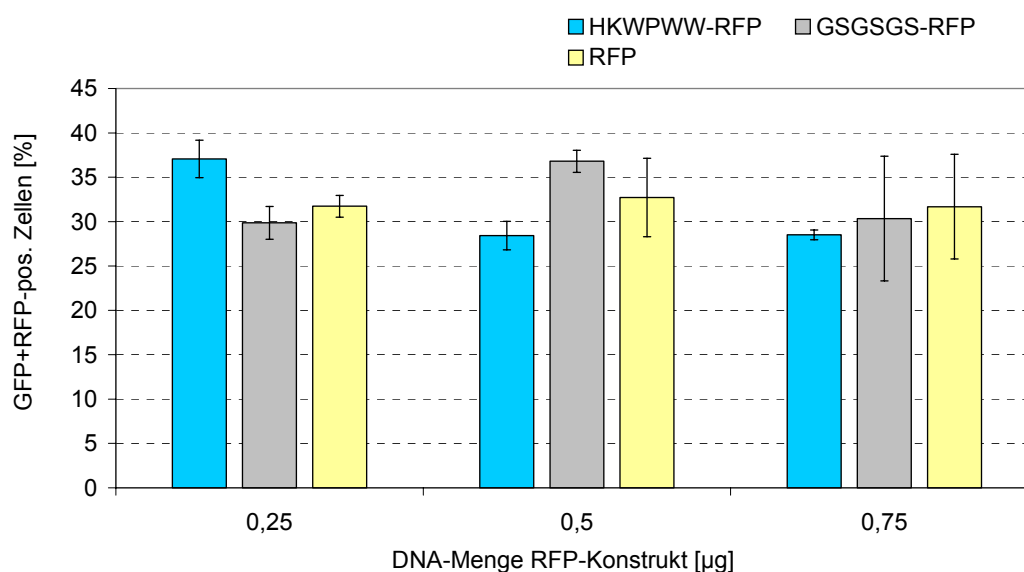
Das in Abb. 3.4 dargestellte Experiment zeigt die Transfektionseffizienz des Transfervektors pHRSEWcPPT anhand des Anteils GFP-positiver 293T-Zellen. In 293T-Zellen, welche nicht mit RFP-Konstrukten kotransfiziert sind und nur Pseudoviren produzieren, ist die Transfektionseffizienz für den Transfektor am höchsten und liegt bei 75% GFP-positiver Zellen. Die Kotransfektion steigender Mengen der RFP-Konstrukte hat eine Abnahme der GFP-Transfektionseffizienz bis auf 35% zur Folge. Der Vergleich der verschiedenen RFP-Konstrukte untereinander zeigt jedoch vergleichbare Transfektionseffizienzen. Somit ist davon auszugehen, dass der Transfektor in allen mit RFP-Konstrukten transfizierten Zellen vergleichbar exprimiert wird.



**Abbildung 3.5:** Transfektionseffizienz der pF25-X-RFP-Konstrukte. Der Anteil RFP-positiver, Pseudovirenproduzierender 293T-Zellen wurde 42 Stunden nach der Transfektion über FACS-Analyse bestimmt. Die RFP-positiven Zellen exprimieren das jeweilige Peptid-RFP-Protein.

Der Prozentsatz der RFP-exprimierenden Zellen in Abhängigkeit von der Menge des transfizierten RFP-Konstrukts ist in Abb. 3.5 dargestellt. Es wird deutlich, dass mit zunehmenden DNA-Mengen der transfizierten pF25-X-RFP-Konstrukte auch der Anteil RFP-positiver Zellen von etwa 70% auf 90% ansteigt. Die transfizierten 293T-Zellen exprimieren somit alle drei RFP-Proteine konzentrationsabhängig und zu einem vergleichbaren Prozentsatz.





**Abbildung 3.6:** Transfektionseffizienz des Transfervektors sowie der pF25-X-RFP-Plasmide. 42 Stunden nach der Transfektion wurde der Anteil GFP- und RFP- positiver 293T-Zellen am FACS-Gerät gemessen. Die doppelt positiven Zellen exprimieren gleichzeitig den Transfervektor (GFP) sowie das jeweilige Peptid-X-RFP Konstrukt.

In Abb. 3.6 ist der Anteil der 293T-Zellen gezeigt, welche gleichzeitig mit dem GFP-Transfervektor sowie den RFP-Konstrukten transfiziert sind. Diese Zellen exprimieren gleichzeitig GFP und RFP und sind erscheinen im FACS doppelt positiv. Unabhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt liegt der Anteil doppelt positiver Zellen im Bereich von etwa 30%.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die mit dem HKWPWW-RFP-Konstrukt transfizierten Zellen im gleichen Ausmaß den GFP-Transfervektor exprimieren wie die mit den Kontrollen transfizierten Zellen. Somit ist auch die Synthese der HIV-1  $\Psi$ -RNA in den Zellen untereinander vergleichbar. Eine reduzierte Virusproduktion in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins wird somit vermutlich nicht durch eine verringerte Transkription der  $\Psi$ -RNA in den Zellen hervorgerufen.

### 3.3.5 Expressionsraten der Fusionsproteine

Es wurde bereits gezeigt, dass in Anwesenheit der drei Peptid-RFP-Proteine die Expression des GFP-Transfervektors vergleichbar ist (Kapitel 3.3.4). Vor Beginn der Inhibitionsexperimente stellte sich die Frage, ob auch die Peptid-RFP-Proteine in Pseudovirenproduzierenden Zellen ähnlich stark exprimiert werden. Die FACS-Methode ermöglicht die Bestimmung der mittleren Expressionsrate der Peptid-RFP-Proteine in transfizierten Zel-

len. Dabei wird die Expressionsrate des jeweiligen RFP-Fusionsproteins durch die mittlere Fluoreszenzintensität MFI (mean fluorescence intensity) angegeben. In die FACS-Analyse wurden Pseudoviren-produzierende 293T-Zellen eingesetzt, welche in Duplikaten mit den Plasmiden zur Herstellung pseudotypisierter Lentiviren und 0,75 µg der pF25-X-RFP-Konstrukte transfiziert waren (Kapitel 2.3.4 und 2.3.6.2).

<b>Transfiziertes RFP-Konstrukt</b>	<b>RFP-pos. Zellen [%]</b>	<b>Mittlere RFP-Fluoreszenz</b>
pF25-HKWPWW-RFP	90,4 ± 2,9	43,9 ± 9,7
pF25-GSGSGS-RFP	92,0 ± 2,2	120,8 ± 16,0
pF25-RFP	91,1 ± 0,8	253,0 ± 45,1

**Tabelle 3.1:** Expression der Peptid-RFP-Proteine in Pseudoviren-produzierenden Zellen. Der Anteil 293T-Zellen, welche RFP exprimieren wurde 42 Stunden nach der Transfektion mit 0,75 µg der pF25-X-RFP-Konstrukte am FACS-Gerät gemessen. Die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des jeweiligen Fusionsproteins erfolgte analog dazu am FACS. Der MFI-Wert gibt die mittlere Expressionsstärke des jeweiligen RFP-Fusionsproteins an.

In Tab. 3.1 ist die Messung der mittleren Expressionsraten dargestellt. Die als Prozentsatz der RFP-positiven Zellen angegebene Transfektionseffizienz ist für alle drei Konstrukte vergleichbar und ist in Abb. 3.5 grafisch für alle DNA-Konzentrationen dargestellt. Auffällig ist, dass die mittlere RFP-Fluoreszenz der beiden Kontrollkonstrukte pF25-GSGSGS-RFP und pF25-RFP drei- bzw. sechsmal höher ist als die des pF25-HKWPWW-RFP Konstrukts. Somit wird das HKWPWW-RFP-Fusionsprotein schwächer als die beiden Kontrollproteine exprimiert. Im nächsten Schritt folgt die Untersuchung, ob das HKWPWW-RFP-Protein trotz der geringeren Expression als die beiden Kontrollen die Virenproduktionen hemmen kann.

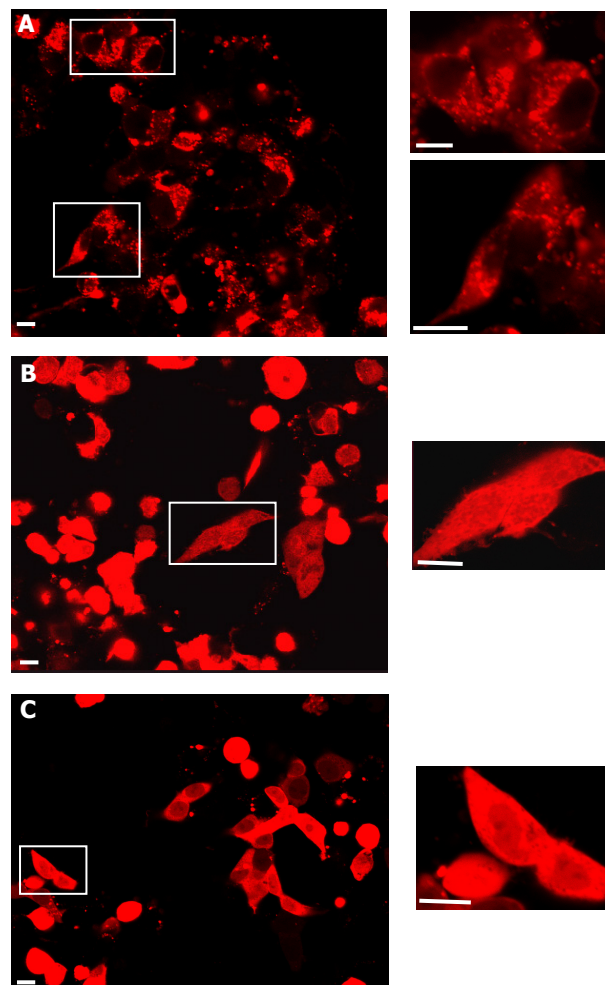
### 3.3.6 Intrazelluläre Lokalisation des HKWPWW-RFP-Proteins

Vor der Testung auf antivirale Wirksamkeit des HKWPWW-RFP-Proteins, musste ferner der Expressionsort der drei pF25-X-RFP-Konstrukte mikroskopisch analysiert werden. Des weiteren wurde untersucht, in welchem zellulären Kompartiment das HKWPWW-RFP-Protein lokalisiert ist.

Bislang ist noch nicht allen Einzelheiten aufgeklärt, in welchem zellulären Kompartiment die Ψ-RNA-Gag-Interaktion stattfindet. Vermutlich erfolgt die Selektion der viralen geno-

mischen RNA bereits im Zytoplasma, wo auch oligomerisierte Gag-Proteine nachweisbar sind. Denkbar ist ebenfalls, dass der RNA-Einbau erst an der Plasmamembran geschieht, wo bereits Gag-Moleküle gebunden sind<sup>44,159,177,178</sup>. Im Rahmen einer neuen Studie konnte gezeigt werden, dass die initiale RNA-Gag-Interaktion bereits in der perinukleären Region stattfindet (Kapitel 1.3)<sup>236</sup>. Eine zytoplasmatische Lokalisation des HKWPWW-RFP-Proteins war daher eine Voraussetzung für die antivirale Wirksamkeit auf der Ebene der Gag-Ψ-RNA-Interaktion.

Zur Bestimmung der Lokalisation des Fusionsproteins wurden 0,75 µg des pF25-HKWPWW-RFP-Plasmids in 293T-Zellen transfiziert und 42 Stunden nach der Transfektion die verschiedenen zellulären Kompartimente spezifisch angefärbt (Kapitel 2.3.10). Nach Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Zellmembran mit einem Concanavali-nA-Alexa488 Konjugat bzw. der Zellkern mit einem TO-PRO<sup>®</sup>-3 Konjugat angefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse der Präparate am konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM) der Firma Leica.



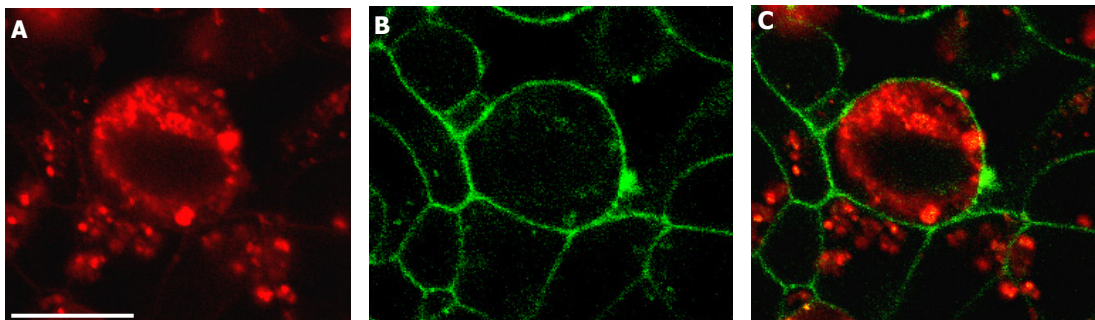
**Abbildung 3.7:** Expression der Peptid-RFP-Proteine (rot). Die Aufnahme der 293T-Zellen am CLSM erfolgte 42 Stunden nach der Transfektion mit 0,75 µg der pF25-X-RFP-Konstrukte. **A:** Expression des HKWPWW-RFP-Proteins. **B:** Expression des GSGSGS-RFP-Proteins. **C:** Aufnahme RFP-exprimierender Zellen ohne Peptid. Maßstab: 5 µm

Wie in Abb. 3.7 A gezeigt, wird das HKWPWW-RFP-Protein in transfizierten 293T-Zellen exprimiert. Die Zellen können somit zur Bestimmung der Lokalisation des Proteins verwendet werden.

Es erfolgte analog die Analyse der Expression und Lokalisation der beiden Kontrollproteine GSGSGS-RFP und RFP. Beide Kontrollproteine werden sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär in transfizierten 293T-Zellen exprimiert (Abb. 3.7 B und C).

### 3.3.6.1 Zellmembranfärbung mit ConcanavalinA-Alexa Fluor 488

Zur Färbung der Zellmembran wurde Alexa Fluor 488 konjugiertes ConcanavalinA verwendet. Bei ConcanavalinA handelt es sich um ein Lektin, das an die  $\alpha$ -Mannopyranosyl und  $\alpha$ -Glucopyranosyl-Reste eukaryotischer Zellmembranen bindet. Für jeden Fluoreszenzkanal wurden die Daten sequentiell aufgenommen (Kapitel 2.3.10.1). Durch das nachträgliche Übereinanderlegen der getrennt aufgenommenen Kanäle mittels der Leica Software konnte dann ein Mischbild erstellt werden.

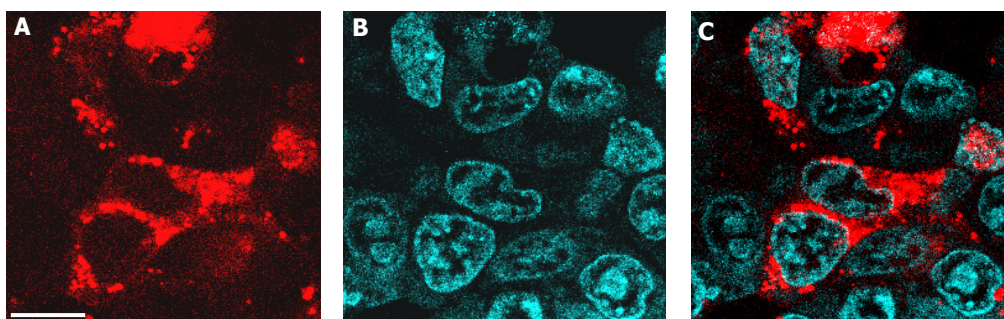


**Abbildung 3.8:** CLSM-Aufnahme der Zellmembranfärbung mittels ConcanavalinA-Alexa488. Das Lektin-Konjugat bindet an die Zuckerreste der Zellmembran von 293T-Zellen. **A:** HKWPWW-RFP-Protein, aufgenommen 42 Stunden nach der Transfektion (rot). **B:** Zellmembranfärbung (grün). **C:** Mischbild aus sequentiell aufgenommenen Kanälen. Maßstab: 5  $\mu$ m

In Abb. 3.8 ist die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins bei gleichzeitiger Färbung der Zellmembran im Detail dargestellt. Das Fusionsprotein ist rot gezeigt und die Zellmembran erscheint in grün. Das Mischbild beider Aufnahmen zeigt deutlich, dass das HKWPWW-RFP-Protein im Zytoplasma von 293T-Zellen lokalisiert ist. Eine Lokalisation an der Zellmembran, welche sich durch eine gelbe Überlagerung im Mischbild darstellt, ist marginal vorhanden.

### 3.3.6.2 Zellkernfärbung mit TO-PRO®-3

Zur Färbung der Zellkerne wurde der Cyanfarbstoff TO-PRO®-3 verwendet, welcher an doppelsträngige Nucleinsäuren bindet (Kapitel 2.3.10.2).



**Abbildung 3.9:** CLSM-Aufnahme der Zellkernfärbung mittels des TO-PRO®-3 Farbstoffs in 293T-Zellen. Der Fluoreszenzfarbstoff weist doppelsträngige Nucleinsäuren nach. **A:** HKWPWW-RFP-Protein (42 Stunden nach der Transfektion) (rot). **B:** Kernfärbung (türkisfarben). **C:** Mischbild aus sequentiell aufgenommenen Kanälen. Maßstab: 5 µm

In Abb. 3.9 ist die Lokalisation des HKWPWW-RFP-Proteins (rot) mit gleichzeitiger Färbung der Zellkerne (türkisfarben) dargestellt. Das HKWPWW-RFP-Protein ist überwiegend zytoplasmatisch exprimiert. Das Mischbild beider Aufnahmen lässt erkennen, dass das HKWPWW-RFP-Protein nur in sehr geringem Ausmaß im Nucleus von 293T-Zellen zu detektieren ist. Dies deutet auf eine schwache nukleäre Expression des Fusionsproteins hin. Des weiteren zeigt eine genauere Betrachtung, dass das HKWPWW-RFP-Protein zum Teil in granulären Strukturen nachweisbar ist (Abb. 3.8 und 3.9).

Sowohl die Färbung der Zellmembran als auch die des Zellkerns weisen darauf hin, dass das HKWPWW-RFP-Protein im Zytoplasma transfizierter 293T-Zellen lokalisiert ist. Somit ist das Protein in dem Kompartiment lokalisiert, in dem ebenfalls die  $\Psi$ -RNA-Gag-Interaktion stattfindet, die durch das HKWPWW-Peptid inhibiert werden soll.

### 3.3.7 Analyse der Viabilität transfizierter 293T-Zellen

Bevor die antivirale Wirksamkeit des HKWPWW-RFP-Proteins getestet wurde, sollte zunächst eine mögliche Zytotoxizität der RFP-Fusionsproteine auf 293T-Zellen ermittelt werden. Denn eine zytotoxische Wirkung des HKWPWW-RFP-Proteins auf 293T-Zellen würde ebenfalls in einer Reduktion der Pseudovirusproduktion resultieren. Um eine mögliche toxische Wirkung der RFP-Fusionsproteine zu untersuchen, wurden 293T-Zellen in

Duplikaten mit 2,5 µg der pF25-X-RFP-Plasmide transfiziert. Dies entsprach der maximal verwendeten DNA-Menge in den Inhibitionsversuchen. Es folgte 42 Stunden nach der Transfektion die Ernte und die Messung der Zellen an einem Zellzählgerät, welches die Viabilität aufgrund von Widerstandsmessungen digital analysiert (Kapitel 2.3.5).

RFP-Konstrukt	Viabilität [%]
-	92,3 ± 0,16
pF25-HKWPWW-RFP	90,3 ± 1,2
pF25-GSGSGS-RFP	87,6 ± 0,4
pF25-RFP	88,3 ± 1,1

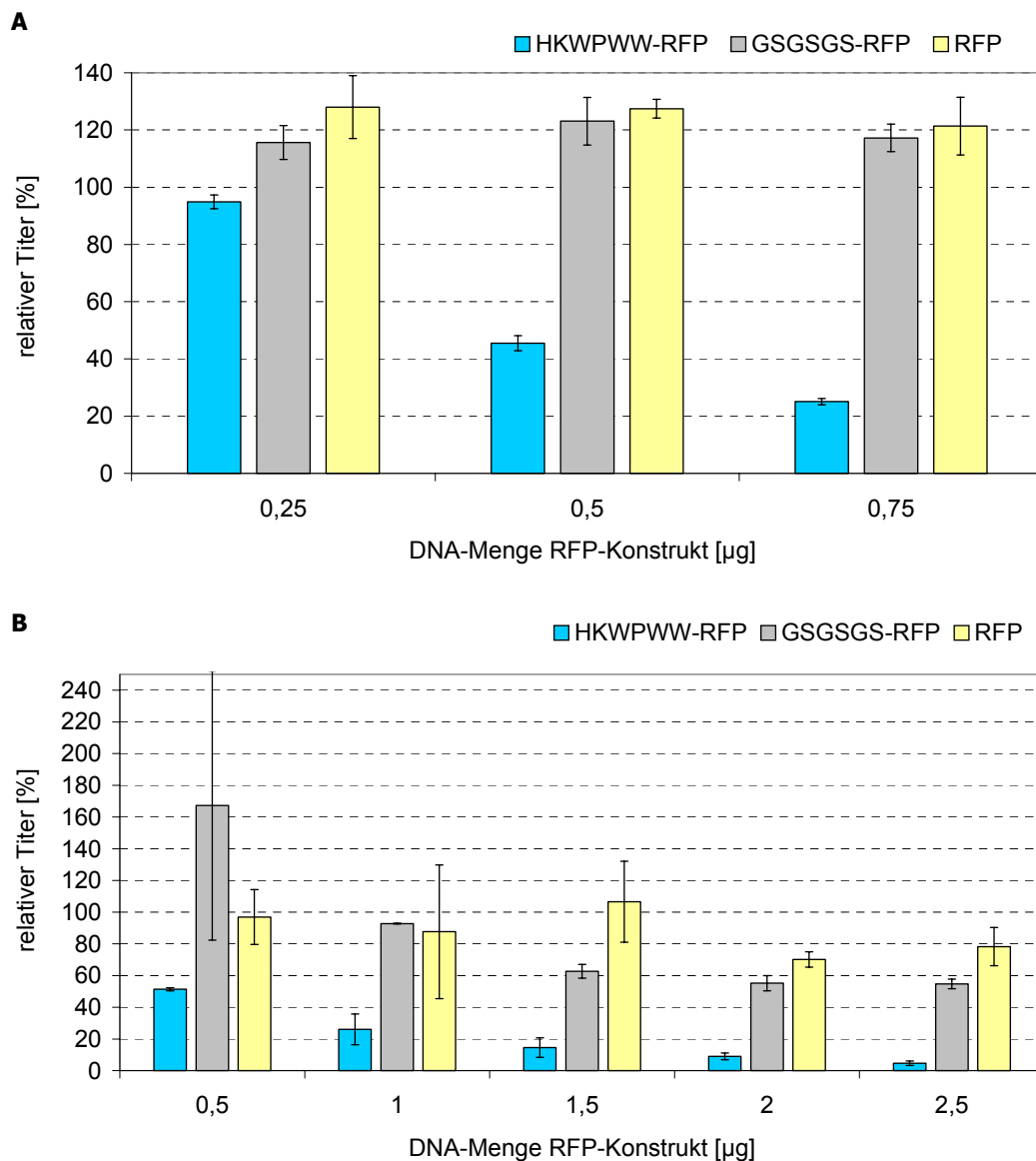
**Tabelle 3.2:** Viabilität von 293T-Zellen, welche in Duplikaten mit 2,5 µg der pF25-X-RFP-Konstrukte transfiziert wurden. 42 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Analyse der Zellviabilität an einem Casy<sup>®</sup>-Zellzählgerät über das Widerstandsmessprinzip.

Tab. 3.2 zeigt, dass zwei Tage nach der Transfektion alle Zellen, unabhängig von dem transfizierten pF25-X-RFP-Konstrukt, eine Viabilität von rund 90% aufweisen, welche nur geringfügig unter der nicht-transfizierter Zellen liegt. Somit übt keines der RFP-Fusionsproteine zytotoxische Effekte auf 293T-Zellen aus. Ferner sind Verringerungen in der Virusproduktion HKWPWW-RFP-exprimierender Zellen im Folgenden nicht auf toxische Effekte des Peptids zurückzuführen.

### 3.3.8 Einfluss des HKWPWW-RFP-Proteins auf die Entstehung infektiöser Viren

Ziel war es, den Einfluss der Expression des HKWPWW-RFP-Proteins auf die Entstehung infektiöser Viren zu untersuchen. Hierfür wurden 293T-Zellen mit den in Kapitel 3.3.2 ermittelten Mengen der Plasmide zur Produktion pseudotypisierter Lentiviren sowie den pF25-X-RFP-Konstrukten transfiziert (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). Die Abnahme der Überstände erfolgte 42 Stunden nach der Transfektion. Bei einer inhibitorischen Aktivität des HKWPWW-RFP-Proteins, sollten in dessen Anwesenheit weniger Pseudoviren produziert werden als in Gegenwart des GSGSGS-RFP- bzw. des RFP-Proteins. Daher wurde der Gehalt der Überstände an infektiösen Viren bestimmt und als Titer pro Volumeneinheit angegeben. Die Titerbestimmung erfolgte über FACS-Analyse transduzierter Zellen (Kapitel

2.3.6.1). Die mittleren Vektortiter der in Duplikaten durchgeführten Transfektionen wurden auf den mittleren Titer von 293T-Zellen normiert, welche nicht mit pF25-X-RFP-Konstrukten kotransfiziert waren und nur Pseudoviren produzierten. Es folgte die Berechnung Standardabweichungen sowie anschließend die Angabe des relativen Titers in Prozent (Gleichungen 2.2 A und B).



**Abbildung 3.10:** HKWPWW-RFP inhibiert die Produktion infektiöser Lentiviren. 293T-Zellen wurden in Duplikaten mit den Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren sowie den RFP-Konstrukten transfiziert. **A:** Transfektion der RFP-Konstrukte im Bereich von 0,25 - 0,75 µg. **B:** Transfektion der RFP-Konstrukte im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 2,5 µg. Zur Titerbestimmung des GFP-Vektors in den Überständen wurden 293T-Zellen transduziert, GFP-positive Zellen über FACS-Analyse quantifiziert und die Titer der viralen Präparationen berechnet. Die Werte sind angegeben als prozentuale Titer im Vergleich zu Zellen, welche nur Pseudoviren produzierten und nicht mit pF25-X-RFP-Plasmiden transfiziert waren.

Zunächst erfolgte die Transfektion der RFP-Konstrukte im niedrigen Konzentrationsbereich von 0,25 – 0,75 µg (Abb. 3.10 A). Dabei resultiert die Transfektion zunehmender Mengen

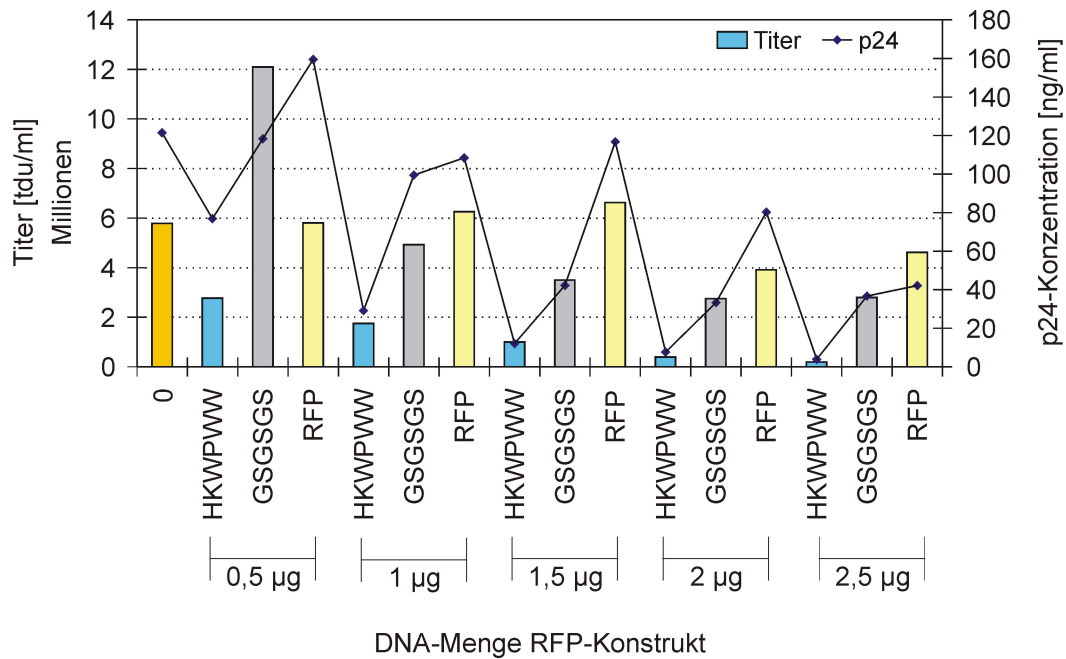
des HKWPWW-RFP-Konstrukts in einer Reduktion des relativen Titers bis zu 75% in der höchsten Konzentration. Hingegen hat die Expression der beiden Kontrollproteine GSGSGS-RFP sowie RFP keinen Einfluss auf den viralen Titer, sondern führt sogar zu einer leichten Aktivierung der Virusproduktion. Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob durch Transfektion höherer Mengen der RFP-Konstrukte eine weitergehende Reduktion des viralen Titers erreicht werden kann. Dies ist in Abb. 3.10 B gezeigt. Bei der Transfektion von 2,5 µg des pF25-HKWPWW-RFP-Plasmids kann sogar eine 95%ige Titerreduktion erreicht werden. In hohen Konzentrationen (2 – 2,5 µg) üben jedoch auch die beiden Kontroll-Proteine GSGSGS-RFP sowie RFP einen leichten unspezifischen inhibitorischen Effekt von etwa 20% auf die Generierung lentiviraler Pseudoviren aus. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass HKWPWW-RFP die Produktion infektiöser lentiviraler Pseudoviren hemmt.

### 3.3.9 Beeinflussung der Virusproduktion durch das HKWPWW-RFP-Protein

Das HKWPWW-RFP-Protein hemmt die Entstehung infektiöser Pseudoviren (Kapitel 3.3.8). Für replikationskompetentes HIV ist jedoch bekannt, dass in der Regel nur ein Virion von  $10^4$  bis  $10^7$  entstehenden Viren infektiös ist <sup>175</sup>. Bei dem Großteil der produzierten Viren handelt es sich somit voraussichtlich um nicht-infektiöse Virionen. Darüber hinaus berichten einige Publikationen, dass bei einer Hemmung der HIV-Verpackung nicht-infektiöse Virionen entstehen, welche keine RNA, zelluläre RNA oder gespleißte virale RNA enthalten (Kapitel 1.3) <sup>4,21,40,47,49,122</sup>. Dabei bestehen sowohl infektiöse Viren als auch nicht-infektiöse Virionen u.a. aus Matrix- und Kapsidproteinen. Die Menge des viralen Kapsidproteins (p24) repräsentiert somit die Gesamtzahl abgegebener Viren, unabhängig davon, ob diese infektiös sind oder nicht.

Nach der Transfektion von 293T-Zellen mit den drei Plasmiden zur Produktion pseudotypisierter Lentiviren sowie den pF25-X-RFP-Konstrukten erfolgte die Abnahme der Überstände (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). Um zu analysieren, ob die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins zu einer verstärkten Produktion nicht-infektiöser Virionen führt, was bei einer Hemmung der RNA-Verpackung zu erwarten wäre, wurde in den Überständen die p24-Antigenkonzentration mittels ELISA bestimmt und mit dem Titer, der Konzentration infektiöser Viren, verglichen (Kapitel 2.3.7).





**Abbildung 3.11:** HKWPWW-RFP hemmt die Virusproduktion. 293T-Zellen wurden mit den Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren sowie den RFP-Konstrukten transfiziert. Der Titer und die zugehörige p24-Konzentration in den Überständen wurden über FACS-Analyse bzw. über p24-ELISA bestimmt. Der Titer (Balkendiagramm) gibt die Konzentrationen infektiöser Viren an, während die p24-Konzentration (Liniendiagramm) ein Maß für die Gesamtkonzentration aller Viren in dem entsprechenden Überstand ist. Der infektiöse Titer korreliert in der Regel mit der p24-Konzentration in lentiviralen Überständen.

In Abb. 3.11 ist auf einer y-Achse die p24-Konzentration des getesteten Überstands und auf der zweiten y-Achse der korrespondierende infektiöse Titer in Abhängigkeit von dem transfizierten RFP-Konstrukt angegeben. Hierbei sind Regelmäßigkeiten zu erkennen. Mit der Transfektion steigender Mengen des HKWPWW-RFP-Konstrukts nimmt die p24-Konzentration in den Überständen von 80 ng/ml auf 4 ng/ml p24 ab. Hingegen ist im Vergleich hierzu die p24-Konzentration in den Zellkulturüberständen, welche von GSGSGS-RFP- bzw. RFP-exprimierenden Zellen produziert wurden, deutlich erhöht und bewegt sich im Bereich von 40 bis 160 ng/ml. Bei der Transfektion von 2,5 µg DNA ist die p24-Konzentration in Überständen von HKWPWW-RFP-exprimierenden Zellen mit 4 ng/ml p24 etwa 10-fach reduziert im Vergleich zu den in Anwesenheit der Kontrollproteine hergestellten Überstände. Auch der infektiöse Titer ist in diesen Proben um das 10- bis 20-fache im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Diese Korrelation der p24-Konzentration mit dem infektiösen Titer in den Zellkulturüberständen ist über alle DNA-Konzentrationen hinweg zu beobachten und in Tab. 3.3 zusammengefasst.

Um festzustellen, ob in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins verstärkt nicht-infektiöse Virionen produziert werden, erfolgte die Analyse der relativen Infektiosität eines Viruspartikels für jedes RFP-Konstrukt. Dabei lässt sich diese relative Infektiosität aus der p24-Konzentration und dem infektiösen Titer für jeden Überstand berechnen. Hierfür wurde

eine Gleichung aus der Veröffentlichung von Layne et al. im Jahr 1992 zugrunde gelegt<sup>175</sup>. Der Autor geht davon aus, dass ein Viruspartikel 1500 p24-Moleküle enthält. Dies entspricht dann einer Masse von  $5 \cdot 10^{-17} \text{g}$  p24-Protein pro Viruspartikel<sup>175</sup>. Bekannt sind von jedem Überstand die p24-Konzentration  $x_1$  [g/ml] sowie der Titer  $x_2$  [tdu/ml] (Tab. 3.3). Zunächst errechnet sich die Viruskonzentration  $y$  [Viren/ml], welche die Gesamtzahl der Viren umfasst (infektiöse und nicht-infektiöse Virionen), folgendermaßen:

$$y = \left( \frac{x_1}{5 \cdot 10^{-17} \text{g}} \right)$$

**Gleichung 3.2:** Formel zur Quantifizierung der Viruskonzentration in unbekanntem Proben. Die Gleichung basiert auf der Annahme, dass ein Viruspartikel  $5 \cdot 10^{-17} \text{g}$  p24-Protein enthält<sup>175</sup>. ( $y$  = Viruskonzentration [Viren/ml];  $x_1$  = p24-Konzentration [g/ml]).

Die relative Infektiosität eines Viruspartikels  $z$  [tdu/Viruspartikel] berechnet sich dann laut Layne et al. wie folgt<sup>175</sup>:

$$z = \left( \frac{x_2}{y} \right)$$

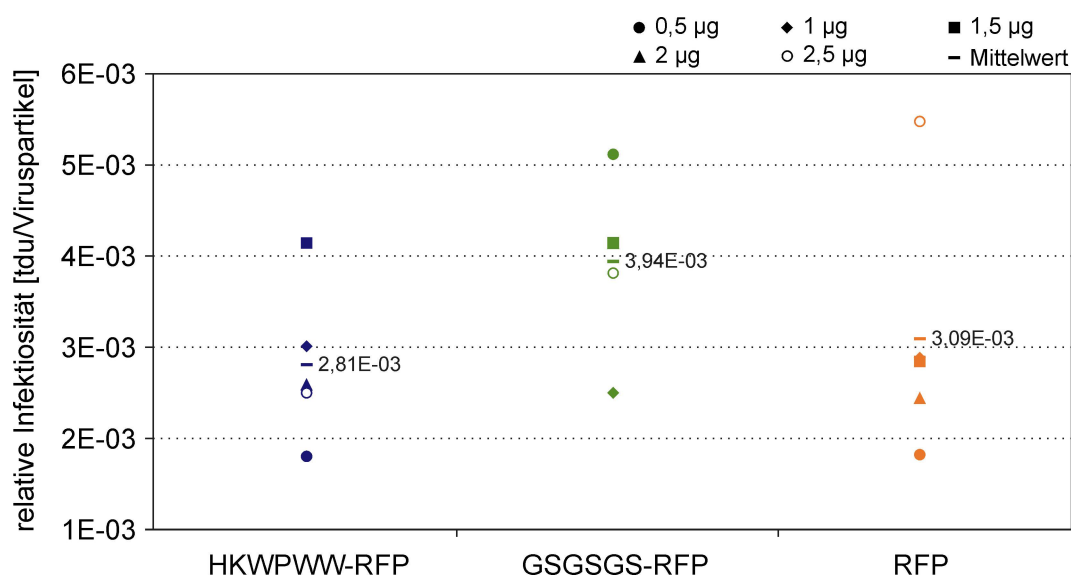
**Gleichung 3.3:** Formel zur Berechnung der relativen Infektiosität eines Viruspartikels in unbekanntem Proben ( $y$  = Viruskonzentration [Viren/ml];  $x_2$  = Titer [tdu/ml]).

Für alle Überstände, deren Titer und p24-Konzentrationen bereits in Abb. 3.11 dargestellt sind, erfolgt die Berechnung der relativen Infektiosität  $z$  [tdu/Viruspartikel] (Tab. 3.3).

DNA-Menge RFP-Konstrukt	Titer [tdu/ml]	p24-Konz. [ng/ml]	Rel. Infektiosität [tdu/Viruspartikel]
0	$5,8 \cdot 10^6$	121,5	$2,4 \cdot 10^{-3}$
0,5 µg HKWPWW-RFP	$2,8 \cdot 10^6$	76,9	$1,8 \cdot 10^{-3}$
1 µg HKWPWW-RFP	$1,8 \cdot 10^6$	29,1	$3,0 \cdot 10^{-3}$
1,5 µg HKWPWW-RFP	$1,0 \cdot 10^6$	12,1	$4,1 \cdot 10^{-3}$
2 µg HKWPWW-RFP	$0,4 \cdot 10^6$	7,7	$2,6 \cdot 10^{-3}$
2,5 µg HKWPWW-RFP	$0,2 \cdot 10^6$	3,9	$2,5 \cdot 10^{-3}$
0,5 µg GSGSGS-RFP	$12,1 \cdot 10^6$	118,2	$5,1 \cdot 10^{-3}$
1 µg GSGSGS-RFP	$4,9 \cdot 10^6$	99,5	$2,5 \cdot 10^{-3}$
1,5 µg GSGSGS-RFP	$3,5 \cdot 10^6$	42,3	$4,2 \cdot 10^{-3}$
2 µg GSGSGS-RFP	$2,8 \cdot 10^6$	33,3	$4,1 \cdot 10^{-3}$
2,5 µg GSGSGS-RFP	$2,8 \cdot 10^6$	36,7	$3,8 \cdot 10^{-3}$
0,5 µg RFP	$5,8 \cdot 10^6$	159,4	$1,8 \cdot 10^{-3}$
1 µg RFP	$6,3 \cdot 10^6$	108,4	$2,9 \cdot 10^{-3}$
1,5 µg RFP	$6,6 \cdot 10^6$	116,7	$2,8 \cdot 10^{-3}$
2 µg RFP	$3,9 \cdot 10^6$	80,3	$2,4 \cdot 10^{-3}$
2,5 µg RFP	$4,6 \cdot 10^6$	42,2	$5,5 \cdot 10^{-3}$

**Tabelle 3.3:** Gegenüberstellung des infektiösen Titers, der p24-Konzentration sowie der relativen Infektiosität eines Viruspartikels in lentiviralen Überständen. 293T-Zellen wurden mit Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren sowie den RFP-Konstrukten transfiziert. Der Titer und die p24-Konzentration in den Überständen wurden über FACS-Analyse bzw. über p24-ELISA bestimmt.

Tab. 3.3 zeigt, dass in allen Überständen die relative Infektiosität eines Viruspartikels im Bereich von  $1,8$  bis  $5,5 \cdot 10^{-3}$  tdu/Viruspartikel liegt. Somit kommen gerundet auf 1000 Viruspartikel zwischen zwei bis sechs infektiöse Viren. Für jedes RFP-Konstrukt wird dann über alle DNA-Konzentrationen die mittlere relative Infektiosität berechnet und in Abb. 3.12 dargestellt.



**Abbildung 3.12:** Die relative Infektiosität eines Viruspartikels ist für alle drei RFP-Konstrukte vergleichbar. Von lentiviralen Überständen wurde der infektiöse Titer sowie die zugehörige p24-Konzentration ermittelt und aus diesen Werten mittels der Gleichungen 3.2 und 3.3 die relative Infektiosität berechnet (Tabelle 3.3). Die mittlere Infektiosität wurde über alle DNA-Konzentrationen berechnet und als Zahlenwert im Diagramm dargestellt.

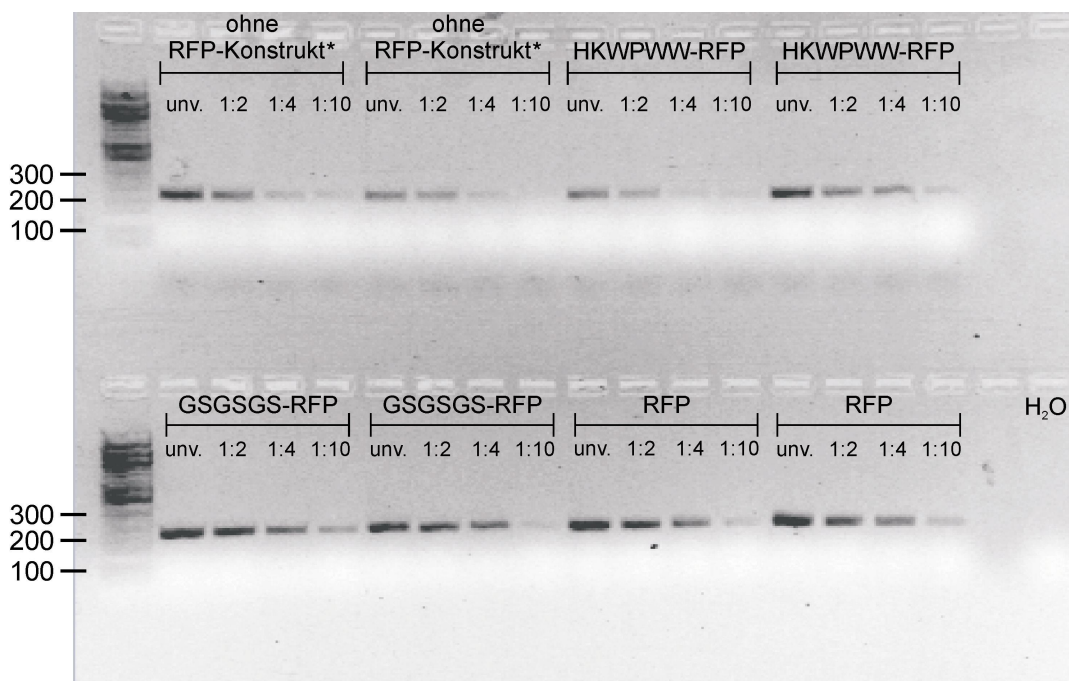
Die mittlere relative Infektiosität liegt für alle drei RFP-Konstrukte im Bereich von  $2,8$  bis  $3,9 \cdot 10^{-3}$  tdu/Viruspartikel (Abb. 3.12). Somit sind keine auffälligen Unterschiede in der relativen Infektiosität der Viren abhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt zu beobachten. Auch der Vergleich der Werte einzelner DNA-Konzentrationen bestätigt dies (Tab. 3.3).

Somit hat die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins keine zunehmende Produktion nicht-infektiöser Virionen zur Folge. Um dies genauer zu untersuchen, erfolgt im nächsten Schritt die Quantifizierung viraler RNA in Viruspartikeln.

### 3.3.10 Quantifizierung von viraler RNA in Viruspartikeln

Eine Hemmung der RNA-Verpackung kann sich darin äußern, dass weniger bzw. keine genomische Virus-RNA in die assemblierenden Viruspartikel eingebaut wird (Kapitel 1.3 und 3.3.9)<sup>4,21,40,47,49,122</sup>. Um zu analysieren, ob die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins zu einer Hemmung der verpackten viralen RNA in Viruspartikeln führt, wurde eine semi-quantitative PCR durchgeführt. Hierfür wurden 293T-Zellen mit den Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren sowie  $0,75 \mu\text{g}$  der pF25-X-RFP-Konstrukte transfiziert. 42 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Abnahme der virushaltigen Überstände und anschließend die Bestimmung der p24-Antigenkonzentration (Kapitel 2.3.4 und 2.3.7). Um

die RNA auf die Anzahl der Viruspartikel zu normieren, wurden gleiche Mengen des p24-Antigens in die Präparation viraler RNA eingesetzt (Kapitel 2.3.8.1). Dabei wurde aus jedem Überstand die RNA in Duplikaten präpariert und die umgeschriebene cDNA in verschiedenen Verdünnungsstufen in die semiquantitative PCR mit spezifischen Primern für die HIV-1  $\Psi$ -Region eingesetzt (Kapitel 2.3.8.2 und 2.3.8.3).



**Abbildung 3.13:** Nachweis genomischer Virus-RNA in Zellkulturüberständen mittels semiquantitativer PCR. Aus den Überständen von Zellen, welche mit den Plasmiden zur Herstellung lentiviraler Pseudoviren sowie 0,75  $\mu$ g der pF25-X-RFP-Konstrukte transfiziert waren, erfolgte die Präparation viraler RNA in Duplikaten normiert auf 2 ng p24. (\* Überstände von Zellen, welche nur mit den Plasmiden zur Herstellung lentiviraler Pseudoviren transfiziert waren). Nach Umschreiben der RNA in cDNA wurde diese in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:2, 1:4 und 1:10 verdünnt) in die PCR eingesetzt. Es wurden spezifische Primer für die HIV-1  $\Psi$ -Region verwendet. Die Auftrennung der generierten PCR-Produkte erfolgte mittels eines Agarosegels.

Die Auftrennung im Agarosegel zeigt, dass in allen Ansätzen ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von etwa 250 bp amplifiziert wird (Abb. 3.13). Der optische Vergleich der Bandenintensitäten zeigt zunächst keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen. In den HKWPWW-RFP-Proben sowie in den Ansätzen ohne RFP-Konstrukt ist bereits in der 1:4 Verdünnung nur ein sehr schwaches PCR-Produkt zu erkennen. Hingegen erscheint bei den beiden Kontrollen (GSGSGS-RFP und RFP) bei dieser Verdünnung eine stärkere Bande (Abb. 3.13). Um eine quantitativere Aussage treffen zu können, erfolgte die Analyse der Bandenintensitäten mit Hilfe der „Quantity One“-Software von Bio-Rad®. Für jedes transfizierte pF25-X-RFP-Konstrukt sowie für 293T-Zellen, welche nur Pseudoviren produzieren (ohne RFP-Konstrukt) wurde die mittlere Intensität der PCR-Produkte berechnet (Tab. 3.4).

RFP-Konstrukt	Mittlere Intensität PCR-Produkt/mm <sup>2</sup>
-	1273 ± 345
pF25-HKWPWW-RFP	1135 ± 371
pF25-GSGSGS-RFP	2730 ± 679
pF25-RFP	1979 ± 359

**Tabelle 3.4:** Quantifizierung der PCR aus Abb. 3.13. Für jedes PCR-Produkt wurde mittels der „Quantity One“- Software von Bio-Rad® die Intensität pro mm<sup>2</sup> bestimmt. Aus den verschiedenen Verdünnungsstufen errechnet sich dann die mittlere Intensität der PCR-Produkte pro mm<sup>2</sup>.

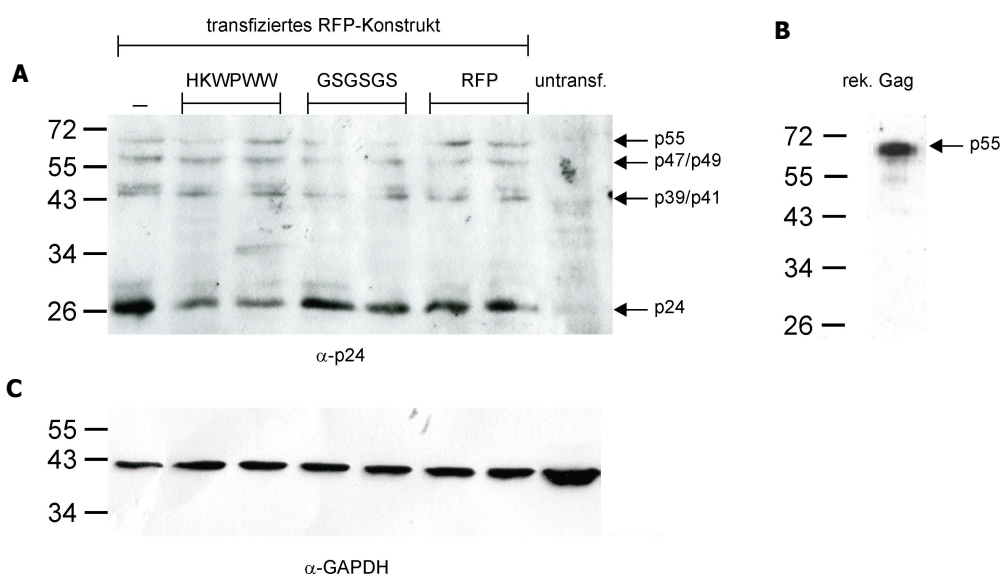
Die in Tab. 3.4 dargestellte Auswertung der PCR zeigt keine deutlichen Unterschiede in den mittleren Intensitäten der PCR-Produkte und bestätigt das in Abb. 3.13 dargestellte Ergebnis. In Anwesenheit der beiden Kontrollen (GSGSGS-RFP und RFP) ist die Menge verpackter viraler RNA leicht erhöht im Vergleich zu HKWPWW-RFP-exprimierenden Zellen oder Zellen, die nur Pseudoviren produzieren und kein RFP-Konstrukt exprimieren. Jedoch ist in allen Ansätzen eine relativ hohe Standardabweichung festzustellen, welche die Limitierung der Methode aufzeigt. Um festzustellen, ob die in Tab. 3.4 dargestellten Werte statistisch signifikant sind, wurde ein T-Test durchgeführt. Die aus den Einzelwerten berechneten p-Werte zeigen, dass bei einem Signifikanzniveau von 5% lediglich die RNA-Mengen der in Gegenwart von HKWPWW-RFP bzw. GSGSGS-RFP hergestellten Viren signifikant unterschiedlich sind ( $p\text{-Wert}_{\text{HKWPWW-GSGSGS}}=0,0436$ ). Zwischen den in Anwesenheit von HKWPWW-RFP bzw. ohne RFP-Konstrukt ( $p\text{-Wert}_{\text{HKWPWW-ohneRFP-Konstrukt}}=0,3556$ ) sowie in Gegenwart von HKWPWW-RFP bzw. RFP ( $p\text{-Wert}_{\text{HKWPWW-RFP}}=0,8766$ ) produzierten Viren sind keine signifikanten Unterschiede im RNA-Gehalt der Viren feststellbar.

Letztlich können mit einer semiquantitativen PCR nur grobe Aussagen getroffen werden. Vermutlich enthalten jedoch die Viren, welche von HKWPWW-RFP-exprimierenden Zellen produziert wurden, eine vergleichbare Menge genomischer Virus-RNA wie die in Anwesenheit der Kontrollen produzierten Viren.

### 3.3.11 Expression der HIV-1 Gag-Proteine in transfizierten 293T-Zellen

Verantwortlich für die Verpackung viraler RNA ist das Gag<sup>p55</sup>-Polyprotein. Dabei wird das HIV-1 Gag-Protein von der *gag/pol* mRNA als Vorläufer von 55 kDa synthetisiert. Auch die Produkte des *pol*-Gens werden als Gag/Pol<sup>160</sup>-Vorläuferprotein von der gleichen mRNA

translatiert. Voraussetzung für die Produktion des Gag/Pol-Fusionsproteins ist die Verschiebung des ribosomalen Leserasters um  $-1$  während der Translation, wodurch das *gag*-Stopkodon überlesen wird. Dies findet in etwa fünf Prozent der Translationsvorgänge statt. Das Gag/Pol-Vorläuferprotein enthält die virale Protease, welche sich nach der Dimerisierung autokatalytisch aus dem Protein herauspaltet und die Polyproteine in die einzelnen Komponenten prozessiert<sup>91,93,205,280</sup>. Dabei wird das Gag<sup>p55</sup>-Vorläuferprotein in p17 (Matrix), p24 (Kapsid), p7 (Nukleokapsid) sowie in das Linker-Protein p6 und in die beiden Spacerpeptide p1 und p2 aufgespalten (Kapitel 1.1.5)<sup>93,305</sup>. Da die Verpackung der Virusgenome simultan mit dem Zusammenbau neuer Virionen stattfindet, wurde ein möglicher Effekt des HKWPWW-Peptids auf die Gag-Prozessierung untersucht. Zur Analyse der Gag-Expression, wurden 293T-Zellen in Duplikaten mit den Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren sowie mit 0,75  $\mu\text{g}$  der pF25-X-RFP-Konstrukte transfiziert (Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.4). 42 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Ernte der Zellen und die Analyse der Proteinexpression im Western Blot, wobei jede Probe eine unabhängige Transfektion repräsentiert. Die Membran wurde mit einem monoklonalen  $\alpha$ -p24 Antikörper entwickelt, welcher mehrere Prozessierungsintermediate des Gag<sup>p55</sup>-Polyproteins nachweist (Abb. 3.14 A).



**Abbildung 3.14:** Expression des HIV-1 Gag-Polyproteins und dessen Prozessierungsintermediate. 293T-Zellen wurden in Duplikaten mit den Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren sowie 0,75  $\mu\text{g}$  der RFP-Konstrukte transfiziert. 42 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen und die Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot. **A:** Nachweis mit einem monoklonalen  $\alpha$ -p24 Antikörper, welcher das HIV-1 Kapsidprotein erkennt. **B:** Detektion von aufgereinigten, rekombinanten Gag<sup>p55</sup>-Protein mit  $\alpha$ -p24. **C:** Entwicklung des Western Blots aus A mit einem monoklonalen  $\alpha$ -GAPDH Antikörper.

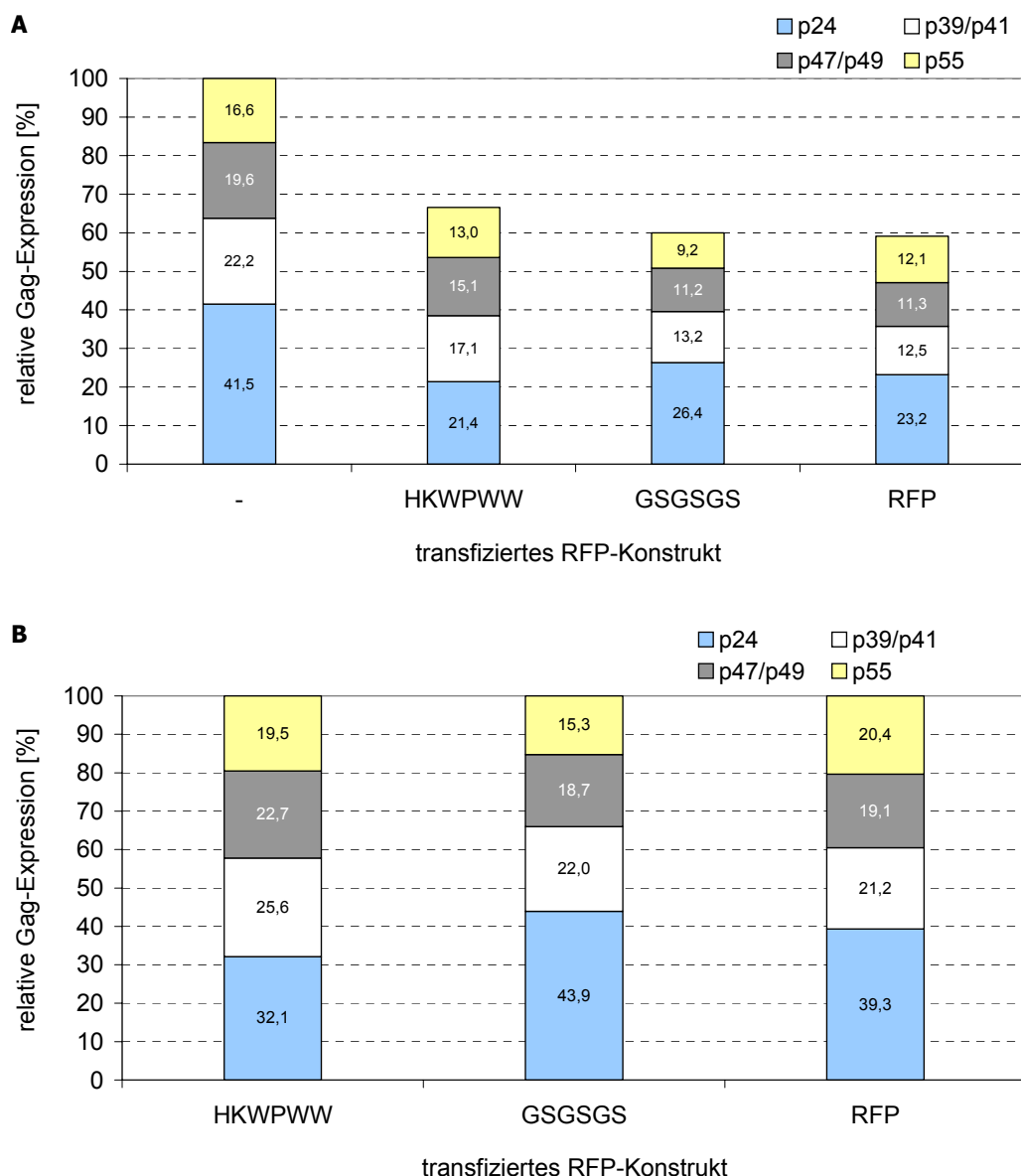
Der  $\alpha$ -p24 Antikörper weist alle Gag-Intermediate nach, welche das Kapsidprotein enthalten: Dabei handelt es sich um das Gag-Polyprotein (55 kDa), welches von der viralen Pro-

tease über die Intermediate p47/p49 und p39/41 in das Kapsidprotein (p24) gespalten wird. Auch wenn über die Prozessierungsreihenfolge und -art des Gag-Polyproteins zum Teil einige widersprüchliche Publikationen existieren, so scheint der oben genannte Prozessierungsweg der wahrscheinlichste zu sein<sup>106,107,113,242</sup>. Demzufolge entsprechen die Proteine p47/p49 einer Zwischenstufe auf dem Prozessierungsweg von Gag<sup>p55</sup> zu den p39/p41-Intermediaten. Das p49-Protein repräsentiert vermutlich ein Matrix-Kapsid-p2-NCp7-Zwischenprodukt und die Proteine p39/41 bestehen aus Kapsid-p2-NCp7-p1-p6 (p39) bzw. aus Matrix-Kapsid (p41)<sup>14,113</sup>. Hingegen geht die Zusammensetzung des p47-Intermediats nicht aus den genannten Veröffentlichungen hervor.

Der Western Blot zeigt ebenfalls ein abweichendes Laufverhalten der verschiedenen Gag-Intermediate. Auch rekombinates, in Hefe exprimiertes, und aufgereinigtes p55 Gag-Protein lässt sich im Bereich von 65 kDa nachweisen (Abb. 3.14 B). Der optische Vergleich der Bandenintensitäten des Gag-Polyproteins sowie der Intermediate lässt zunächst für p55, p47/p49 und p39/p41 nahezu gleich starke Banden unabhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt erkennen. Jedoch sind die dem p24-Protein korrespondierenden Banden in den pF25-HKWPWW-RFP transfizierten 293T-Zellen im Vergleich zu den anderen Proben reduziert (Abb. 3.14 A). Die Entwicklung des Blots mit dem  $\alpha$ -GAPDH Antikörper zeigt, dass in allen Spuren in etwa die gleiche, gesamte Proteinmenge aufgetragen wurde (Abb. 3.14 C). Dieser Antikörper weist das zelluläre Protein Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase mit einem Molekulargewicht von 36 kDa nach.

Um die Expression der Gag-Intermediate quantifizieren können, wurden die Western Blot Filme eingescannt und die Intensitäten der Banden mittels der „Quantity One“-Software von Bio-Rad<sup>®</sup> analysiert. Für jedes transfizierte pF25-X-RFP-Konstrukt sowie für 293T-Zellen, welche nur Pseudoviren produzieren (ohne RFP-Konstrukt) wurden die mittleren Intensitäten der p55-, p47/49-, p39/41- und p24-Banden berechnet. Dann erfolgte die Normierung der Expression der einzelnen Gag-Intermediate auf die Summe der Gag-Expression von Zellen, welche nur Pseudoviren produzieren bzw. auf die gesamte Gag-Expression in der jeweiligen Probe (Abb. 3.15 A und B).





**Abbildung 3.15:** Quantitative Analyse der Gag-Expression in transfizierten 293T-Zellen. Die Bandenintensitäten des in Abbildung 3.14 gezeigten Western Blots wurden quantifiziert und die mittleren Intensitäten pro  $\text{mm}^2$  für die verschiedenen Gag-Intermediate berechnet und auf eine einheitliche GAPDH-Expression normiert. **A:** Normierung der Bandenintensitäten auf die Summe der Gag-Expression von 293T-Zellen, welche nur Pseudoviren produzierten und nicht mit RFP-Konstrukten transfiziert waren. **B:** Die Bandenintensitäten der Gag-Intermediate wurden auf die Summe der Gag-Expression der jeweiligen Probe bezogen.

Zunächst lässt sich feststellen, dass die Expression aller Gag-Intermediate in der Summe in den mit RFP-Konstrukten transfizierten Zellen um etwa 40% geringer ist als in Zellen welche nur Pseudoviren produzieren. Auch die Expression des Kapsidproteins (p24) ist in Zellen, welche nur Pseudoviren herstellen höher, als in den mit RFP-Konstrukten kotransfizierten Zellen (Abb. 3.15 A). In mit pF25-HKWPWW-RFP transfizierten Zellen ist die p24-Produktion am geringsten, das auch in Abb. 3.14 A sowie Abb. 3.15 B zu erkennen ist. Hingegen ist die Expression der p47/p49- sowie p39/p41-Intermediate im Vergleich zu den beiden Kontrollen GSGSGS-RFP und RFP leicht erhöht (Abb. 3.15 A und B). Dies deu-

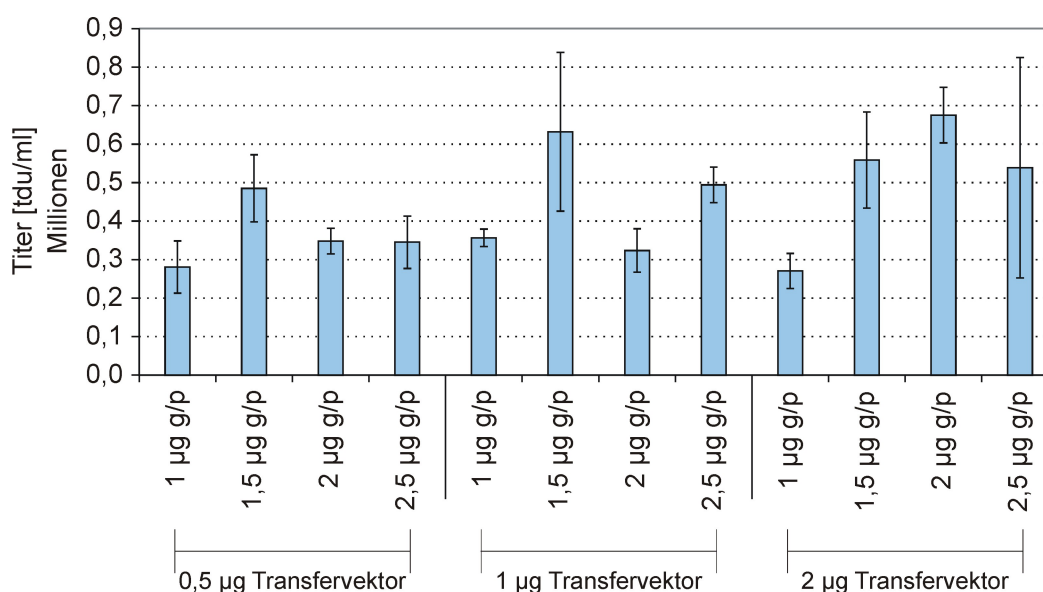
tet möglicherweise auf eine verlangsamte oder beeinträchtigte Prozessierung des Gag<sup>p55</sup>-Polyproteins in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins hin.

Das für die Verpackung essentielle Gag<sup>p55</sup>-Polyprotein wird in allen mit RFP-Konstrukten transfizierten Zellen vergleichbar exprimiert (Abb. 3.15 A und B). Somit lässt sich der in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins produzierte, reduzierte Virustiter nicht auf eine geringere Gag<sup>p55</sup>-Expression in den Zellen zurückführen.

### **3.3.12 Produktion von Gammaretroviren in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins**

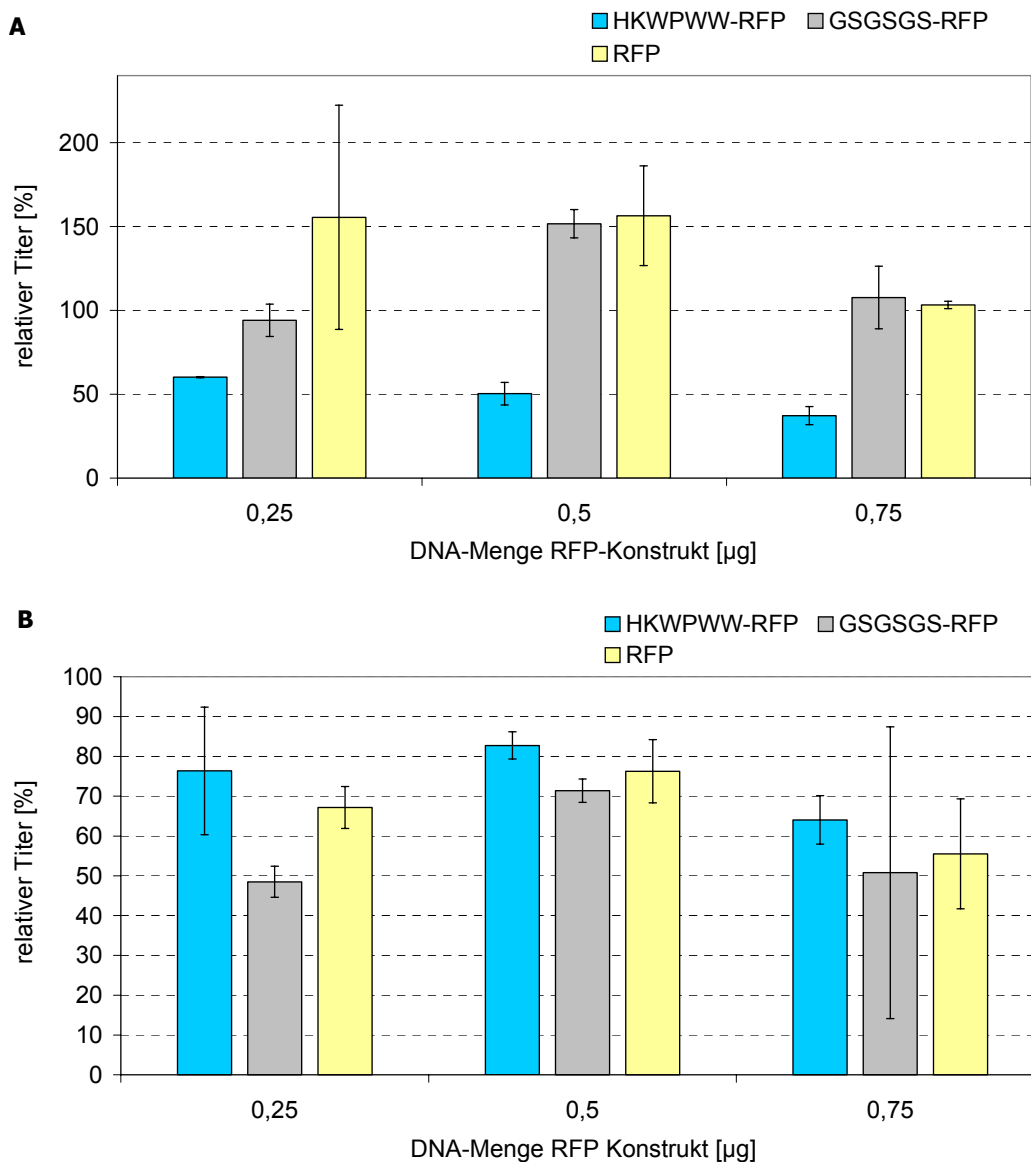
Um zu untersuchen, ob das HKWPWW-RFP-Protein spezifisch die Produktion lentiviraler Pseudoviren hemmt, wurden Gammaretroviren in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins hergestellt und deren Titer bestimmt.

Zur Herstellung gammaretroviraler Pseudoviren wurden 293T Zellen mit dem MLV Gag/Pol-Plasmid pcDNA.3 MLV g/p, dem pMD.2VSV.G-Vektor sowie dem gammaretroviralen GFP-Transfervektor pSRS11SFGFPpre transfiziert (Kapitel 2.3.3.2 und 2.3.4). Im Rahmen von Vorversuchen wurden die DNA-Mengen des Gag/Pol-Plasmids sowie des GFP-Transfervektors austitriert. Ziel war es, die DNA-Mengen zu bestimmen, die zur Produktion eines moderaten Titers führen. Dann kann von einer ausgewogenen Expression der Gag/Pol-Proteine sowie des Transfervektors ausgegangen werden. Es erfolgte die Transfektion von 293T-Zellen mit variierenden Mengen des Transfervektors (0,5 – 1,5 µg) sowie des Gag/Pol-Plasmids (1 – 2,5 µg) bei einer konstanten Menge des pMD.2VSV.G-Plasmids (0,9 µg). Nach Abnahme der Überstände erfolgte die Titerbestimmung mittels FACS-Analyse transduzierter Zellen (Kapitel 2.3.6.1). Aus den Vektortitern der in Duplikaten durchgeführten Transfektionen wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet und in Abb. 3.16 dargestellt.



**Abbildung 3.16:** Titration des retroviralen GFP-Transfervektors und des MLV Gag/Pol-Plasmids (g/p). 293T-Zellen wurden bei einer konstanten Menge des VSV.G-Plasmids mit variablen Mengen des retroviralen GFP-Transfervektors sowie des MLV g/p-Plasmids in Duplikaten transfiziert. Die Bestimmung des Virustiters der Überstände erfolgte 42 Stunden nach der Transfektion über Transduktion von 293T-Zellen und nachfolgender FACS-Analyse GFP-positiver transduzierter Zellen.

Die Titer des gammaretroviralen Transfervektors pSRS11SFGFPpre liegen in einem Bereich von  $0,3$  bis  $0,6 \cdot 10^6$  tdu/ml und sind somit eine Logstufe niedriger als lentivirale Titer (Kapitel 3.3.2). Die Transfektion steigender Mengen des Gag/Pol-Plasmids führt bis  $1,5 \mu\text{g}$  zu einer Titerzunahme und in höheren Konzentrationen zu einem Titerabfall. Für den Transfervektor ist durchweg eine Korrelation des Titers mit der Menge des transfizierten Plasmids zu beobachten (Abb. 3.16). Für die weiteren Experimente wurde ein moderater Titerbereich von  $3,5 \cdot 10^5$  tdu/ml gewählt. Dies entspricht der Transfektion von  $1 \mu\text{g}$  des Gag/Pol-Plasmids,  $1 \mu\text{g}$  des Transfervektors und  $0,9 \mu\text{g}$  des VSV.G-Plasmids. Dazu wurden die Peptid-kodierenden pF25-X-RFP-Konstrukte nach dem in Tab. 2.2 dargestellten Schema in einem Mengenbereich von  $0,25 - 0,75 \mu\text{g}$  kotransfiziert (Kapitel 2.3.4). Die Produktion pseudotypisierter Lentiviren in Anwesenheit der pF25-RFP-Konstrukte erfolgte analog dazu und wurde wie beschrieben durchgeführt (Kapitel 2.3.4 und 3.3.8). Die mittleren Vektortiter der in Duplikaten durchgeführten Transfektionen wurden auf den mittleren Titer von 293T-Zellen bezogen, die nicht mit pF25-X-RFP-Konstrukten kotransfiziert waren und nur lentivirale bzw. gammaretrovirale Pseudoviren produzierten. Es folgte die Berechnung der Standardabweichungen sowie die Angabe des relativen Titers (Gleichungen 2.2 A und B). Ein Experiment zur gleichzeitigen Titerbestimmung lentiviraler sowie gammaretroviraler Vektoren ist in Abb. 3.17 A und B gezeigt.



**Abbildung 3.17:** HKWPWW-RFP hemmt spezifisch die Produktion infektiöser Lentiviren. **A:** 293T-Zellen wurden in Duplikaten mit Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren sowie den RFP-Konstrukten transfiziert. **B:** Transfektion von 293T-Zellen in Duplikaten mit den Plasmiden zur Produktion gammaretroviraler Pseudoviren sowie mit den RFP-Konstrukten. Zur Titerbestimmung beider GFP-Transfervektoren wurden 293T-Zellen transduziert, GFP-positive Zellen über FACS-Analyse quantifiziert und die Titer berechnet. Die Werte sind angegeben als prozentuale Titer im Vergleich zu Zellen, welche nur Pseudoviren produzierten und nicht mit pF25-X-RFP Plasmiden transfiziert waren.

Wie bereits in Kapitel 3.3.8 demonstriert, führt die Transfektion des HKWPWW-RFP-Konstrukts im Vergleich zu den beiden Kontrollen zur konzentrationsabhängigen Reduktion des viralen Titers um etwa 60% (Abb. 3.17 A). In Abb. 3.17 B ist der Einfluss der transfizierten RFP-Konstrukte auf die Produktion gammaretroviraler Pseudoviren dargestellt. Im Gegensatz zu dem Titer lentiviraler Vektoren, nimmt der Titer gammaretroviraler Vektoren nicht mit der Transfektion zunehmender DNA-Mengen des HKWPWW-RFP-Konstrukts ab. Es sind hierbei keine Regelmäßigkeiten zu erkennen. Jedoch übt die Expression aller RFP-Konstrukte einen gewissen unspezifischen Effekt auf den Titer gamma-

retroviraler Vektoren aus. Alle drei RFP-Konstrukte führen unabhängig von der getesteten Konzentration zu einer 30%- bis 50%igen Reduktion des gammaretroviralen Virustiters. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass HKWPWW-RFP die Produktion lentiviraler, infektiöser Viren konzentrationsabhängig hemmt, während die Generierung retroviraler Pseudoviren nicht spezifisch durch Expression des Fusionsproteins inhibiert wird.

### **3.4 Etablierung stabiler Peptid-exprimierender T-Zelllinien**

Bisher konnte gezeigt werden, dass das HKWPWW-RFP-Protein die Produktion lentiviraler Pseudoviren inhibiert, deren Replikation auf eine Infektionsrunde beschränkt ist (Kapitel 3.3). Das nächste Ziel war zu analysieren, ob das HKWPWW-Fusionsprotein ebenfalls die Kapazität besitzt, replikationskompetente HI-Viren zu hemmen. Hierfür musste zunächst das HKWPWW-RFP-Fusionsprotein sowie das Kontrollprotein GSGSGS-RFP in einer mit HIV infizierbaren T-Zelllinie exprimiert werden. Um die HIV-Replikation über mehrere Tage beobachten zu können, war eine stabile und vergleichbar starke Expression der Peptid-RFP-Konstrukte in einem Großteil der Zellen erforderlich.

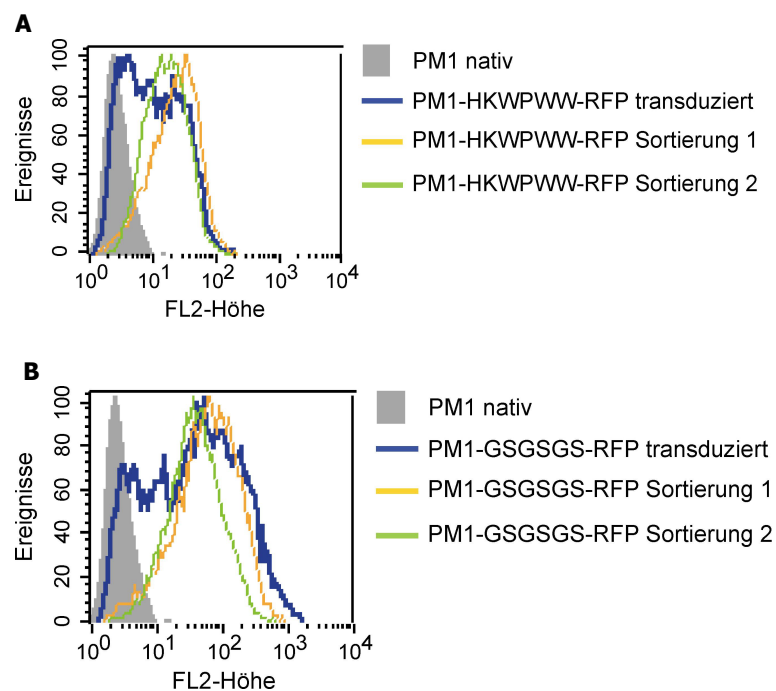
Zur Herstellung stabiler T-Zelllinien wurden die Peptid-kodierenden Sequenzen in einen retroviralen Transfervektor umklontiert, dieser in 293T-Zellen verpackt und mit den Überständen PM1-Zellen transduziert (Kapitel 2.3.11). Anschließend wurden RFP-positive PM1-Zellen am FACS-Gerät analysiert und sortiert (Kapitel 2.3.6.3).

#### **3.4.1 Expressionsraten stabiler Peptid-exprimierender T-Zelllinien**

Bei einer im Vergleich zu dem GSGSGS-RFP-Protein schwachen transienten Expression des HKWPWW-RFP-Expression in 293T-Zellen konnte eine Hemmung der Virusproduktion über einen Zeitraum von zwei Tagen gezeigt werden (Tab. 3.1, Kapitel 3.3.8 und 3.3.9). Da die HIV-Replikation über einen längeren Zeitraum beobachtet werden sollte, mussten die zu infizierenden Zellen die jeweiligen Peptid-RFP-Proteine stabil exprimieren. Hierfür wurden transduzierte PM1-Zellen in die erste FACS-Sortierung eingesetzt und die sortierten Zellen expandiert und erneut sortiert (zweite Sortierung). Um die RFP-Expression der PM1-Zelllinien zu verschiedenen Stadien verfolgen zu können, wurden nach der Transduktion

bzw. nach der FACS-Sortierung von den Zellen Aliquots entnommen und am FACS analysiert (Kapitel 2.3.6.3).

Nach Transduktion mit der gleichen Volumeneinheit retroviraler Überstände exprimieren die PM1-Zellen sowohl das HKWPWW-RFP als auch das GSGSGS-RFP-Protein. Jedoch enthalten die transduzierten PM1-HKWPWW-RFP und PM1-GSGSGS-RFP-Zellen noch einen Teil Zellen, welcher nicht das Fusionsprotein exprimiert (Abb. 3.18). Des weiteren sind auch Unterschiede in der mittleren Expressionsstärke der Peptid-RFP-Fusionsproteine zu erkennen, welche von dem MFI-Wert angegeben wird. In transduzierten Zellen wird das HKWPWW-RFP-Protein mit einer MFI von 25 und das GSGSGS-RFP-Protein mit einer MFI von 122 exprimiert. Somit beträgt die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins 20% von der des GSGSGS-RFP-Proteins (Tab. 3.5). In transient transfizierten 293T-Zellen war die Expressionsrate des HKWPWW-RFP-Proteins vergleichbar niedrig und lag bei 35% von der des GSGSGS-RFP-Proteins (Tab. 3.1).



**Abbildung 3.18:** Expressionprofile der RFP-Fusionsproteine in stabilen PM1-Zelllinien. Die Expression der RFP-Fusionsproteine in den PM1-Zelllinien wurde zu verschiedenen Stadien am FACS-Gerät im zweiten Kanal (FL2) analysiert. **A:** Expression des HKWPWW-RFP-Proteins. **B:** Expression des GSGSGS-RFP-Proteins. Die Histogramme zeigen die RFP-Expressionsraten von transduzierten Zellen (blaue Kurve), nach der ersten Sortierung (gelbe Kurve) und nach der zweiten Sortierung (grüne Kurve). Die MFI einer Präparation entspricht dem Mittelwert des zugehörigen Histogramms.

Abb. 3.18 zeigt ferner, dass die RFP-Expression in transduzierten Zellen sehr heterogen ist. Einige Zellen exprimieren sehr stark RFP, während andere sehr schwach bzw. kein RFP exprimieren. Nach Sortierung der RFP-positiven, transduzierten PM1-Zellen exprimie-

ren nahezu alle PM1-Zellen das HKWPWW-RFP- bzw. das GSGSGS-RFP-Fusionsprotein (Abb. 3.18 A und B).

Zelllinie	Status	MFI RFP
PM1-HKWPWW-RFP	Transduziert	25,3
PM1-HKWPWW-RFP	Erste Sortierung	33,0
PM1-HKWPWW-RFP	Zweite Sortierung	23,5
PM1-GSGSGS-RFP	Transduziert	122,3
PM1-GSGSGS-RFP	Erste Sortierung	97,6
PM1-GSGSGS-RFP	Zweite Sortierung	60,0

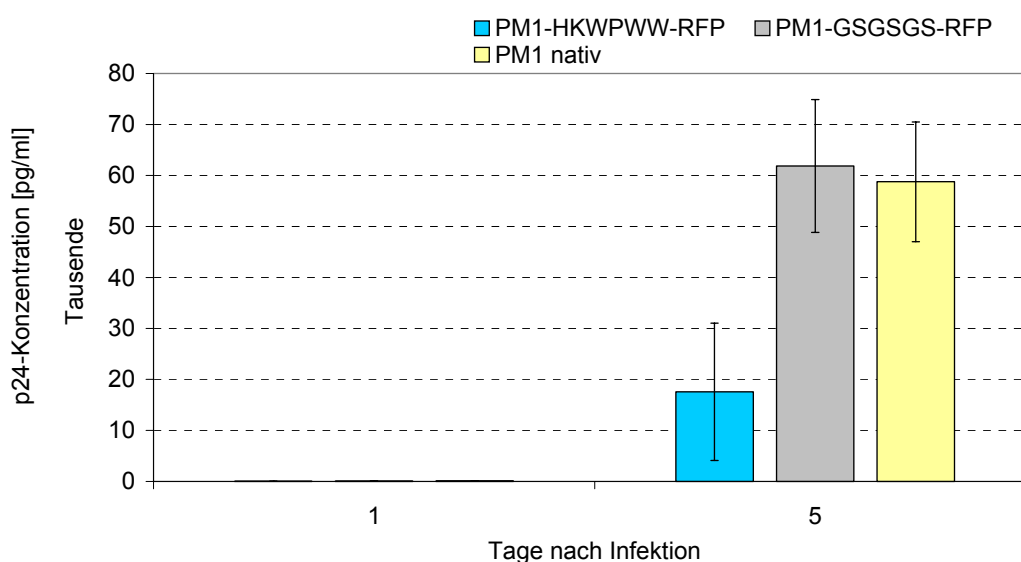
**Tabelle 3.5:** Expression der RFP-Fusionsproteine in stabilen PM1-Zelllinien. Transduzierte PM1-Zellen wurden sortiert (erste Sortierung) und nach der Expansion erneut sortiert (zweite Sortierung). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde über FACS-Analyse bestimmt und gibt die mittlere Expressionsstärke des jeweiligen RFP-Fusionsproteins an.

Es gelang ferner mittels der FACS-Sortierung die Expressionsraten (MFI) der HKWPWW-RFP- und GSGSGS-RFP-Proteine aneinander anzugleichen (Kapitel 2.3.6.3). Nach der ersten Sortierung weisen HKWPWW-RFP-exprimierende Zellen eine MFI von 33 auf. Für GSGSGS-RFP-exprimierende Zellen beträgt die MFI nach der zweiten Sortierung 60 (Tab. 3.5). Auch die Expressionsprofile der RFP-Proteine sind nach diesen Sortierungen vergleichbar (Abb. 3.18 A und B). Nunmehr ist zum einen sichergestellt, dass beide Zelllinien zu einem hohen Prozentsatz die Peptid-RFP-Proteine exprimieren. Zum anderen ist nach der ersten Sortierung der PM1-HKWPWW-RFP- und nach der zweiten Sortierung der PM1-GSGSGS-RFP-Zelllinie die Expression beider Peptid-RFP-Proteine vergleichbar. Somit sind die Voraussetzungen erfüllt, um die HIV-Replikation in diesen beiden Zelllinien zu untersuchen.

### 3.4.2 HIV-Replikation in stabilen Peptid-exprimierenden T-Zelllinien

Nach Etablierung stabiler Peptid-exprimierender T-Zelllinien, wurden diese mit replikationskompetenten HIV-1 infiziert. Es wurde der HIV-1 Stamm NL4-3 verwendet, welcher CXCR4-trop ist. Ziel war es, zu analysieren, ob die HIV-1<sub>NL4-3</sub> Replikation in der PM1-HKWPWW-RFP Zelllinie im Vergleich zu der PM1-GSGSGS-RFP Zelllinie bzw. zu nativen

PM1-Zellen inhibiert wird. Als Maß für die HIV-Replikation diente die Konzentrationsbestimmung des viralen p24-Antigens in den Zellkulturüberständen mittels ELISA (Kapitel 2.3.7). Zunächst wurde im Rahmen eines Vorversuchs die Virusmenge bestimmt, bei welcher HIV-1<sub>NL4-3</sub> auf PM1-Zellen repliziert. Diese entsprach einer MOI (multiplicity of infection) von 0,013. Die MOI errechnet sich durch Division der eingesetzten, infektiösen Virusmenge in iu (infective units) durch die Anzahl der eingesetzten Zellen. Nach Infektion der PM1-HKWPWW-RFP- und PM1-GSGSGS-RFP-Zelllinien sowie nativer PM1-Zellen in Triplikaten mit HIV-1<sub>NL4-3</sub> wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Überstände abgenommen, die darin enthaltene p24-Antigenmenge bestimmt und die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet (Kapitel 2.3.7 und 2.3.12).



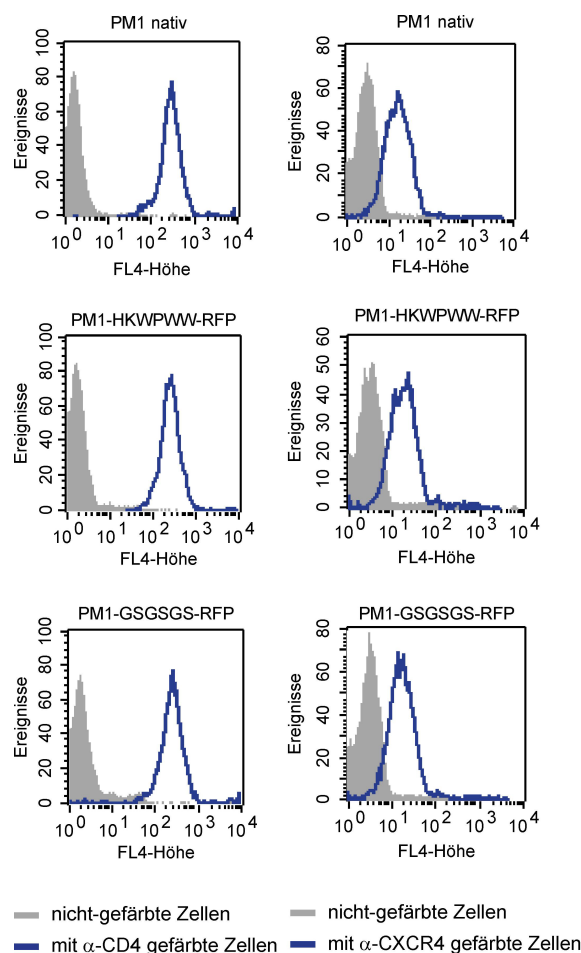
**Abbildung 3.19:** Hemmung der HIV-Replikation in der HKWPWW-RFP-exprimierenden PM1-Zelllinie. Native PM1-Zellen sowie HKWPWW-RFP- bzw. GSGSGS-RFP- exprimierende PM1-Zelllinien wurden in Triplikaten mit HIV-1 infiziert. Die Virusproduktion in den Zellkulturüberständen wurde nach Auswaschen des Virus (Tag 1) sowie am Tag fünf nach der Infektion durch p24-ELISA quantifiziert.

Die Quantifizierung der in den Überständen enthaltenen p24-Konzentration zeigt, dass fünf Tage nach der Infektion von der PM1-GSGSGS-RFP Zelllinie bzw. von nativen Zellen im Mittel etwa 60.000 pg p24/ml freigesetzt werden. Hingegen enthalten die von der PM1-HKWPWW-RFP Zelllinie stammenden Überstände im Mittel ca. 18.000 pg p24/ml. Dieser Wert entspricht 30% der p24-Antigenmenge, welche von den beiden Kontrollzelllinien freigesetzt wird (Abb. 3.19). Die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins in PM1-Zellen hemmt somit über einen Zeitraum von fünf Tagen die HIV-1<sub>NL4-3</sub> Replikation bis zu 70%.



### 3.4.3 Expression der CD4/CXCR4-Rezeptoren auf Peptid-exprimierenden T-Zelllinien

Nach Infektion mit HIV-1<sub>NL4-3</sub> setzt die PM1-HKWPWW-RFP Zelllinie weniger p24-Antigen in die Überstände frei als die Kontrollzelllinie bzw. native Zellen (Kapitel 3.4.2). Diese HIV-Replikationshemmung könnte auch auf eine verminderte Infektionsrate der PM1-HKWPWW-RFP Zelllinie zurückzuführen sein. Möglich wäre z.B., dass das HKWPWW-RFP-Fusionsprotein zu einer Herunterregulierung der Expression der für die HIV-Infektion notwendigen zellulären Rezeptoren führt. Verantwortlich für die HIV-Infektion von T-Zelllinien sind sowohl der CD4- als auch der CXCR4-Rezeptor (bei X4-tropen HIV-Stämmen) bzw. der CCR5-Rezeptor (bei R5-tropen HIV-Stämmen). Da es sich bei HIV-1<sub>NL4-3</sub> um einen X4-tropen Stamm handelt, wurde die Oberflächenexpression der CD4- sowie CXCR4-Rezeptoren auf den PM1-HKWPWW-RFP- und PM1-GSGSGS-RFP-Zelllinien sowie auf den nativen Zellen analysiert.



**Abbildung 3.20:** Expression der CD4- und CXCR4-Rezeptoren auf PM1-Zelllinien. Native PM1-Zellen sowie PM1-HKWPWW-RFP- und PM1-GSGSGS-RFP-Zelllinien wurden mit monoklonalen  $\alpha$ -CD4 oder  $\alpha$ -CXCR4-Antikörpern inkubiert und deren Bindung mittels fluoreszenzmarkierter Sekundäntikörper nachgewiesen. Die Analyse CD4-/CXCR4-exprimierender Zellen erfolgte am FACS-Gerät im vierten Kanal (FL4).

Zunächst wurden die Rezeptoren mit monoklonalen Erstantikörpern beladen und anschließend deren Bindung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern mittels FACS-Analyse nachgewiesen (Kapitel 2.3.6.4). Abb. 3.20 zeigt, dass der Anteil CD4<sup>+</sup>- und CXCR4<sup>+</sup>-Zellen in allen drei Zelllinien vergleichbar hoch ist. Unabhängig von der Zelllinie exprimieren nahezu alle Zellen sowohl den CD4- als auch den CXCR4-Rezeptor, welches auch für eine T-Zelllinie zu erwarten ist. Jedoch ist die Expression des CXCR4-Rezeptors vermutlich schwächer als die des CD4-Rezeptors, da der Peak der mit  $\alpha$ -CXCR4 gefärbten Zellen etwa eine Logstufe niedriger liegt als der Peak der mit  $\alpha$ -CD4 gefärbten Zellen. Da alle drei Zelllinien einen vergleichbaren Anteil CD4<sup>+</sup>- sowie CXCR4<sup>+</sup>-Zellen aufweisen, sind die beobachteten Unterschiede in der HIV-1<sub>NL4-3</sub>-Replikation nicht auf unterschiedliche Infektionsraten zurückzuführen.

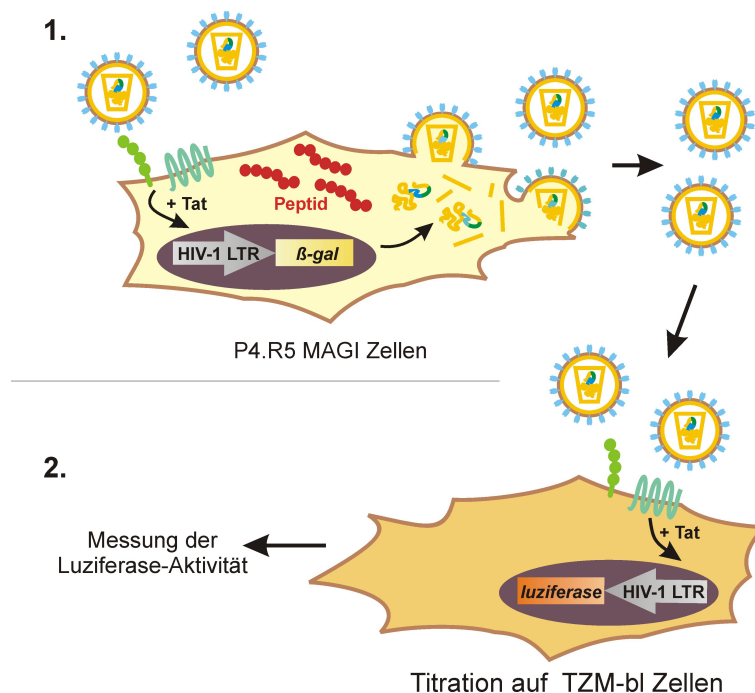
### 3.5 Transduktion des HKWPWW-Peptids über eine Proteintransduktionsdomäne

Für die bisher gezeigten Ergebnisse wurde die genetische Information des HKWPWW-Peptids in verschiedene Zelltypen eingebracht und in Fusion mit RFP exprimiert. Dadurch konnte eine Hemmung der Virusproduktion erreicht werden (Kapitel 3.3 und 3.4).

Um nachzuweisen, dass alleine das HKWPWW-Peptid für den beobachteten antiviralen Effekt verantwortlich ist, wurde das Peptid in Verbindung mit einer Proteintransduktionsdomäne (PTD) synthetisiert. Proteintransduktionsdomänen können die Zellmembran effizient überqueren, welche aufgrund ihrer negativen Ladung eine Barriere für Peptide und andere Makromoleküle darstellt (Kapitel 1.2.3) <sup>66,70,195,265</sup>. Zur Testung der antiviralen Wirksamkeit in Zellkultur wurden das HKWPWW-Peptid sowie das GSGSGS-Kontrollpeptid in Fusion mit einer PTD chemisch synthetisiert, welche Homologien zu dem HIV-1 Tat-Protein sowie zu der NLS (nuclear localization signal) des großen SV-40 Antigens (Simian Virus 40) aufweist und im hohen Maße positiv geladen ist <sup>213,315</sup>. Um die zelluläre Aufnahme mikroskopisch beurteilen zu können, erfolgte die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin am C-terminalen Ende der Peptide. (Kapitel 2.1.8).

### 3.5.1 Etablierung eines funktionellen Assays zur Testung der inhibitorischen Eigenschaften des HKWPWW-Peptids

Zunächst stand die Auswahl eines geeigneten funktionellen Assays zur Testung der antiviralen Aktivität des freien Peptids im Vordergrund. Aufgrund der unbekanntenen Stabilität des freien Peptids in Säugetierzellen, war es notwendig, den geeigneten Zeitpunkt für die Zugabe des Peptids zu bestimmen. Das Peptid sollte dann zu infizierten Zellen zugegeben werden, wenn die Verpackung neuer HI-Virionen stattfindet.

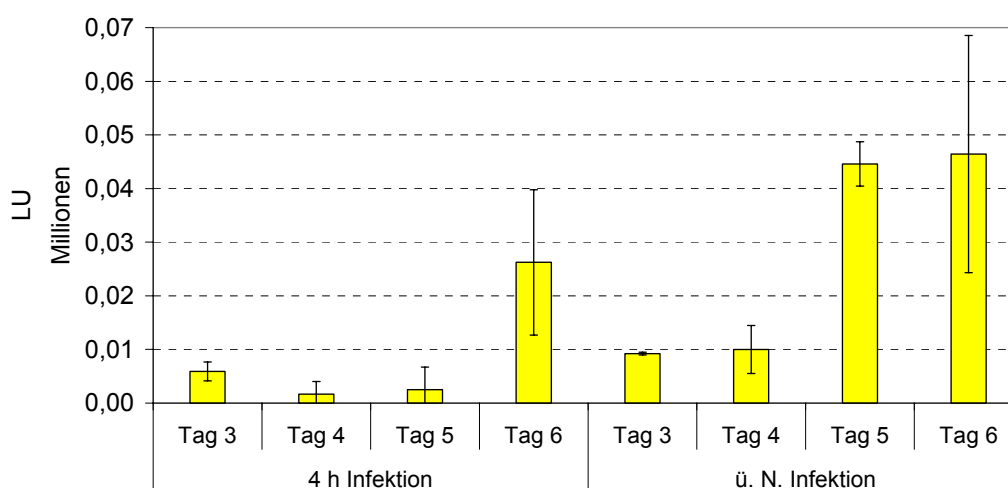


**Abbildung 3.21:** Versuchsaufbau zur Testung der inhibitorischen Eigenschaften des HKWPWW-Peptids. P4.R5 MAGI-Zellen wurden mit HIV infiziert und dann das Peptid zugegeben. Die Menge der produzierten HI-Viren wurde über Titration auf TZM-bl-Zellen bestimmt, welche über einem HIV-1 LTR-Promotor das *luziferase*-Gen exprimieren.

Für die Infektionsversuche wurden P4.R5 MAGI-Zellen (multinuclear activation of a galactosidase indicator) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine HeLaP4-Zelllinie, welche neben dem endogenen CXCR4- noch den CD4- sowie den CCR5-Rezeptor exprimiert. Die Zelllinie enthält unter Kontrolle eines HIV-1 LTR-Promotors das  $\beta$ -galaktosidase Gen. Nach Infektion mit HIV-1 produziert das integrierte Virus das Tat-Protein, welches dann in einer Aktivierung des HIV-1-Promotors sowie der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression resultiert. Um die Menge verpackter HI-Viren zu bestimmen, wurden von infizierten P4.R5 MAGI-Zellen nach Infektion die Überstände abgenommen und auf der Indikatorzelllinie TZM-bl getitert (Abb. 3.21). Diese Zellen exprimieren über einen HIV-1-LTR-Promotor das „firefly luciferase“-

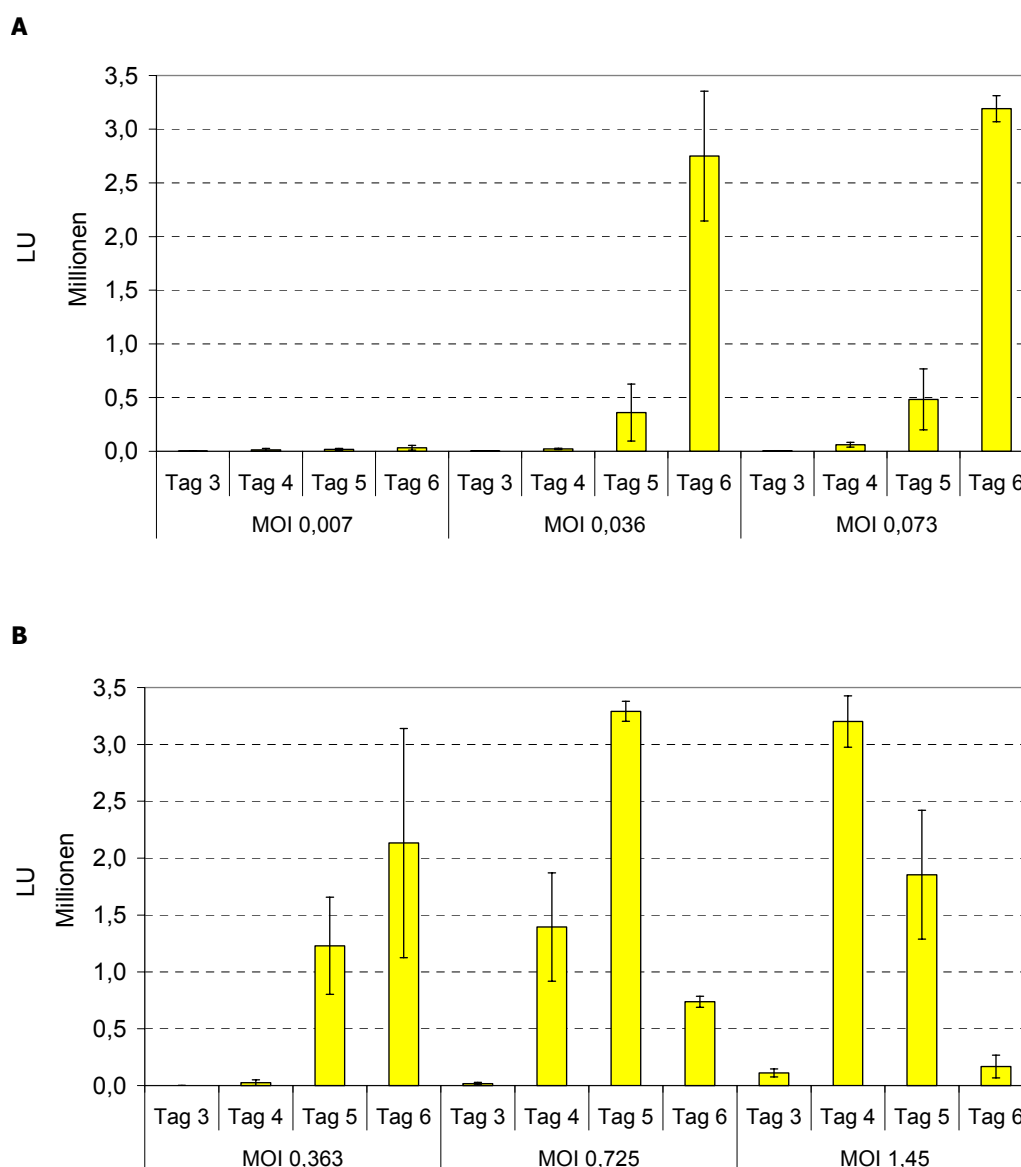
Gen. Nach Infektion der TZM-bl-Zellen mit HIV-haltigen Überständen und nachfolgender Zelllyse ist die Aktivität des Luziferase-Reporterenzym ein direktes Maß für den infektiösen Titer der HIV-Präparation.

Um den Zeitpunkt der Verpackung von HI-Viren in infizierten P4.R5 MAGI-Zellen zu bestimmen, wurden P4.R5 MAGI-Zellen in vierfachen Ansätzen unterschiedliche lange mit HIV-1<sub>LAI</sub> bzw. mit unterschiedlichen MOIs infiziert. Nach Auswaschen der Viren erfolgte die Überstandsabnahme über einen Zeitraum von drei bis sechs Tagen und die Titration der Überstände auf TZM-bl-Zellen. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität in den Zelllysaten gemessen, als LU (light units) angegeben und daraus die Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt (Kapitel 2.3.13, 2.3.13.1 und 2.3.13.2).



**Abbildung 3.22:** Abhängigkeit der Virusproduktion von der Infektionsdauer. P4.R5 MAGI-Zellen wurden in vierfachen Ansätzen mit HIV-1 bei einer MOI von 0,6 für vier Stunden oder über Nacht (18 h) infiziert. Nach Auswaschen des Virus am zweiten Tag wurde die in die Überstände abgegebene Virusmenge über Titration auf TZM-bl-Zellen bestimmt. Die Luziferaseaktivität in den TZM-bl-Zelllysaten ist proportional zu der im Überstand enthaltenen, infektiösen Virusmenge.

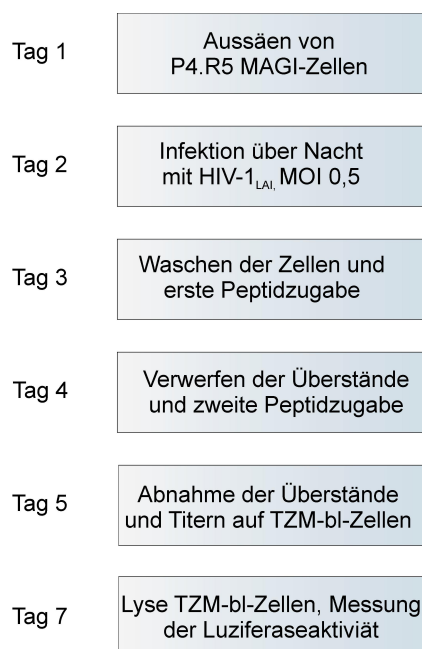
Es erfolgte die Infektion von P4.R5 MAGI-Zellen mit einer MOI von 0,6 vier Stunden bzw. über Nacht. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und deren infektiöser Titer bestimmt (Abb. 3.22). Dabei stellte sich heraus, dass eine Infektion über Nacht effektiver ist als eine Infektion über vier Stunden. Bereits am fünften Tag ist ein Anstieg der Luziferaseaktivität und damit einhergehend ein Anstieg des viralen Titers zu beobachten, während dies bei einer vierstündigen Infektion erst später der Fall ist. Für die weiteren Experimente wurde somit die Infektion über Nacht gewählt.



**Abbildung 3.23:** Abhängigkeit der Virusproduktion von der für die Infektion eingesetzten Virusmenge (MOI). **A:** Infektion von P4.R5 MAGI-Zellen mit MOIs von 0,007 – 0,073. **B:** Infektion von P4.R5. MAGI-Zellen mit MOIs im Bereich von 0,0363 bis 1,45. Die Infektion erfolgte über Nacht in vierfachen Ansätzen mit den jeweils angegebenen MOIs. Die in die Überstände abgegebene Virusmenge wurde über Titration auf TZM-bl-Zellen bestimmt. Die Luziferaseaktivität in den TZM-bl-Zellysaten ist proportional zu der in den Überständen enthaltenen, infektiösen Virusmenge.

Anschließend wurden P4.R5 MAGI-Zellen über Nacht mit verschiedenen MOIs infiziert (Abb. 3.23 A und B). Dabei korreliert der Zeitpunkt des Titeranstiegs mit der eingesetzten MOI. Bei Verwendung niedriger MOIs von 0,07 und darunter ist erst zwischen Tag fünf und sechs ein Anstieg der Luziferaseaktivität zu beobachten (Abb. 3.23 A). Bei hohen MOIs (über 0,7) steigt die Luziferaseaktivität bereits zwischen Tag vier und fünf an. Danach sinkt die Luziferaseaktivität wieder ab, dies wird vermutlich durch das Absterben der TZM-bl-Zellen hervorgerufen (Abb. 3.23 B). Für die folgenden Inhibitionsversuche wird ein moderater MOI-Bereich von 0,5 gewählt. In diesem MOI-Bereich beginnt die HIV-

Produktion zwischen Tag drei und vier. Aufgrund der unbekanntenen Stabilität des HKWPWW-Peptids in eukaryontischen Zellen, war es notwendig die infizierten P4.R5 MAGI-Zellen am Tag drei sowie am Tag vier zu behandeln, um eine inhibitorische Wirkung zu erzielen.



**Abbildung 3.24:** Zeitschema zur antiviralen Testung von Peptiden in HIV-1-infizierten P4.R5 MAGI-Zellen.

Der sich daraus ergebende Zeitplan für die Inhibitionsversuche ist in Abb. 3.24 gezeigt. Nach der HIV-Infektion und dem Auswaschen des Virus am dritten Tag wurden die Peptide zu den P4.R5 MAGI-Zellen gegeben. Am vierten Tag wurde das peptidhaltige Medium entfernt und durch neues Medium mit Peptiden ersetzt. Die Analyse der in den Überstand abgegebenen Virusmenge erfolgte am fünften Tag durch Titern auf TZM-bl-Zellen (44 Stunden Infektion).

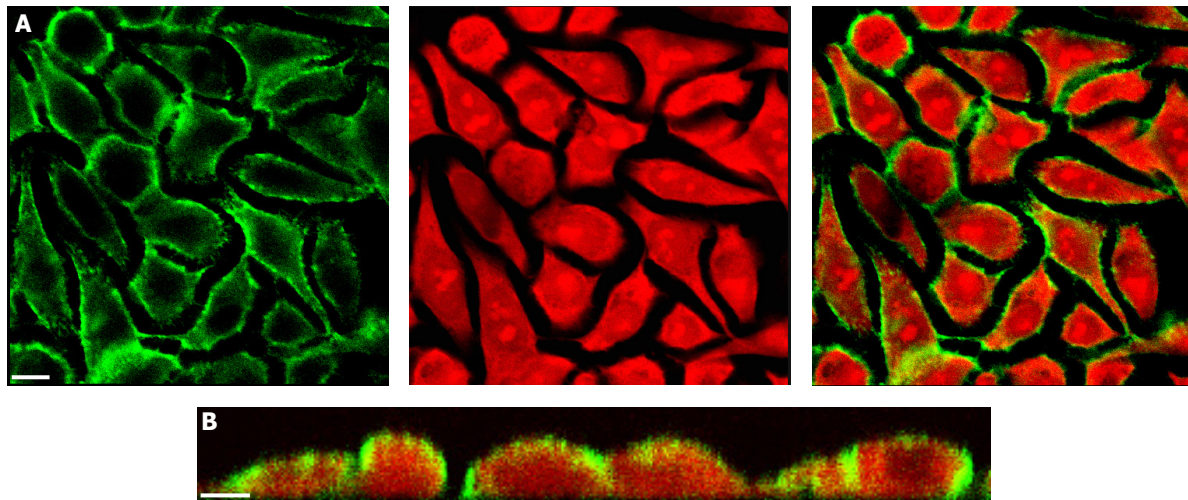
### 3.5.2 Zelluläre Aufnahme von Peptiden in P4.R5 MAGI-Zellen

Nach Etablierung des Testsystems zur Analyse der antiviralen Wirksamkeit, folgte im nächsten Schritt die Untersuchung, ob die an eine PTD konjugierten Peptide unter diesen Bedingungen von eukaryotischen Zellen aufgenommen werden.

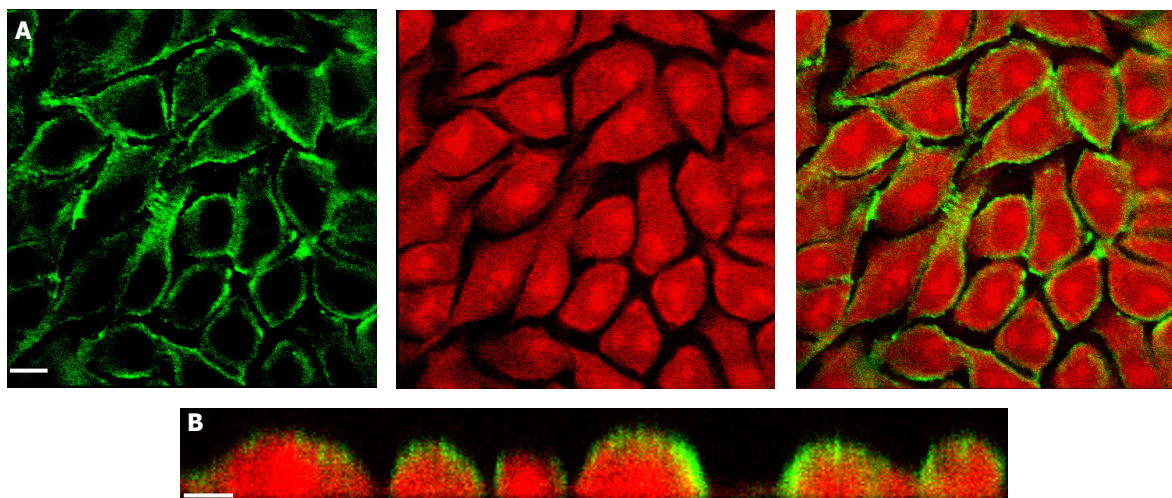
Da sowohl das HKWPWW als auch das GSGSGS-Peptid mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin konjugiert sind, ist es möglich, die intrazelluläre Lokalisation am CLSM zu analysieren. Hierfür wurde nach dem in Abb. 3.24 dargestellten Zeitplan vorgegangen, wobei die



Zellen nicht mit HIV-1 infiziert wurden. Nach dem Auswaschen der überschüssigen Peptide erfolgte die Fixierung der Zellen und die Zellmembranfärbung (Kapitel 2.3.10.2).



**Abbildung 3.25:** Zelluläre Aufnahme des HKWPWW-SQP-KRRKK-Rhodamin-Peptids. P4.R5 MAGI-Zellen wurden wie in Abb. 3.24 angegeben zweimal mit 40  $\mu$ M Peptid (rot) für 24 h inkubiert. Nach Auswaschen überschüssigen Peptids wurden die Zellen mit Alexa488-konjugierten ConcanavalinA (grün) gefärbt und im CLSM analysiert. A: Bilder aus inneren Regionen der Zellen in z-Ebene. B: Aufnahmen der Zellen in y-Ebene. Maßstab 5  $\mu$ m



**Abbildung 3.26:** Zelluläre Aufnahme des GSGSGS-SQP-KRRKK-Rhodamin-Peptids. P4.R5 MAGI-Zellen wurden wie angegeben (Abb. 3.24) zweimal mit 40  $\mu$ M Peptid (rot) für 24 h inkubiert. Nach Auswaschen überschüssigen Peptids erfolgte die Färbung der Zellen mit Alexa488-konjugierten ConcanavalinA (grün) und die Analyse im CLSM. A: Aufnahmen aus inneren Regionen der Zellen in z-Ebene. B: Bilder der Zellen in y-Ebene. Maßstab 5  $\mu$ m

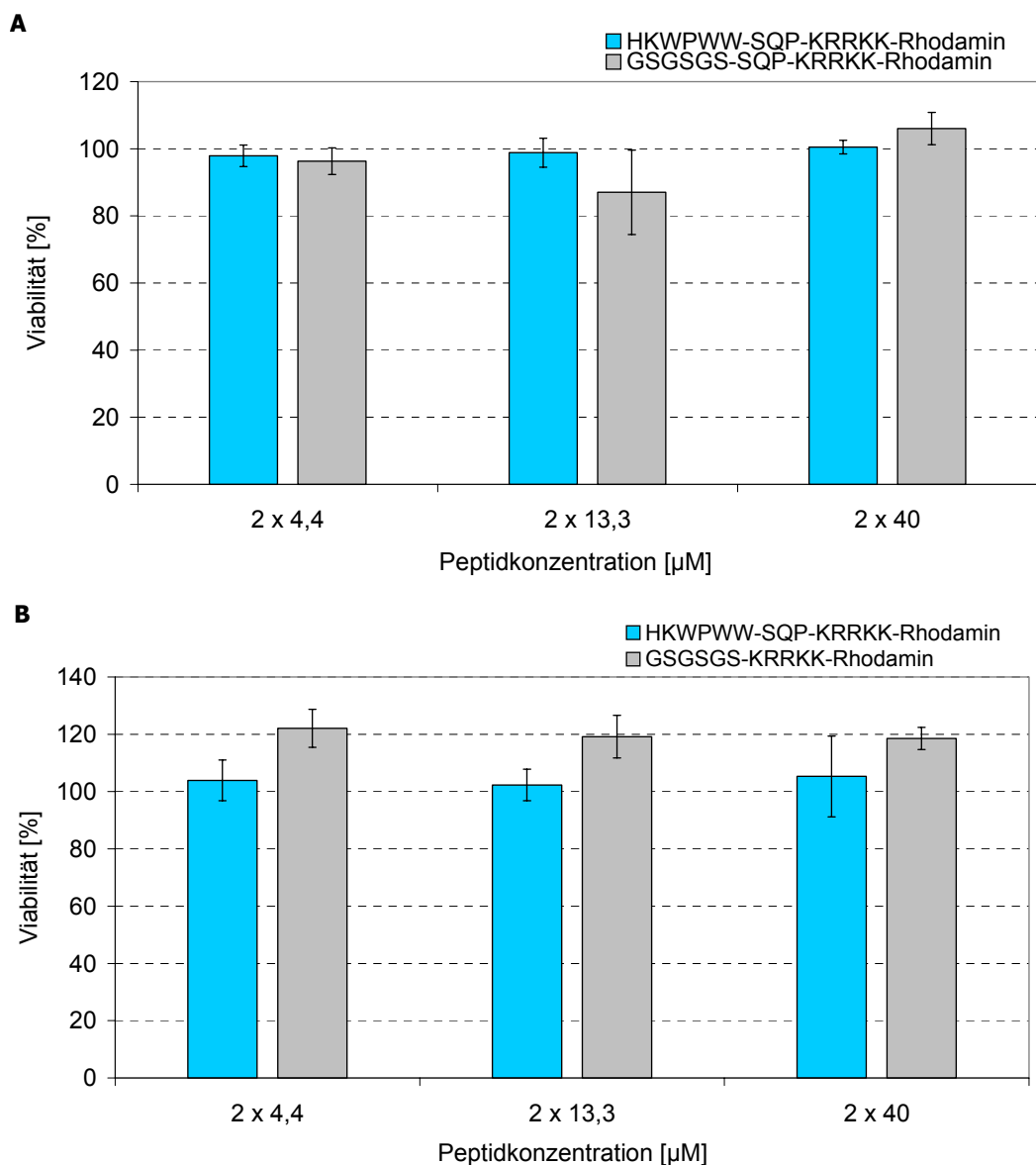
In Abb. 3.25 ist die Lokalisation des HKWPWW-Peptids (rot) und in Abb. 3.26 die des GSGSGS-Peptids (rot) mit gleichzeitiger Färbung der Zellmembran (grün) illustriert. Die konfokalen Aufnahmen zeigen, dass beide Peptide im Inneren der P4.R5 MAGI-Zellen zu detektieren sind. Dies tritt besonders hervor, bei Betrachtung der y-Schnittebenen aus dem Inneren der P4.R5 MAGI-Zellen (Abb. 3.25 B und 3.26 B). Beide Peptide sind sowohl

zytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert. Im Mischbild sind wenige Areale gelb gefärbt, was auf eine marginale Lokalisation der Peptide an der Zellmembran hindeutet (Abb. 3.25 A und B, 3.26 A und B).

### 3.5.3 Untersuchung der Zytotoxizität von Peptiden

Ein großer Nachteil vieler Proteintransduktionsdomänen ist ihre zellschädigende Wirkung. Daher wurde im folgenden analysiert, in welchen Konzentrationen die Peptide im Zellsystem verträglich sind. Dies ist eine Voraussetzung für die effektive Testung der Wirksamkeit. Die Zytotoxizität wurde sowohl in P4.R5 MAGI-Zellen als auch in TZM-bl Zellen getestet, da in diesen Zelltypen eine Wirksamkeit gezeigt werden sollte. Zur Bestimmung der Zytotoxizität in beiden Zelllinien wurde nach dem Zeitplan in Abb. 3.24 vorgegangen, wobei keine HIV-Infektion stattfand. Die Bestimmung der Zytotoxizität in beiden Zelllinien erfolgte mittels des ViaLight<sup>®</sup> Plus Kits der Firma Cambrex. Der Test beruht auf der lumineszimetrischen Messung von ATP, das in allen metabolisch aktiven Zellen vorhanden ist. Die dabei freigesetzte Lichtintensität steht im linearen Verhältnis zur ATP-Konzentration und kann an einem Luminometer quantifiziert werden (Kapitel 2.3.13.4). Da der  $K_D$ -Wert des HKWPWW-Peptids hinsichtlich der Bindung an SL3-RNA *in vitro* auf  $1,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$  bestimmt wurde, war es notwendig, das Peptid im mittleren mikromolaren Bereich auf eine Wirksamkeit und Toxizität zu testen (Kapitel 3.2). Im Rahmen von Vorversuchen wurde analysiert, dass die HIV-Produktion bei der in den Inhibitionsversuchen verwendeten MOI von 0,5 zwischen Tag drei und vier beginnt (Kapitel 3.5.1). Da darüber hinaus die Stabilität der Peptide in eukaryotischen Zellen unbekannt war, erfolgte eine zweimalige Peptidzugabe. P4.R5 MAGI-Zellen wurden nach dem in Abb. 3.24 dargestellten Schema in vierfachen Ansätzen am Tag drei und vier mit Peptiden behandelt, am fünften Tag erfolgte die Messung der Zellviabilität. Die abgenommenen peptidhaltigen Überstände wurden anschließend für weitere 44 Stunden auf TZM-bl-Zellen gegeben. Darauf erfolgte die Analyse der Viabilität der TZM-bl-Zellen. Aus den gemessenen Werten der Luziferaseaktivität wurden die Mittelwerte berechnet und auf die mittlere Luziferaseaktivität unbehandelter Zellen normiert (Gleichung 2.4). Es folgte die Angabe der Standardabweichungen sowie der prozentualen Viabilität der Zellen.





**Abbildung 3.27:** Zytotoxizitätsuntersuchung der Peptide. **A:** in P4.R5 MAGI-Zellen. **B:** in TZM-bl-Zellen. P4.R5 MAGI-Zellen wurden in vierfachen Ansätzen zweimal für jeweils 24 h mit Peptiden behandelt und dann die Zellviabilität gemessen. Mit den zuvor abgenommenen Überständen wurden TZM-bl-Zellen 44 Stunden inkubiert und dann die Viabilität dieser Zellen ermittelt. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte über die luminometrische Quantifizierung der von den Zellen freigesetzten ATP-Menge. Die Werte sind angegeben als prozentuale Viabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

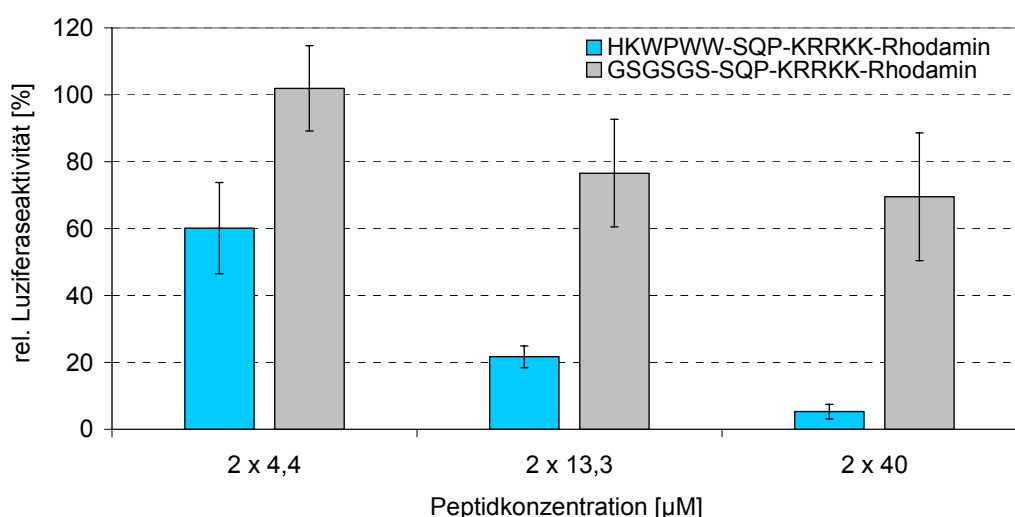
Abb. 3.27 A und B zeigen die Auswertungen der Zytotoxizitätsanalysen. Nach der Peptidbehandlung weisen sowohl P4.R5 MAGI- als auch TZM-bl-Zellen eine vergleichbar hohe Viabilität wie unbehandelte Zellen auf. Beide Peptide HKWPWW und GSGSGS üben innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs keine zytotoxischen Effekte auf keine der beiden Zelllinien auf. Folglich kann die antivirale Wirksamkeit beider Peptide innerhalb dieses Konzentrationsbereiches getestet werden.

### 3.5.4 Testung der antiviralen Wirksamkeit des HKWPWW-Peptids

In den bisher durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die an eine PTD gekoppelten Peptide HKWPWW und GSGSGS von eukaryotischen Zellen internalisiert werden (Kapitel 3.5.2). Ferner wurde ein Konzentrationsbereich ermittelt, in dem beide Peptide nicht toxisch für die verwendeten Zelllinien sind (Kapitel 3.5.3). Somit sind alle Voraussetzungen für die Testung der antiviralen Wirksamkeit der Peptide erfüllt.

#### 3.5.4.1 Hemmung der HIV-1 Produktion in P4.R5 MAGI-Zellen

Zunächst wurde im Rahmen der antiviralen Wirksamkeitsanalyse untersucht, ob das HKWPWW-Peptid die HIV-1 Virusproduktion hemmt. Dies erfolgte nach dem in Abb. 3.24 dargestellten Zeitplan. Nach Infektion der P4.R5 MAGI-Zellen mit HIV-1 wurden jeweils am dritten und vierten Tag Peptide in vierfachen Ansätzen zugegeben und am fünften Tag die Überstände abgenommen und auf TZM-bl-Zellen titriert. Die Aktivität des Luziferase-Reporterenzym in den TZM-bl Zellen ist ein Maß für den HIV-Gehalt des entsprechenden Überstands (Kapitel 2.3.13.2 und 3.5.1). Es erfolgte die Normierung der Mittelwerte der Luziferaseaktivität auf die mittlere Luziferaseaktivität von Zellen, welche mit virushaltigen Überständen (ohne vorherige Peptidzugabe) behandelt wurden, sowie die Berechnung der Standardabweichungen (Gleichungen 2.3 A und B).



**Abbildung 3.28:** Inhibition der Virusproduktion nach Behandlung mit HKWPWW. P4.R5 MAGI-Zellen wurden in vierfachen Ansätzen mit HIV-1 infiziert und zweimal jeweils 24 Stunden mit Peptiden behandelt. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und deren Titer auf TZM-bl-Zellen bestimmt. Die Luziferaseaktivität in TZM-bl-Zellen ist ein Maß für den infektiösen Titer der viralen Präparation. Die Werte sind angegeben als prozentuale Luziferaseaktivität im Vergleich zu Zellen, die nur mit virushaltigen Überständen (ohne Peptide) behandelt wurden.

Abb. 3.28 zeigt, dass die Zugabe des GSGSGS-Kontrollpeptides nur zu einer geringen Abnahme des infektiösen Titers in den Überständen führt. Bei der Zugabe der Maximalkonzentration des Kontrollpeptids (2x 40  $\mu\text{M}$ ) ist die Luziferaseaktivität und damit einhergehend die Virusproduktion auf etwa 70% reduziert. Hingegen inhibiert das HKWPWW-Peptid konzentrationsabhängig die Bildung infektiöser HI-Virionen. Nach Zugabe von 2x 40  $\mu\text{M}$  Peptid liegt der infektiöse Titer nur noch bei 5% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Somit hemmt das freie HKWPWW-Peptid die Entstehung infektiöser Viren während eines späten Schrittes der HIV-Replikation.

Aus den Mittelwerten der Luziferaseaktivität (LU) lässt sich dann die Inhibition der Peptide berechnen:

$$\text{Inhibition}[\%] = \left( 1 - \left( \frac{\text{Mittelwert LU}_{\text{Probe}}}{\text{Mittelwert LU}_{\text{ohne Peptid}}} \right) \right) \cdot 100$$

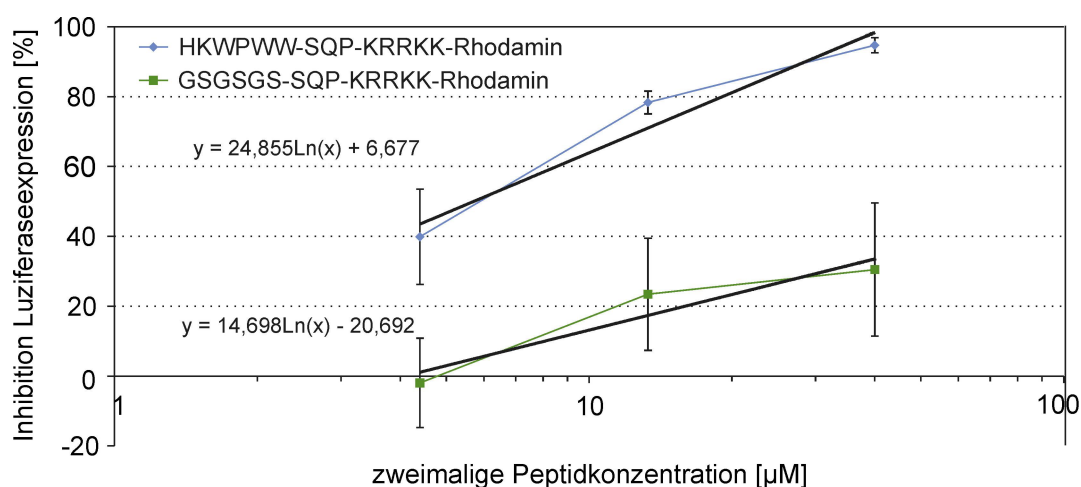
**Gleichung 3.4:** Formel zur Berechnung der Inhibition der Peptide aus den Werten der Luziferaseaktivität. Es erfolgte die Normierung der Mittelwerte der Luziferaseaktivität auf die mittlere Luziferaseaktivität von Zellen, welche mit virushaltigen Überständen (ohne vorherige Peptidzugabe) behandelt wurden ( $\text{LU}_{\text{ohne Peptid}}$ ).

Peptid	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Mittlere Aktivität [%]	Mittlere Inhibition [%]
-	0	100	0
HKWPWW	2x 4,4	60	40
HKWPWW	2x 13,3	22	78
HKWPWW	2x 40	5	95
GSGSGS	2x 4,4	102	-2
GSGSGS	2x 13,3	77	23
GSGSGS	2x 40	70	30

**Tabelle 3.6:** Gegenüberstellung der relativen Luziferaseaktivität sowie der daraus berechneten Inhibition beider Peptide. Die Werte wurden auf die mittlere Luziferaseaktivität von Zellen bezogen, welche nur mit virushaltigen Überständen (ohne vorherige Peptidzugabe) behandelt wurden.

Um zu beurteilen, wie pharmakologisch wirksam eine Substanz ist, werden häufig  $\text{IC}_{50}$ - bzw.  $\text{IC}_{90}$ -Werte benutzt. Diese geben an, bei welcher Konzentration einer Substanz, ein bestimmter biologischer Prozess zu 50%- bzw. 90% inhibiert wird. Zur Ermittlung dieser Werte, wird nach Gleichung 3.4 die Inhibition der Peptide berechnet. Nach Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen werden diese in Tab. 3.6 sowie in Abb. 3.29

dargestellt. Dabei wird in die Inhibition der Luziferaseexpression auf der y-Achse und die Peptidkonzentration auf der x-Achse aufgetragen.



**Abbildung 3.29:** Hemmung der Virusproduktion. Dargestellt als Inhibitionskurve der Luziferaseexpression. Die beiden Ausgleichsgeraden dienen zur Ermittlung der Peptidkonzentrationen, bei deren Zugabe eine 50%- bzw. 90%ige Inhibition der Luziferaseexpression stattfindet.

Mittels zweier Ausgleichsgeraden lassen sich dann aus Abb. 3.29 Gleichungen zur Berechnung der  $IC_{50}$ - bzw.  $IC_{90}$ -Werte ableiten (Gleichung 3.5 A und B). Demnach gilt für das HKWPWW-Peptid Gleichung 3.5 A und für das GSGSGS-Kontrollpeptid Gleichung 3.5 B:

**A**  
 $y = 24,855\ln(x) + 6,677$

**B**  
 $y = 14,689\ln(x) - 20,692$

**Gleichung 3.5:** Formeln zur Berechnung der  $IC_{50}$ - und  $IC_{90}$ -Werte der Peptide. Erstellt aus den Ausgleichsgeraden der Inhibitionskurven. **A:** Gleichung erstellt aus der Inhibitionskurve des HKWPWW-Peptids. **B:** Formel erstellt aus der Inhibitionskurve des GSGSGS-Peptids ( $y =$  Inhibition [%];  $x =$  Peptidkonzentration [ $\mu\text{M}$ ];  $\ln =$  natürlicher Logarithmus).

Nach dem Einsetzen der 50% bzw. 90% Inhibitionswerte ( $y$ ) in die Gleichungen 3.5 A und B errechnen sich folgende korrespondierenden Peptidkonzentrationen ( $x$ ):

Peptid	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$IC_{90}$ [ $\mu\text{M}$ ]
HKWPWW	2x 5,7	2x 28,6
GSGSGS	2x 122,7	2x 1865,1

**Tabelle 3.7:** Darstellung der  $IC_{50}$ - sowie  $IC_{90}$ -Werte für das HKWPWW- sowie GSGSGS-Peptid. Die Werte geben die Peptidkonzentrationen an, die notwendig sind, um die Virusproduktion zu 50% bzw. 90% im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu hemmen.

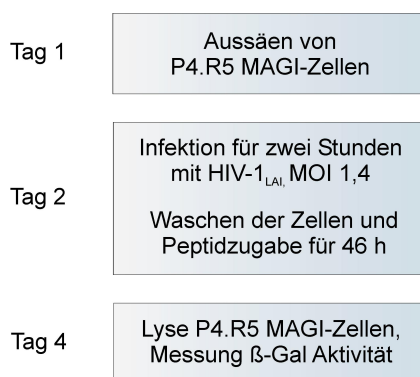
Wie in Tab. 3.7 zu sehen, liegen für das HKWPWW-Peptid die  $IC_{50}$ - bzw.  $IC_{90}$ -Werte bei der Zugabe von  $2 \times 5,7 \mu\text{M}$  bzw.  $2 \times 28,6 \mu\text{M}$  Peptid. Hingegen sind die  $IC_{50}$ - und  $IC_{90}$ -Werte des GSGSGS-Kontrollpeptids um ein Vielfaches erhöht und liegen im hohen mikromolaren bzw. im millimolaren Bereich.

### 3.5.4.2 Inhibition der frühen Replikationsschritte von HIV-1

Es wurde bereits gezeigt, dass HKWPWW im niedrigen mikromolaren Bereich die HIV-1 Virusproduktion hemmt (Kapitel 3.5.4.1). Es stellte sich anschließend die Frage, ob das Peptid auch frühe Replikationsschritte von HIV-1 hemmen könnte. Hierzu zählen die Reverse Transkription, die Integration proviraler DNA sowie die Transkription des HIV-1 Genoms (Kapitel 1.1.6) <sup>92,93,110</sup>. Verantwortlich für die Transkription der HIV-1 Gene ist die Interaktion des Tat-Proteins mit der TAR Stemloop-Struktur. Das Tat-Protein wird nach Integration des Provirus exprimiert und sorgt für eine Verstärkung der Transkriptionsrate des HIV-Genoms (Kapitel 1.1.4) <sup>91,147,233,298</sup>.

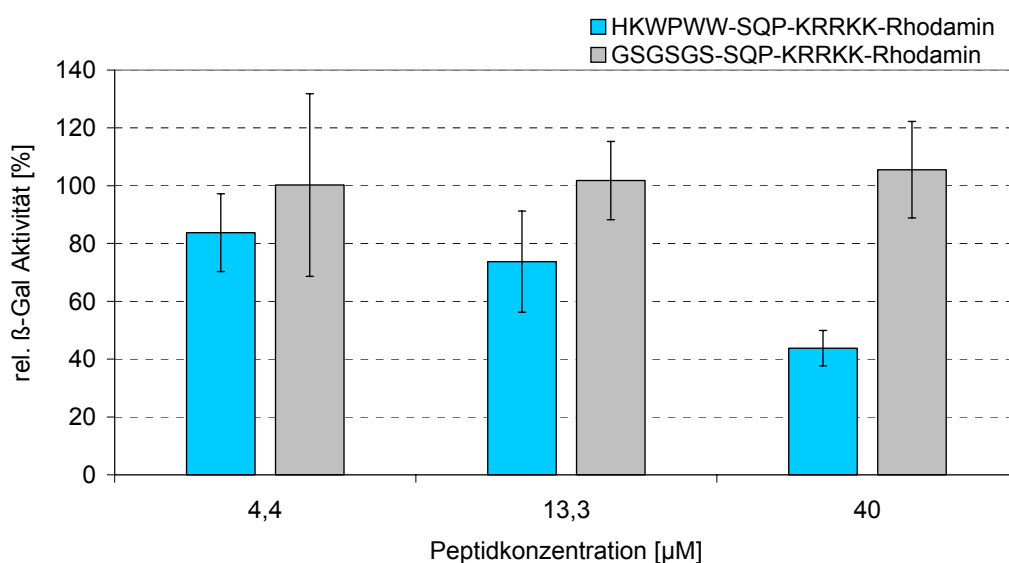
Im Rahmen vorangegangener Studien in Kooperation mit Prof. Mély aus Strasburg, konnte mittels Fluoreszenzmessungen ebenfalls eine Bindung des HKWPWW-Peptids an die TAR Stemloop-Struktur nachgewiesen werden <sup>241</sup>. Folglich ist davon auszugehen, dass das HKWPWW-Peptid möglicherweise zusätzlich die Tat/TAR Interaktion inhibieren und mit der HIV-1 Transkription interferieren könnte. Um dies zu untersuchen, wurden P4.R5 MAGI-Zellen verwendet, welche  $\beta$ -Galaktosidase über einen HIV-1 LTR-Promotor exprimieren (Kapitel 3.5.1). Somit ist die Expression des Reporterenzym direkt von der Tat/TAR-RNA-Interaktion abhängig. Eine Inhibition der Tat/TAR-Interaktion spiegelt sich daher in einer reduzierten  $\beta$ -Galaktosidaseexpression wider, welche luminometrisch messbar ist.

Um den Einfluss des HKWPWW-Peptids auf die frühen Replikationsschritte von HIV-1 zu untersuchen, erfolgte die Adaption des in Kapitel 3.5.1 beschriebenen experimentellen Aufbaus. Hierfür wurden P4.R5 MAGI-Zellen in vierfachen Ansätzen für zwei Stunden mit HIV-1 infiziert, anschließend die Peptide einmal zugegeben und am vierten Tag die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Zelllysaten gemessen (Abb. 3.30, Kapitel 2.3.13.5). Die kurze Infektionszeit (zwei Stunden) sowie die frühere Beendigung des Experiments als in Kapitel 3.5.1 beschrieben, sollten den Beginn der nächsten HIV-Replikationsrunde verhindern. Aufgrund dieser kürzeren Laufzeit des Experiments, mussten die Peptide nur einmal zugegeben werden (Abb. 3.30).



**Abbildung 3.30:** Zeitschema zur Analyse der Hemmung früher HIV-1-Replikationsschritte in infizierten P4.R5 MAGI-Zellen.

Aus den gemessenen Werte für die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden die Mittelwerte berechnet und auf die mittlere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von HIV-infizierten, jedoch unbehandelten P4.R5 MAGI-Zellen bezogen (Gleichung 2.5). Nach Berechnung der Standardabweichungen erfolgte die Angabe der relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (Abb. 3.31).



**Abbildung 3.31:** Hemmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in P4.R5 MAGI-Zellen nach Behandlung mit HKWPWW. P4.R5 MAGI-Zellen wurden in vierfachen Ansätzen mit HIV-1 infiziert und einmal mit Peptiden behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität luminometrisch gemessen. Angegeben ist die prozentuale  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zu Zellen, die nur mit HIV infiziert und nicht mit Peptiden behandelt wurden.

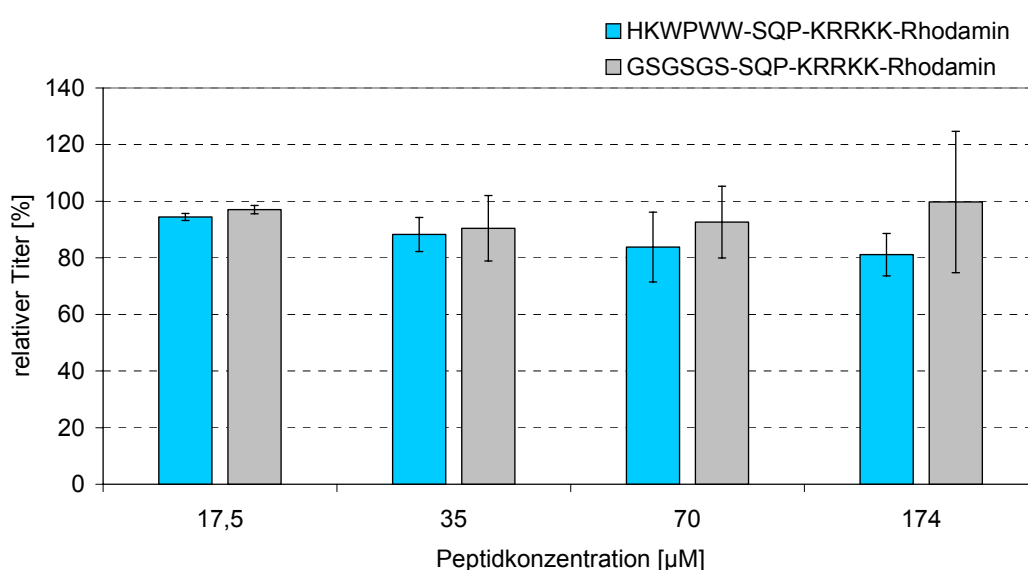
Die Auswertung des Experiments zeigt, dass das HKWPWW-Peptid zu einer dosisabhängigen Abnahme der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität führt (Abb. 3.31). Dies ist gleichzusetzen mit einer Inhibition der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression. Während das GSGSGS-Kontrollpeptid keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Expression ausübt, führt die Zugabe der höchsten Konzentration des HKWPWW-Peptids (40  $\mu$ M) zur Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase-

Expression auf 40%. Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass das HKWPWW-Peptid neben der Produktion von HI-Viren zusätzlich frühe Replikationsschritte hemmt.

### 3.5.4.3 Virolytische Aktivität des HKWPWW-Peptids

Das HKWPWW-Peptid weist interessanterweise Homologien zu kurzen, kationischen, antimikrobiellen Peptiden auf, welche unilamellare Vesikel lysieren<sup>250,268</sup>. Eines dieser Peptide, Indolicidin (ILPWKWPWWPWR), wurde aus bovinen Neutrophilen isoliert und übt virolytische Eigenschaften auf HIV-1 aus. So führte Indolicidin bei einer Konzentration von 174  $\mu\text{M}$  bei einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C zu einer vollständigen Inaktivierung von HIV-1<sup>250</sup>.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie, sollte ebenfalls eine mögliche virolytische Aktivität des HKWPWW-Peptids getestet werden. Hierfür wurden lentivirale Pseudoviren hergestellt, welche das GFP-Gen verpacken und diese für eine Stunde bei 37°C mit dem HKWPWW-Peptid bzw. dem GSGSGS-Kontrollpeptid inkubiert. Zur Bestimmung des Virustiters nach der Peptidbehandlung wurde das Gemisch in Duplikaten auf 293T-Zellen gegeben (Kapitel 2.3.4 und 2.3.14). Bei einer virolytischen Aktivität des Peptids, sollten die lentiviralen Pseudoviren inaktiviert werden und somit der infektiöse Titer nach der Peptidbehandlung in der Präparation geringer sein. Es erfolgte die Titerbestimmung mittels FACS-Analyse und die Normierung der Mittelwerte auf den mittleren Titer von Pseudoviren, welche nicht mit Peptiden behandelt wurden sowie die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen (Gleichung 2.6).



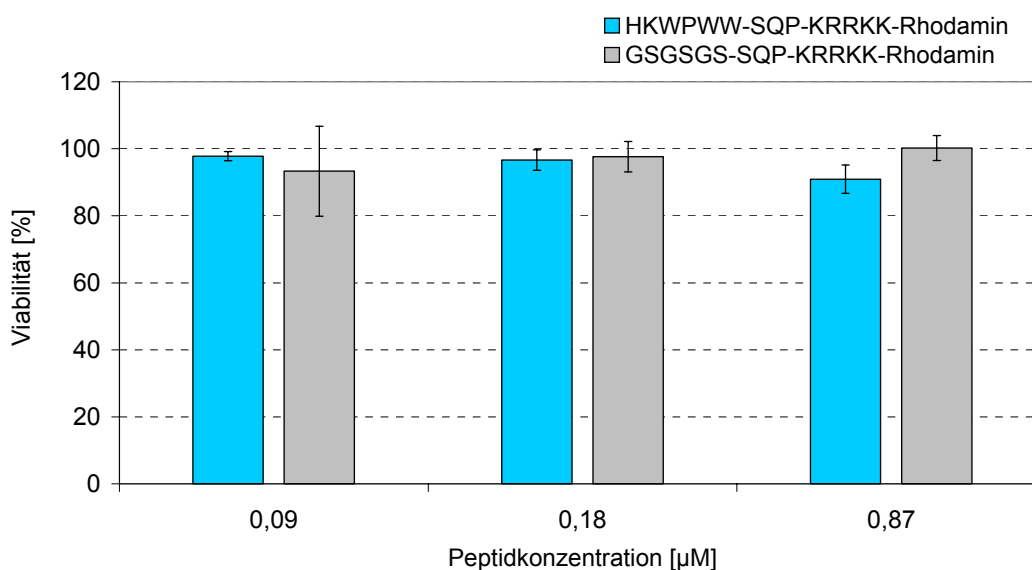
**Abbildung 3.32:** Virolytische Aktivität des HKWPWW-Peptids. Lentivirale Pseudoviren wurden eine Stunde bei 37°C mit Peptiden inkubiert. Es folgte die Transduktion von 293T-Zellen in Duplikaten mit den verdünnten Überständen und die Bestimmung des Titers über FACS-Analyse GFP-positiver Zellen. Angegeben ist der relative Titer im Vergleich zu unbehandelten Pseudoviren.

Abb. 3.32 zeigt, dass der Titer von Lentiviren nach Zugabe sehr hoher Konzentrationen des HKWPWW-Peptids marginal verringert wird. Eine leichte Reduktion der Infektiosität ist erst nach Behandlung mit 174  $\mu\text{M}$  HKWPWW-Peptid zu beobachten.

Um zu untersuchen, ob es hierbei um signifikante Unterschiede handelt, erfolgte die Analyse der Werte mittels eines T-Tests. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt. Die Auswertung zeigt, dass die Titer der Lentiviren nach der Behandlung mit 174  $\mu\text{M}$  des HKWPWW- bzw. GSGSGS-Peptids nicht signifikant unterschiedlich sind ( $p\text{-Wert}_{\text{HKWPWW-GSGSGS}}=0,4757$ ).

Anschließend wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt, um zu verifizieren, dass die Peptide nicht die Viabilität der 293T-Zellen beeinflussen (Kapitel 2.3.13.4). Da die Peptide für die Analyse der Virolyse 1:200 verdünnt auf die Zellen gegeben wurden, lag der für den Toxizitätstest verwendete Konzentrationsbereich zwischen 0,09  $\mu\text{M}$  und 0,87  $\mu\text{M}$ .

Für die Untersuchung der Viabilität von 293T-Zellen wurden diese in Triplikaten mit verdünnten Rhodamin-konjugierten Peptiden inkubiert. Es erfolgte die Normierung der Luziferaseaktivität auf die mittlere Luziferaseaktivität unbehandelter Zellen und die Angabe der prozentualen Viabilität der Zellen (Gleichung 2.4).



**Abbildung 3.33:** Zytotoxizitätsuntersuchung der Peptide. 293T-Zellen wurden in Triplikaten mit Peptiden behandelt und dann die Zellviabilität gemessen. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte über die Quantifizierung der von den Zellen freigesetzten ATP-Menge. Die Werte sind angegeben als prozentuale Viabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass es bis zur maximalen getesteten Konzentration von 0,87  $\mu\text{M}$  (entspricht einem zweihundertstel von 174  $\mu\text{M}$ ) zu keiner auffälligen Reduzierung der Viabilität der 293T-Zellen kommt (Abb. 3.33).



Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das HKWPWW-Peptid lediglich in sehr hohen Konzentrationen eine leichte virolytische Aktivität ausübt. In den Konzentrationen, welche zur Testung der antiviralen Wirksamkeit des Peptids verwendet wurden (maximal  $2 \times 40 \mu\text{M}$ ) ist keine virolytische Aktivität feststellbar.

## 4 Diskussion

Im Jahr 2007 waren laut WHO weltweit 33,2 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert, koinzidierend mit jährlich 2,1 Millionen AIDS-Toten. Diese Entwicklung konnte trotz Einführung der medikamentösen Kombinationstherapie HAART Mitte der 1990er Jahre global nicht aufgehalten werden. Derzeit werden in die HAART verschiedene Inhibitoren der Reversen Transkriptase sowie der Protease von HIV eingesetzt (Kapitel 1.2.1)<sup>59,115,235</sup>. Obwohl unter dieser Therapie die Viruslast im Patienten drastisch reduziert und die Lebenserwartung erhöht wird, stellen die toxischen Nebenwirkungen ein großes Problem dar. Die Hauptursache für das Versagen der antiretroviralen Therapie ist jedoch das rasche Auftreten resistenter Virusvarianten, bedingt durch den hohen Turnover von HIV und die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase<sup>93,235</sup>. Auf molekularer Ebene ist die Resistenzentstehung darin begründet, dass in Anwesenheit der verwendeten Inhibitoren bestimmte Mutationen in den viralen Enzymen selektiert werden. Diese mutierten Enzyme zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine reduzierte Affinität für den Inhibitor aufweisen, ohne dass davon die katalytischen Eigenschaften beeinträchtigt sind. Daher besteht ein großes Interesse darin, antivirale Wirkstoffe zu identifizieren, welche dieses Problem überwinden. Eine Strategie ist, auf die Inhibition viraler Proteine oder RNA-Sequenzen abzielen, welche nicht modifiziert werden können, ohne dass es zu einem kompletten Aktivitätsverlust kommt<sup>59,80,207</sup>. Um das Auftreten von multiplen resistenten HIV-Varianten zu verhindern, bietet es sich an, an mehreren Stellen in den HIV-Replikationszyklus einzugreifen. Die bisher in der HIV-Therapie verwendeten Medikamente hemmen frühe Replikationsschritte wie den HIV-Eintritt, die Reverse Transkription oder die Integration des Provirus. Lediglich Inhibitoren der Protease interferieren mit Reifung knospender Viren während eines späten Stadiums im HIV-Replikationszyklus. Ein weiterer essentieller Schritt in der späten Replikationsphase ist die Verpackung viraler genomischer RNA während der Entstehung neuer Virionen. Dieser Prozess beruht auf einer spezifischen Interaktion der  $\Psi$ -Region mit dem NCp7-Protein und bietet sich daher für molekulare Interventionen an (Kapitel 1.3)<sup>23,44,54,146</sup>.

In den vergangenen Jahren hat die Phage Display Technologie für die Identifizierung von Peptidleitstrukturen in der Wirkstoffentwicklung immer mehr an Bedeutung gewonnen. Diese Peptidleitstrukturen können dann z.B. unter Zuhilfenahme kombinatorischer Chemie in die Weiterentwicklung zu niedermolekularen Wirkstoffen eingesetzt werden. Die mittels Phage Display selektierten inhibitorischen Peptidliganden für Enzyme, Rezeptoren oder auch RNA weisen vor jeglicher Optimierung meist eine niedrige mikromolare Affinität auf

(Kapitel 1.4) <sup>190,295</sup>. Dennoch existieren einige Beispiele für Peptide, welche sich zwar noch in der Grundlagenforschung befinden und deren Affinität zum Teil noch verbessert werden kann, die aber trotzdem vielversprechend für therapeutische Anwendungen sind. Darunter befinden sich Peptide, welche das humane Papillomavirus oder das Hepatitis B Virus hemmen <sup>36,37,95</sup>. Interessant für die Krebstherapie sind ferner Peptide, welche die Angiogenese oder das Wachstum von Tumorzellen hemmen <sup>33,148,220,284</sup>. Auch der Eintritt von HIV sowie die Aktivitäten der Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease konnten erfolgreich mit Peptiden inhibiert werden <sup>101,139,214,226,238</sup>. Ein bedeutendes Beispiel für die erfolgreiche Weiterentwicklung eines therapeutischen Peptids in die klinische Therapie ist das Peptid Enfuvirtide (T20), das den HIV-Eintritt hemmt (Kapitel 1.2.1) <sup>156,198</sup>. Aus Phagenbanken selektierte Peptidliganden für die HIV-1  $\Psi$ -RNA stellen ein weiteres Beispiel für inhibitorische Peptide dar, welche sich gegen HIV richten <sup>71,239,240</sup>. Diese Vorarbeiten konnten zeigen, dass die Bindung der tryptophanreichen Peptide an die  $\Psi$ -RNA von dem natürlichen Liganden NCp7 kompetitiert werden kann und war zugleich Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Nach Optimierung der Affinität der zuvor selektierten Peptide wurde das HKWPWW-Peptid für weitere Analysen wie z.B. die Charakterisierung der Bindungseigenschaften ausgewählt. Ziel der vorliegenden Arbeit war, das optimierte HKWPWW-Peptid hinsichtlich dessen antiviraler Wirksamkeit gegen HIV-1 funktionell zu charakterisieren. Hierfür erfolgte die Entwicklung verschiedener Testsysteme, welche die intrazelluläre Expression bzw. zelluläre Aufnahme des Peptids ermöglichten.

#### 4.1 Bindungscharakteristika des optimierten HKWPWW-Peptids

Die Affinität des in vorangegangenen Arbeiten mit der  $\Psi$ -RNA selektierten HWWPWW-Peptids lag bei 34  $\mu\text{M}$  für die SL3-RNA <sup>239,240</sup>. Im Rahmen eines gemeinsamen Projekts von Herrn Prof. Harald Schwalbe am Institut für Organische Chemie sowie von Herrn PD Joachim Koch am Institut für Biochemie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt erfolgte die Optimierung des Peptids (Kapitel 3.1). Mittels Spot-Synthese-Membranen wurde das HKWPWW-Peptid identifiziert, dessen Affinität für die SL3-RNA bei 1,1  $\mu\text{M}$  liegt und somit etwa 30-fach höher ist als die zuvor selektierter Peptidliganden. Des weiteren konnte mittels NMR nachgewiesen werden, dass das HKWPWW-Peptid an die Schleifenregion der SL3-RNA bindet (Kapitel 3.2). An der Bindung sind, wie auch bei der Bindung des natürlichen Liganden NCp7, Stapelkräfte beteiligt <sup>6,28,61,72</sup>. Diese Bindung des Peptids an den Loop von SL3 ist in Hinblick auf etwaige therapeutische Anwendungen besonders interes-

sant. Mittels NMR-Studien konnte Ende der 1990er Jahre nachgewiesen werden, dass NCp7 über Phe<sup>16</sup> und Trp<sup>37</sup> mit Purinbasen im GGAG-Loop der SL3-RNA interagiert (Kapitel 1.3.3) <sup>61,318</sup>. Darüber hinaus wurde die hydrophobe Plattform von NCp7, welche von den Aminosäuren Val<sup>13</sup>, Phe<sup>16</sup>, Thr<sup>24</sup>, Ala<sup>25</sup>, Trp<sup>37</sup> und Met<sup>46</sup> gebildet wird, als kritisch für die starke Bindung von NCp7 an dessen Nukleinsäuresubstrate beschrieben <sup>61,209,210,241,288,318</sup>. Neben der RNA-Verpackung spielt NCp7 als Nukleinsäurechaperon bei der Reversen Transkription viraler RNA und der Integration proviraler DNA eine wichtige Rolle. Während der Reversen Transkription begünstigt NCp7 die Anlagerung des tRNA<sup>Lys</sup>-Primers an den PBS-Stemloop sowie die Destabilisierung der TAR/cTAR-Stemloops, wodurch der DNA-Strangtransfer ermöglicht wird (Kapitel 1.3.2) <sup>11,24,52,243,301</sup>. Anhand neuerer Publikationen wurde gezeigt, dass die hydrophobe Plattform von NCp7 nicht nur für die Nukleinsäurebindung, sondern darüber hinaus auch für die Destabilisierung der cTAR Stemloop-Struktur während der Reversen Transkription notwendig ist <sup>18,241</sup>.

Vorangegangene Studien offenbarten, dass HKWPWW nicht nur an SL3, sondern auch an die TAR- bzw. PBS-Strukturen bindet. Die Affinität von HKWPWW für die TAR-Struktur liegt bei 1,8  $\mu$ M und bei 3  $\mu$ M für die PBS-Struktur und ist somit vergleichbar für alle drei Nukleinsäuresubstrate. Dies führte zu der Annahme, dass HKWPWW die hydrophobe Plattform von NCp7 nachahmen könnte <sup>72,241</sup>. Somit könnte das Peptid mit dem natürlichen Liganden, dem Gag<sup>p55</sup>-Polyprotein, um die Bindung an SL3 konkurrieren. In dieser Hinsicht wären NMR-Studien zur Bindung des Peptids an die SL3-RNA in Anwesenheit des NCp7-Proteins besonders aufschlussreich.

Darüber hinaus wurde SL3 als das zentrale Element für die Verpackung von HIV-1 RNA beschrieben <sup>123</sup>. Jedoch erfüllen alle vier Stemloop-Strukturen innerhalb der  $\Psi$ -Region in diesem Prozess redundante Funktionen, da die Deletion einzelner Stemloop-Strukturen nicht zum vollständigen Abbruch der RNA-Verpackung führt (Kapitel 1.3.1 und 1.3.3) <sup>5,7,169</sup>. Das NCp7-Protein bindet die Loop-Region von SL2 mit einer vergleichbaren Affinität wie SL3. Über SL1 erfolgt die Dimerisierung zweier RNA-Genome und SL4 stabilisiert vermutlich die tertiäre Struktur der  $\Psi$ -Region. Dies führt dann zur Bindung weiterer NCp7-Moleküle und schließlich zur Verpackung der RNA in Viruspartikel (Kapitel 1.3.3) <sup>5,7,54,326</sup>. Aus diesen Gründen ist ein Peptid, das hochspezifisch nur an eine Stemloop-Struktur bindet gar nicht erstrebenswert. Durch eine Bindung an mehreren Stellen wird es auch HIV erschwert resistente Varianten zu entwickeln. Die Deletion von SL1 oder SL3 im viralen Genom führt beispielsweise nach längerer Zeit in der Kultur zur Entstehung von Viren, welche Mutationen im *gag*-Gen tragen und wieder eine ähnliche Infektiosität wie Wildtyp-Viren aufweisen <sup>184,251</sup>. In diesem Kontext wäre es interessant, die Bindung des HKWPWW-Peptids an die anderen Stemloop-Strukturen der HIV-1  $\Psi$ -Region zu analy-

sieren. Leider war dies nicht mit den Spot-Synthese-Membranen möglich, da mit dem Testsystem kurze RNAs (20-30 nt) nicht detektiert werden konnten.

In Kooperation mit Prof. Yves Mély aus Straßburg wurde ebenfalls die Stöchiometrie der Bindung des HKWPWW-Peptids an die SL3-RNA analysiert. Dabei weist die SL3-RNA für das HKWPWW-Peptid  $3 \pm 1$  Bindungsstellen auf, wobei jeweils sechs Nukleotide der RNA von einem Peptidmolekül bedeckt werden<sup>72</sup>. Im Vergleich dazu findet die Bindung des NCp7-Proteins an die SL3-RNA mit einer 1:1 Stöchiometrie statt<sup>61,318</sup>. Weiterhin wurde beschrieben, dass NCp7 präferentiell einzelsträngige Nukleinsäuren bindet und dabei sieben bis zwölf Nukleotide bedeckt<sup>210</sup>. Ferner könnte die Auflösung der dreidimensionalen Struktur der HKWPWW-SL3-RNA-Bindung mittels NMR aufschlussreich sein. Dies würde genaue Aussagen über die an der Peptid-RNA-Interaktion teilhabenden Nukleotide und Aminosäuren erlauben und könnte als Ausgangspunkt für eine strukturbasierte Wirkstoffentwicklung dienen<sup>39</sup>.

Aufgrund dieser Ergebnisse zur Stöchiometrie und Affinität der HKWPWW-SL3-Bindung war es notwendig, das HKWPWW-Peptid für die Testung der antiviralen Wirksamkeit im Vergleich zu dem Gag-Protein im Überschuss einzusetzen.

## 4.2 Expression des HKWPWW-Peptids in Fusion mit RFP über transiente Transfektion

Um die in HIV-infizierten Zellen stattfindende Verpackung viraler genomischer  $\Psi$ -RNA zu hemmen, war eine intrazelluläre Lokalisation des HKWPWW-Peptids eine Voraussetzung. Hierfür wurden zwei Ansätze gewählt. Zum einen erfolgte die Klonierung der für das HKWPWW-Peptid kodierenden Sequenzen in Fusion mit RFP in einen eukaryotischen Expressionvektor und die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins über transiente Transfektion (Kapitel 3.3). Die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins über einen retroviralen Transfektor, welcher stabil in das Genom integriert, ermöglichte die Herstellung stabiler Peptid-exprimierender T-Zelllinien (Kapitel 3.4). Zum anderen wurde das HKWPWW-Peptid in Verbindung mit einer Proteintransduktionsdomäne chemisch synthetisiert. Da Proteintransduktionsdomänen die Zellmembran wirkungsvoll überqueren, gewährleistete dieser Ansatz die direkte Aufnahme des Peptids in eukaryotische Zellen (Kapitel 3.5)<sup>72,213,315</sup>.

#### 4.2.1 Transfektionseffizienz und Expression der Peptid-RFP-Proteine

Der erste Schritt der funktionellen Charakterisierung des HKWPWW-Peptids war die Expression des Peptids in Fusion mit dem RFP-Protein über transiente Transfektion in Virenproduzierenden Zellen. Anschließend wurde der Einfluss der Peptidexpression auf die Produktion lentiviraler Pseudoviren untersucht.

Aufgrund der Resultate zur Stöchiometrie und Affinität der Bindung des HKWPWW-Peptids an SL3-RNA, war es notwendig, einen Vektor zu verwenden, welcher eine starke Expression des Peptids ermöglichte. Hierfür wurde der pF25-X-RFP-Vektor ausgewählt (Kapitel 3.3.1). Da die Stabilität des freien Peptids unbekannt war, wurde dieses zunächst in Fusion mit dem RFP kloniert, um eine stabile und nachweisbare Expression zu gewährleisten. Ferner wurde entschieden, das HKWPWW-Peptid zunächst in einem System auf antivirale Wirksamkeit zu untersuchen, in dem die Replikation der Viren auf eine Runde beschränkt ist. Das Testsystem beruht auf der transienten Transfektion von 293T-Zellen mit den drei Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren (pHRSEWcPPT, pCMV $\Delta$ R8.91 und pMD2.VSV.G) sowie den pF25-X-RFP-Plasmiden (Abb. 2.14, Kapitel 2.3.3.1, 2.3.4 und 3.3). Es folgte die Produktion von Pseudoviren, welche in Anwesenheit der Peptid-RFP-Proteine sowie der HIV-1 Gag/Pol-Proteine und der VSV.G-Hüllproteine die RNA-Genome des GFP-Transfervektors (enthält das HIV-1  $\Psi$ -Signal) verpacken. Anschließend wurde der infektiöse Titer sowie die Pseudoviruskonzentration in den Zellkulturüberständen analysiert und die Pseudoviren auf deren  $\Psi$ -RNA-Gehalt untersucht (Kapitel 3.3.8, 3.3.9 und 3.3.10).

Zunächst erfolgte die Überprüfung der Transfektionseffizienzen am Fluoreszenzmikroskop und anschließend die Quantifizierung über FACS-Analyse (Abb 3.3, Kapitel 3.3.3 und 3.3.4). Die Transfektionseffizienz des GFP-Transfervektors beträgt bei der Transfektion von 0,25  $\mu$ g der RFP-Konstrukte etwa 50% und nimmt mit der Transfektion zunehmender Mengen der RFP-Konstrukte weiter bis auf 35% ab (Abb. 3.4). Dies zeigt, dass die zunehmende Expression der RFP-Konstrukte dazu führt, dass der Transfektor geringer exprimiert wird. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die RFP-Konstrukte über einen starken CMV-Promotor exprimiert werden und dadurch Transkriptionsfaktoren von dem HIV LTR-Promotor des GFP-Transfervektors abgezogen werden. Eine Publikation beschäftigt sich ebenfalls mit dem Phänomen, dass die Kotransfektion eines CMV-Promotors zu einer geringeren Expression der proviralen HIV-DNA führt. Die Autoren erklären dies damit, dass die CMV- und HIV-Promotorregionen um Transkriptionsfaktoren kompetieren <sup>162</sup>.

Diese Konkurrenz um regulatorische Faktoren wurde nach transienter Transfektion auch zwischen dem CMV-Promotor und einem weiteren Promotor beobachtet<sup>2</sup>.

Es wäre auch möglich, dass die HKWPWW-RFP-Expression die Expression des GFP-Transfervektors hemmt. Dies würde sich dann ebenfalls in einem reduzierten Titer äußern. Die Analyse der doppelt-positiven transfizierten Zellen (GFP+RFP-positive Zellen) mittels der FACS-Methode zeigt, dass unabhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt und der transfizierten DNA-Menge der Anteil doppelt-positiver Zellen zwischen 30% und 40% liegt (Abb. 3.6, Kapitel 3.3.4). Somit ist der Anteil 293T-Zellen, welche verpackbare RNA produzieren und gleichzeitig mit einem RFP-Konstrukt transfiziert sind, für alle drei RFP-Konstrukte vergleichbar. Auch der Anteil RFP-positiver Zellen steigt mit der Transfektion zunehmender DNA-Mengen von 70% auf rund 90% RFP-positive Zellen und ist für alle drei RFP-Konstrukte untereinander vergleichbar (Abb. 3.5).

Jedoch sind die Expressionsraten der Peptid-RFP-Proteine unterschiedlich. Die FACS-Analyse transfizierter 293T-Zellen offenbart, dass das HKWPWW-RFP-Protein schwächer als die beiden Kontrollen exprimiert wird (Tab. 3.1, Kapitel 3.3.5). Der analysierte MFI-Wert ist ein Maß für die mittlere Expressionsstärke des jeweiligen RFP-Fusionsproteins. Die Quantifizierung ergab, dass in Pseudoviren-produzierenden Zellen das GSGSGS-RFP-Protein dreimal und das RFP-Protein sechsmal stärker als das HKWPWW-RFP-Protein exprimiert wird. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten RFP handelt es sich um dsRed1, für das eine verlangsamte Maturation sowie eine Tendenz zur Tetramerisierung beschrieben wurde<sup>10</sup>. Denkbar ist auch, dass die hydrophoben Aminosäuren in HKWPWW die Reifung des RFP-Proteins beeinträchtigen oder verlangsamen und die Fluoreszenz aus diesen Gründen schwächer ist. Der mit einem  $\alpha$ -RFP Antikörper durchgeführte Western Blot war leider nicht aussagekräftig. Somit ist ein Ziel weiterführender Studien zu analysieren, ob die Expressionsunterschiede in der Tat auf Ebene der Translation begründet sind. Die Viabilität von 293T-Zellen, welche mit den RFP-Konstrukten transfiziert waren, lag unabhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt zwischen 88% und 90% und war vergleichbar mit der unbehandelten Zellen (Tab. 3.2, Kapitel 3.3.7). Die im Vergleich zu den Kontrollen reduzierte Expression des HKWPWW-RFP-Proteins ist demnach nicht auf toxische Effekte zurückzuführen.

Die Erkennung der  $\Psi$ -RNA durch das Gag<sup>p55</sup>-Polyprotein findet vermutlich bereits im Zytoplasma infizierter Zellen statt. Auch von einer Kolo-kalisation viraler RNA mit dem Gag-Polyprotein in perinukleären Regionen wurde berichtet. Nach dem Transport oligomerisierter Gag-Proteine und der gebundenen RNA an die Plasmamembran, erfolgt dort die Multimerisierung der Gag-Proteine und anschließend die Assemblierung neuer Virionen (Kapitel 1.3)<sup>44,159,232,236,294</sup>. Für eine effiziente Inhibition der Gag- $\Psi$ -RNA-Interaktion war somit

eine zytoplasmatische Lokalisation des HKWPWW-Peptids bzw. eine Expression an der Plasmamembran eine Voraussetzung.

Die Aufnahmen am CLSM zeigen, dass das HKWPWW-RFP-Protein im Zytoplasma von 293T-Zellen exprimiert wird (Abb. 3.7, Kapitel 3.3.6). Eine Anhäufung des Peptids an der Zellmembran, erkennbar an einer gelben Färbung im Mischbild, ist nur an wenigen Stellen detektierbar (Abb. 3.8). Die gleichzeitige Anfärbung des Zellkerns, weist lediglich auf eine marginale nukleäre Lokalisation des Proteins hin (Abb. 3.9). Das HKWPWW-RFP-Protein ist zum Teil in granulären Strukturen nachweisbar (Abb. 3.8 und 3.9). Ob es sich dabei um lysosomale Einschlüsse oder um freie Akkumulationen des Peptids im Zytoplasma handelt, konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden. Eine Anfärbung der Lysosomen mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff zeigte nur teilweise eine Kolo­kalisierung mit dem HKWPWW-RFP-Protein. Die granulären Strukturen könnten auch daraus resultieren, dass HKWPWW möglicherweise die beschriebene Tetramerbildung des RFP-Proteins fördert<sup>10</sup>. Auch die beiden Kontrollkonstrukte, pF25-GSGSGS-RFP und pF25-RFP, werden in 293T-Zellen exprimiert. Dabei zeigen CLSM-Bilder, dass beide Kontrollproteine sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär exprimiert werden (Abb. 3.7). Des weiteren zeichnen sich 293T-Zellen, welche die Kontrollproteine exprimieren, durch eine intensivere Rotfärbung aus. Im CLSM erscheint diese rote Fluoreszenz stärker als die des HKWPWW-RFP-Proteins. Dies stimmt mit den Ergebnissen zur Analyse der mittleren Expressionsstärke der Peptid-RFP-Proteine in transfizierten 293T-Zellen am FACS überein (Tab. 3.1, Kapitel 3.3.5).

#### **4.2.2 Einfluss des HKWPWW-RFP-Proteins auf die Produktion lentiviraler Pseudoviren**

Das erste Ziel in der antiviralen Wirksamkeitstestung war, zu untersuchen, ob die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins einen Einfluss auf die Entstehung lentiviraler Pseudoviren hat. Hierfür wurden 293T-Zellen mit den drei Plasmiden zur Produktion lentiviraler Pseudoviren sowie den entsprechenden pF25-X-RFP-Konstrukten transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Abnahme der Überstände. Der Titer der produzierten Pseudoviren, welche das verpackbare  $\Psi$ -GFP-Konstrukt enthalten, wurde über Transduktion von 293T-Zellen bestimmt. Dabei ist der Titer ein Maß für die in einer Volumeneinheit enthaltenen infektiösen Viren. In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins zu einer dosisabhängigen Reduktion des lenti-



viralen Titers führt. In der höchsten Konzentration (2,5 µg transfizierte DNA) führt die Expression des HKWPWW-RFP-Protein zu einer Titerreduzierung von 95% (Abb. 3.10 A und B, Kapitel 3.3.8). In Anwesenheit des HKWPWW-Peptids ist demnach die Anzahl der produzierten infektiösen Viren im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Über FACS-Analyse wurde bereits gezeigt, dass die Expression der pF25-X-RFP-Konstrukte von der transfizierten DNA-Menge abhängig ist (Abb. 3.5, Kapitel 3.3.4). Infolgedessen hängt die Inhibition der Generierung lentiviraler Pseudoviren direkt von der Expressionsstärke des HKWPWW-RFP-Proteins ab. Die Viabilität von 293T-Zellen wird nicht durch die Transfektion der RFP-Konstrukte beeinflusst (Tab. 3.2, Kapitel 3.3.7). Der beobachtete reduzierte Virustiter in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins ist somit nicht auf toxische Effekte zurückzuführen.

Bei einer erfolgreichen Inhibition der Produktion von Lentiviren, ist die Menge der freigesetzten infektiösen Viren reduziert. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Hemmung der Verpackung in einer gesteigerten Produktion nicht-infektiöser Partikel resultieren kann. Substanzen, welche die NCp7 Zinkfinger inaktivieren, führen dazu, dass von den Zellen vermehrt nicht-infektiöse Virionen freigesetzt werden<sup>245,311</sup>. Damit geht einher, dass bei einer Inhibition der Verpackung die Menge verpackter viraler RNA bezogen auf die Viruspartikel reduziert ist. Dies wurde von Arbeitsgruppen gezeigt, welche die  $\Psi$ -Region oder darin enthaltene Elemente deletierten, mutierten oder gegen die  $\Psi$ -Region gerichtete antisense-RNA verwendeten<sup>21,40,49,122</sup>. Auch Mutationen im NCp7-Protein oder dessen Inhibition mit einem RNA-Aptamer führten zu dem gleichen Effekt<sup>4,74,103,104,157,225</sup>.

Diese Beobachtungen basieren auf der Tatsache, dass sich von Zellen, welche nur das HIV-1 Gag-Protein exprimieren, sogenannte „virion-like particles“ (VLPs) abschnüren können, welche nicht-infektiös sind<sup>1,96</sup>. In der Abwesenheit von viraler genomischer  $\Psi$ -RNA werden in VLPs zelluläre RNAs wie z.B. tRNAs, rRNAs oder mRNAs eingebaut. Auch von der Inkorporation gespleißter, viraler RNA wurde berichtet<sup>135,218,255,320</sup>. Begründet werden kann dies mit dem, dass die NCp7-Domäne über die basischen Domänen auch unspezifisch mit Nukleinsäuren interagiert und in Abwesenheit der HIV  $\Psi$ -Region andere Nukleinsäuren bindet und deren Verpackung initiiert (Kapitel 1.3.3)<sup>45,269</sup>.

Wenn die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins in einer gesteigerten Entstehung nicht-infektiöser Viren resultiert, so sollte das Verhältnis infektiöser Viren zur Gesamtmenge entstandener Viren im Vergleich zu den Kontrollen verändert sein. Ein Maß für die Gesamtzahl aller HI-Viren, unabhängig ob infektiös oder nicht, ist die Konzentration des HIV Kapsidproteins (p24) in viralen Überständen. Auch VLPs enthalten das Kapsidprotein und lassen sich somit mittels des p24-ELISAs nachweisen. Um festzustellen, ob die Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins zur gesteigerten Freisetzung nicht-infektiöser Viren führt,

wurde die p24-Antigenkonzentration in den pseudovirushaltigen Überständen mittels ELISA ermittelt (Kapitel 3.3.9). Hierbei wurde festgestellt, dass in den in Gegenwart des HKWPWW-RFP-Proteins produzierten lentiviralen Überständen im Vergleich zu den Kontrollen neben dem Titer auch die p24-Konzentration und somit die gesamte Virusproduktion reduziert ist. Ferner lässt sich über alle DNA-Konzentrationen hinweg eine Korrelation der p24-Konzentration mit dem infektiösen Titer feststellen (Abb. 3.11). Zur Auswertung wurde die p24-Konzentration in die korrespondierende Konzentration viraler Partikel umgerechnet (Gleichung 3.2). Anschließend erfolgte der Bezug der infektiösen Viren auf die Gesamtzahl aller entstandenen Viren in einer Volumeneinheit für das jeweilige RFP-Konstrukt (Gleichung 3.3). Die Auswertung zeigt, dass mit der Transfektion steigender DNA-Mengen des HKWPWW-RFP-Konstrukts die relative Infektiosität der Viruspartikel nahezu gleich bleibt und sich im Bereich von  $2 - 4 \cdot 10^{-3}$  tdu/Viruspartikel bewegt (Tab. 3.3, Abb. 3.12). Die relative Infektiosität der in Anwesenheit der beide Kontrollen GSGSGS-RFP und RFP produzierten Viren befindet sich im Bereich von  $2 - 6 \cdot 10^{-3}$  tdu/Viruspartikel, wobei auch hier leichte Schwankungen über den getesteten Konzentrationsbereich hinweg zu beobachten sind. Die mittlere, relative Infektiosität der Viren liegt für alle drei RFP-Konstrukte im Bereich von  $2,8 - 3,9 \cdot 10^{-3}$  tdu/Viruspartikel (Abb. 3.12). Dabei sind keine deutlichen Unterschiede abhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt zu beobachten. Somit kommen unabhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt im Mittel auf  $10^3$  Viren etwa 2,8 bis 3,9 infektiöse Viren. Im Vergleich dazu wurde beschrieben, dass bei Wildtyp HI-Viren nur ein Virus von  $10^4$  bis  $10^7$  Viren infektiös ist. Dies wurde mit zum Teil nicht funktionellen HIV-Hüllproteinen erklärt<sup>175,208</sup>. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die VSV.G-Pseudotypisierung die Infektiosität der Viren um das 30- bis 30.000-fache steigert. Eine Erhöhung der Stabilität von Vektorpartikeln nach Pseudotypisierung mit VSV.G wurde bereits beschrieben und könnte die beobachtete erhöhte Infektiosität erklären<sup>89,152</sup>. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins die HIV-Pseudovirusproduktion deutlich hemmt, aber nicht zu einer gesteigerten Produktion nicht-infektiöser Viren führt. Die relative Infektiosität der wenigen Pseudoviren ist vergleichbar mit der in Anwesenheit der Kontrollproteine produzierten Pseudoviren.

### 4.2.3 Untersuchung des RNA-Gehalts lentiviraler Pseudoviren

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob sich die vergleichbare Infektiosität der in Anwesenheit der RFP-Konstrukte generierten Pseudoviren ebenfalls in der verpackten  $\Psi$ -RNA-Menge wider spiegelt. Dass eine Hemmung der HIV-Verpackung darin resultieren kann, dass die Menge infektiöser viraler  $\Psi$ -RNA in den Viruspartikeln reduziert ist, wurde bereits mehrfach publiziert<sup>4,21,22,40,49,74,103,122,157</sup>. Daher war das Ziel, zu untersuchen, ob die in Gegenwart des HKWPWW-RFP-Proteins generierten Pseudoviren weniger  $\Psi$ -RNA enthalten. Um direkt die Menge der in Pseudoviren verpackten  $\Psi$ -RNA zu bestimmen, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Ob die in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins hergestellten Pseudoviren auch zelluläre oder gespleißte virale RNA enthielten, wurde nicht analysiert. Um die lentiviralen Pseudoviren auf ihren Gehalt an viraler RNA zu untersuchen, erfolgte die Präparation der viralen RNA normiert auf 2 ng p24-Protein. Sowohl die Auftrennung der PCR-Produkte mittels eines Agarosegels als auch die densitometrische Auswertung der Bandenstärken zeigen, dass die in Gegenwart des HKWPWW-RFP-Proteins produzierten Pseudoviren signifikant weniger RNA als die in Anwesenheit des GSGSGS-RFP-Proteins hergestellten Pseudoviren enthalten (Abb. 3.13, Tab. 3.4, Kapitel 3.3.10). Jedoch sind die Unterschiede im Vergleich zu Pseudoviren, welche im Zugegen-sein des RFP-Proteins bzw. ohne RFP-Konstrukt generiert wurden, nicht mehr signifikant. Die relativ hohe Standardabweichung in allen Proben zeigt die Begrenzung der Methode auf. Bei der semiquantitativen PCR handelt es sich vielmehr um eine qualitative Methode, welche sich zur groben Abschätzung von Unterschieden eignet<sup>88,145,278</sup>. Aufgrund dieser Limitationen der fehlerbehafteten semiquantitativen PCR, ist der RNA-Gehalt aller Pseudoviren unabhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt als vergleichbar anzusehen. Somit werden in Anwesenheit des HKWPWW-Peptids zwar weniger Pseudoviren hergesellt, jedoch scheint sich deren RNA-Gehalt nicht wesentlich von dem der in Gegenwart der Kontrollen hergestellten Pseudoviren zu unterscheiden.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit dem Befund, dass sich die Verhältnisse von infektiösen Titer zu p24-Antigen in den Virusüberständen nicht ändern. Unabhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt ist die relative Infektiosität der produzierten Pseudoviren vergleichbar (Kapitel 4.2.2).

#### 4.2.4 Expression der HIV-1 Gag-Proteine in Pseudoviren-produzierenden Zellen

Der Zusammenbau neuer HI-Viren in infizierten Zellen ist eng mit dem Prozess der RNA-Verpackung verknüpft. Beide Vorgänge sind von den Funktionen des Gag-Polyproteins abhängig. Neben der NCp7-Domäne, welche für die Verpackung viraler RNA essentiell ist, enthält Gag weitere Domänen zur Membranbindung, zur Interaktion mit anderen Gag-Molekülen sowie zur Rekrutierung der HIV-Hüllproteine. Neben diesen Determinanten spielt die virale genomische RNA eine wichtige Rolle bei dem Zusammenbau infektiöser Viren, indem diese eine Gerüstfunktion ausübt und die Assemblierung weiterer Gag-Moleküle erleichtert (Kapitel 1.3) <sup>44,93,159,236</sup>. Eine Hemmung der  $\Psi$ -RNA-Gag-Interaktion durch das HKWPWW-Peptid könnte somit auch darin resultieren, dass möglicherweise der HIV-Zusammenbau gestört oder verändert ist.

Darüber hinaus kann ein Grund für die beobachtete Reduktion der lentiviralen Pseudovirusproduktion in Anwesenheit des HKWPWW-Peptids eine reduzierte Expression des Gag<sup>p55</sup>-Polyproteins sein (Kapitel 4.2.2). Die Quantifizierung der Gag-Expression erfolgte mittels Western Blot Analyse von 293T-Zellen, welche lentivirale Pseudoviren produzierten und gleichzeitig mit den pF25-X-RFP-Konstrukten transfiziert waren. Der Western Blot zeigt, dass unabhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt nahezu die gleiche Menge des Gag<sup>p55</sup>-Vorläuferproteins exprimiert wird (Abb. 3.14, Kapitel 3.3.11). Somit kann eine reduzierte Expression des Gag<sup>p55</sup>-Polyproteins nicht als Erklärung für die beobachtete Hemmung der Virusproduktion herangezogen werden. In der Summe ist die Expression aller Gag-Intermediate in den zusätzlich mit RFP-Konstrukten transfizierten Zellen um 40% reduziert im Vergleich zu Zellen, welche nur Pseudoviren produzieren (Abb. 3.15 A). Ein ähnliches Bild war bereits bei der Bestimmung der Transfektionseffizienz des GFP-Transfervektors zu beobachten (Abb. 3.4, Kapitel 3.3.4). Die zusätzliche Expression der RFP-Konstrukte führt vermutlich dazu, dass weniger Transkriptionsfaktoren für die Expression viraler Proteine zur Verfügung stehen (Kapitel 4.2.1) <sup>162</sup>.

Auffällig ist jedoch, dass die p24-Menge in den HKWPWW-RFP-exprimierenden Zellen reduziert ist im Vergleich zu den Kontrollen bzw. zu Zellen, welche nur Pseudoviren produzieren. Die densitometrische Analyse der Bandenstärken offenbart, dass in Zellen, die das HKWPWW-RFP-Konstrukt exprimieren zwar die p24-Menge reduziert, dafür aber die Menge der Gag-Prozessierungsintermediate p39/41 und p47/49 etwas erhöht ist (Abb. 3.15 A und B). Dies lässt vermuten, dass die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins eine ge-

hemmte bzw. verlangsamte Prozessierung des Gag-Polypeptids durch die virale Protease zur Folge hat.

Auch Mutationen in den RNA-Bindedomänen des NCp7-Proteins oder die Anwendung von Zinkfinger-Inhibitoren interferieren mit der Prozessierung des Gag-Polypeptids. Dies äußert sich in einer Akkumulation des Gag<sup>p55</sup>-Vorläufers sowie der Prozessierungsintermediate in den Zellen, wobei die p24-Menge reduziert ist<sup>25,45,113,225,245,311</sup>. Eine weitere interessante Studie beschäftigte sich mit dem Einfluss des NCp7-Proteins auf die Prozessierung der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine. Hierbei wurde demonstriert, dass in Abwesenheit des NCp7-Proteins die Gag-Prozessierung gehemmt ist. Für die Bildung des aktiven Zentrums der viralen Protease ist die Dimerisierung der Gag-Pol-Vorläuferproteine eine Voraussetzung. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das NCp7-Protein notwendig für die Dimerisierung der Gag-Pol-Vorläuferproteine ist und dadurch die Protease aktiviert wird. Darüber hinaus wurde auch postuliert, dass die Protease-Dimerisierung nach der Bindung des NCp7-Proteins an RNA erleichtert wird<sup>328</sup>.

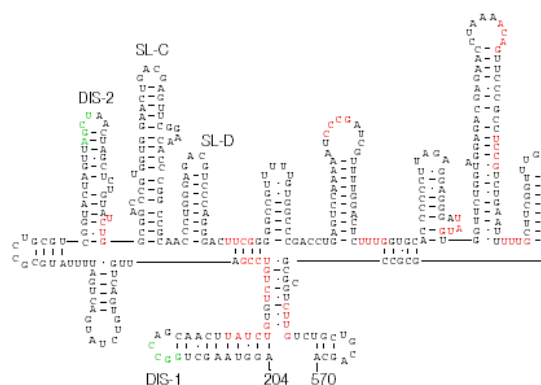
Die in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins beobachtete beeinträchtigte Gag-Prozessierung in Pseudoviren-produzierenden Zellen könnte somit darauf zurückzuführen sein, dass das Peptid die  $\Psi$ -RNA-Gag-Interaktion in den Zellen verhindert. Dies könnte dann die Aktivierung der viralen Protease verhindern und zur beobachteten Akkumulation der Gag-Intermediate in den HKWPWW-RFP-exprimierenden Zellen führen.

Im Rahmen einer neuen Studie wurde beschrieben, dass Mutationen in den Zinkfingern von NCp7 nicht nur zu einer Freisetzung nicht-infektöser Viren führen, sondern dass darüber hinaus die virale genomische RNA sowie die das Gag-Vorläuferproteins diffus in der Zelle verteilt sind. Die Autoren vermuten als Grund dafür, den Verlust der Assoziation des Gag-Proteins mit der viralen RNA<sup>113</sup>. Das HKWPWW-Peptid könnte möglicherweise auch in transfizierten Zellen die Lokalisation des Gag-Proteins oder die der viralen RNA verändern und auf dieser Ebene die Verpackung und den Zusammenbau neuer Virionen verhindern. Dies aufzuklären soll das Ziel zukünftiger mikroskopischer Studien sein.

#### **4.2.5 Einfluss des HKWPWW-RFP-Proteins auf die Herstellung gamma-retroviraler Pseudoviren**

Eine weitere Fragestellung war, ob das HKWPWW-Peptid spezifisch die Produktion lentiviraler Pseudoviren inhibiert. Um dies zu analysieren, wurden in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins gammaretrovirale Pseudoviren hergestellt und deren Titer be-

stimmt (Kapitel 3.3.12). Es stellte sich heraus, dass die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins im Vergleich zu den Kontrollen nicht zu einer spezifischen Reduktion des gamma-retroviralen Titers führt. Vielmehr ist bei hohen DNA-Konzentrationen eine unspezifische Titerreduktion retroviraler Vektoren um etwa 40% zu beobachten, welche unabhängig von dem transfizierten RFP-Konstrukt ist (Abb. 3.17 B). Die Produktion retroviraler Pseudoviren scheint im Vergleich zu lentiviralen Pseudoviren gegenüber der Expression zusätzlicher Proteine störanfälliger zu sein. Dies spiegelt sich auch in den relativ hohen Standardabweichungen wider. Für die Verpackung retroviraler Vektoren wurde ein Plasmid verwendet, welches das MLV Gag/Pol exprimiert. Der Transfervektor enthält das  $\Psi$ -Signal des MESV (mouse embryonic stem cell virus), das jedoch eine starke Homologie zu MoMLV (moloney murine leukemia virus) aufweist<sup>54,267</sup>. Da MLV und HIV beide zur Familie der Retroviren gehören, ist die RNA-Verpackung prinzipiell ähnlich. Jedoch existieren auch einige, wichtige, Unterschiede in der Verpackung viraler RNA. Das MLV Gag/Pol-Protein enthält z.B. nur einen Zinkfinger, welcher während der Verpackung über eine hydrophobe Rinne an Guanosine in UCUG-Elementen der viralen RNA bindet (Abb. 4.1). Im Gegensatz dazu bindet das HIV-1 NCp7-Protein an den Loop der Stemloop-Strukturen und die bei der Verpackung von MLV-RNA wichtigen UCUG-Elemente sind nicht innerhalb der  $\Psi$ -Region von HIV zu finden (Kapitel 1.3)<sup>53,54,67</sup>. Darüber hinaus sind bei MLV erst nach der Dimerisierung zweier RNA-Moleküle die Bindestellen für das NC-Protein zugänglich, während bei HIV-1 die primären NCp7-Bindestellen SL2 und SL3 sowohl in der monomeren als auch in der dimeren Form der HIV-RNA zugänglich sind. Damit in Einklang steht, dass für HIV-1 unter bestimmten Bedingungen eine Verpackung monomerer RNA beobachtet wurde, dabei aber insgesamt die Menge verpackter RNA reduziert war<sup>259-261</sup>. Dies lässt vermuten, dass bei HIV-1 die Dimerisierung der RNA auch für eine effiziente Verpackung notwendig ist, jedoch konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden, wie die Verpackung mit der Dimerisierung gekoppelt sein könnte<sup>54,228,258</sup>.



**Abbildung 4.1:** Sekundärstruktur der monomeren 5' UTR des MoMLV. Elemente, welche potentiell in der Lage sind, NC zu binden, sind in rot dargestellt (verändert nach<sup>54</sup>).

Dass an der Verpackung von MoMLV-RNA zum einen nur ein Zinkfinger beteiligt ist und zum anderen für diesen Vorgang die Dimerisierung der RNA-Genome eine direkte Voraussetzung ist, könnte erklären, dass das System im Vergleich zu HIV-1 instabiler ist. Möglicherweise könnte die Expression der RFP-Konstrukte unspezifisch mit der Dimerisierung und Verpackung der MLV-RNA interferieren und somit zu den beobachteten Schwankungen in der Produktion der Viruspartikel führen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins keinen spezifischen Einfluss auf die Herstellung gammaretroviraler Pseudoviren ausübt. Hingegen ist eine deutliche Hemmung der Produktion von HIV-1 Pseudoviren in Gegenwart des HKWPWW-RFP-Proteins zu beobachten (Abb. 3.17 A, Kapitel 3.3.12 und 4.2.2).

Um den Einfluss des HKWPWW-RFP-Proteins auf die Verpackung anderer lentiviraler Vektoren zu analysieren, wurden zwei weitere Drei-Plasmid-Systeme verwendet, welche auf der Generierung pseudotypisierter SIV- bzw. HIV-2-Vektoren beruhen. Doch leider war der Titer dieser Pseudoviren zu gering und daher keine Inhibition messbar.

### **4.3 HIV-Replikation in stabilen Peptid-exprimierenden T-Zelllinien**

Die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins über transiente Transfektion in 293T-Zellen, resultierte in einer Reduktion der Produktion lentiviraler Pseudoviren (Kapitel 4.2.2). Die Replikation dieser Viren ist aufgrund des selbstinaktivierenden Vektors nur auf eine Runde beschränkt. Ziel war es, im nächsten Schritt zu untersuchen, ob das HKWPWW-Peptid ebenso in der Lage ist, replikationskompetentes HIV-1 über mehrere Tage zu inhibieren. Hierfür wurden T-Zelllinien etabliert, welche stabil die Peptid-RFP-Proteine exprimieren (Kapitel 3.4). Da die Expressionsraten der RFP-Konstrukte in 293T-Zellen unterschiedlich waren, erfolgte gleichzeitig mit der Sortierung RFP-positiver Zellen die Anpassung der RFP-Expressionsraten. Die anschließende FACS-Analyse ergab, dass sowohl der Anteil RFP-positiver Zellen als auch die Expression des RFP-Proteins in den PM1-HKWPWW-RFP- sowie PM1-GSGSGS-RFP-Zelllinien nach der Sortierung vergleichbar war (Abb. 3.18 und Tab. 3.5, Kapitel 3.4.1). Es erfolgte anschließend die Infektion der Zelllinien mit HIV-1 und die Beobachtung der HIV-Replikation mittels Bestimmung der p24-Antigenkonzentration in den Zellkulturüberständen (Kapitel 3.4.2). Die Auswertung dieses Experiments zeigt, dass die HIV-Replikation in der PM1-HKWPWW-RFP-Zelllinie im Vergleich zu der PM1-GSGSGS-RFP-Zelllinie oder nativen Zellen bis zu fünf Tagen nach der Infektion bis zu 70% inhibiert wird (Abb. 3.19). Des Weiteren wurden in Kooperation mit Dr. Norbert Bannert am

Robert-Koch-Institut in Berlin, elektronenmikroskopische Studien mit den infizierten PM1-Zelllinien durchgeführt. Auch diese Untersuchungen bestätigten, dass die PM1-HKWPWW-RFP-Zelllinie weniger Viren als die Kontrollzelllinie freisetzt (Abb. 4.2, Kapitel 4.5) <sup>72</sup>.

Die beobachtete HIV-Replikationshemmung in der stabilen PM1-HKWPWW-RFP-Zelllinie könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass die Infektionsrate dieser Zellen geringer ist. Um dies zu überprüfen wurden die für den HIV-Eintritt verantwortlichen CD4- und CXCR4-Rezeptoren auf allen drei Zelllinien (PM1 nativ, PM1-HKWPWW-RFP und PM1-GSGSGS-RFP) mit Antikörpern angefärbt und im FACS analysiert (Kapitel 3.4.3). Unabhängig von der Zelllinie exprimieren nahezu alle Zellen den CXCR4-Rezeptor sowie den CD4-Rezeptor, wobei die Expression des CXCR4-Rezeptors schwächer als die des CD4-Rezeptors ist (Abb. 3.20). Die Hemmung der HIV-Replikation auf der PM1-HKWPWW-RFP-Zelllinie ist somit vermutlich nicht auf eine verminderte Infektion zurückzuführen.

Auch von dem HIV-Eintrittsinhibitor Enfuvirtide (T20) wurden Zelllinien hergestellt, welche das Peptid membranverankert exprimierten. Die HIV-1-Replikation ist auf diesen Zelllinien 500-fach gehemmt und bricht erst zwischen Tag 14 und 20 nach der Infektion durch <sup>131</sup>. Die stabile intrazelluläre Expression von antisense-RNA gegen die HIV-1  $\Psi$ -RNA hemmt die HIV-Replikation fast vollständig bis zu 17 Tage nach der Infektion <sup>40</sup>. Im Rahmen eines RNA-Decoy Ansatzes wurde die HIV-1  $\Psi$ -RNA überexprimiert, welche zu einer Inhibition der HIV-Replikation über einen Zeitraum von vier Wochen führt <sup>76</sup>. Die Affinität der oben genannten Inhibitoren war nicht in den Publikationen angegeben, vermutlich weil die Menge des exprimierten Inhibitors nicht zu quantifizieren war.

Das HKWPWW-RFP-Protein ist bei einer stabilen Expression offensichtlich dazu in der Lage, die HIV-1-Replikation über den beobachteten Zeitraum von fünf Tagen zu hemmen (Abb. 3.19, Kapitel 3.4.2). Erfolgte die Inkubation der infizierten Zelllinien über einen längeren Zeitraum, so war zwischen dem sechsten und dem achten Tag nach der Infektion kein Unterschied mehr in der HIV-Replikation zu beobachten. Ein Grund hierfür könnte die niedrige, mikromolare Affinität des HKWPWW-Peptids sein. Darüber hinaus kann diese Beobachtung damit erklärt werden, dass neben der  $\Psi$ -Region noch andere RNA-Elemente im HIV-1 Genom an der Verpackung viraler RNA partizipieren. Auch wenn die Verpackung von RNAs möglich ist, welche nur SL3 enthalten, so gelang es mittels Deletionsanalysen nachzuweisen, dass auch Nukleotide in der *gag*-kodierenden Region, in der U5-, PBS- und TAR-Region notwendig für die Verpackung viraler RNA sind <sup>47,48,54,120,123,124,191,230,257</sup>. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass die Deletion der  $\Psi$ -Region nicht zum vollständigen Abbruch der RNA-Verpackung führt <sup>169</sup>. Wenn das HKWPWW-RFP-Protein die HIV-Replikation aufgrund einer Inhibition der  $\Psi$ -RNA-Gag-Interaktion hemmt, so könnte die RNA-Verpackung nach längerer Zeit in Kultur von anderen HIV-1 RNA-Elementen über-



nommen werden und dadurch die HIV-Replikation wie beobachtet nach fünf Tagen wieder ansteigt.

Prinzipiell ist das HKWPWW-RFP-Protein somit in der Lage, HIV-1 zumindest über einige Replikationsrunden zu hemmen, was eine Voraussetzung für eine etwaige therapeutische Anwendung ist.

#### **4.4 Transduktion des HKWPWW-Peptids über eine Proteintransduktionsdomäne**

Die bisher gezeigten Ansätze beruhen auf der Expression der Geninformation des HKWPWW-RFP-Proteins in Viren-produzierenden Zellen (Kapitel 4.2 und 4.3). Um nachzuweisen, dass der beobachtete antivirale Effekt alleine auf das HKWPWW-Peptid zurückzuführen ist, wurde ein Transportersystem für Peptide getestet, das die direkte Aufnahme der Peptide in eukaryotische Zellen ermöglicht. Hierfür eignen sich z.B. verschiedene Proteintransduktionsdomänen, welche die Zellmembran effizient überqueren (Kapitel 1.2.3)<sup>126,195,265</sup>. Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden mit einer Proteintransduktionsdomäne chemisch synthetisiert, welche Homologien zu dem HIV-1 Tat-Protein sowie zu dem NLS (nuclear localization signal) des großen Antigens des SV-40 (Simian Virus 40) aufweist (Kapitel 3.5)<sup>72,213,315</sup>.

Zunächst wurde ein funktioneller Assay zur Testung der antiviralen Wirksamkeit des freien HKWPWW-Peptids entwickelt. Hierfür wurden P4.R5 MAGI-Zellen mit HIV-1 infiziert bevor die Peptidzugabe erfolgte. Anschließend wurde die in den Überständen enthaltene, infektiöse Virusmenge durch Titration auf TZM-bl-Zellen quantifiziert (Abb. 3.21, Kapitel 3.5.1). Im Rahmen von Vorversuchen stellte sich heraus, dass bei der für die Inhibitionsexperimente verwendete MOI (0,5) die Virusproduktion zwischen Tag drei und vier nach der Infektion beginnt (Abb. 3.23). Aus der Literatur ist bekannt, dass unmodifizierte Peptide relativ schnell (z.B. bereits nach fünf Minuten) proteolytisch degradiert sein können<sup>168,172,185,265</sup>. Aufgrund dieses Wissens sowie der Tatsache, dass die Stabilität des HKWPWW-Peptids im Zellkultursystem unbekannt war, erfolgte die zweimalige Peptidzugabe am dritten sowie am vierten Tag nach der HIV-Infektion (Abb. 3.24). Eine Voraussetzung vor Beginn der Testung der antiviralen Aktivität, war die zelluläre Aufnahme des HKWPWW-Peptids sowie des GSGSGS-Kontrollpeptids in P4.R5.MAGI-Zellen. Die Bilder am CLSM zeigen deutlich, dass beide fluoreszenzmarkierten Peptide sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus der P4.R5 MAGI-Zellen lokalisiert sind. Die gleichzeitige Anfärbung der

Zellmembran zeigt darüber hinaus eine marginale Lokalisation beider Peptide im Bereich der Zellmembran, was im Mischbild an einer gelben Farbe zu erkennen ist (Abb. 3.25 und 3.26, Kapitel 3.5.2). Eine weitere Bedingung für den Beginn der antiviralen Wirksamkeitsanalyse war, zu testen, ob die Peptide einen toxischen Effekt auf P4.R5 MAGI- bzw. TZM-bl-Zellen ausüben. Mittels luminometrischer Messung der von den Zellen freigesetzten ATP-Menge wurde nachgewiesen, dass beide Peptide im getesteten Konzentrationsbereich (von  $2 \times 4,4$  bis  $2 \times 40 \mu\text{M}$ ) weder die Viabilität von P4.R5 MAGI- noch von TZM-bl-Zellen herabsetzen (Abb. 3.27, Kapitel 3.5.3). Somit konnte in diesem Konzentrationsbereich die antivirale Wirksamkeit des HKWPWW-Peptids untersucht werden. Hierfür wurden P4.R5 MAGI-Zellen mit HIV infiziert und darauf an zwei Tagen mit Peptiden behandelt. Anschließend erfolgte die Titerbestimmung der Überstände auf TZM-bl-Zellen (Kapitel 3.5.4.1). Es stellte sich heraus, dass das freie HKWPWW-Peptid in der höchsten Konzentration ( $2 \times 40 \mu\text{M}$ ) die Entstehung infektiöser HI-Viren zu 95% hemmt (Abb. 3.28). Das GSGSGS-Kontrollpeptid übt hierbei lediglich einen geringen Effekt von 30% auf die Produktion infektiöser HI-Viren aus. Die Berechnung der  $\text{IC}_{50}$ - und  $\text{IC}_{90}$ -Werte ergab für das HKWPWW-Peptid bei zweimaliger Peptidzugabe einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $5,7 \mu\text{M}$  bzw. einen  $\text{IC}_{90}$ -Wert von  $28,6 \mu\text{M}$  (Abb. 3.29 und Tab. 3.7).

Als Vergleich kann ein intrazelluläres Peptid herangezogen werden, dass in HIV-infizierten Zellen die Dimerisierung der Reversen Transkriptase in dessen aktive Form hemmt. In der Publikation sind keine  $\text{IC}_{50}$ - bzw.  $\text{IC}_{90}$ -Werte angegeben, jedoch liegt die Affinität des am besten bindenden Peptids für die Reverse Transkriptase bei  $240 \text{ nM}$ . In einer Konzentration von  $100 \text{ nM}$  hemmt dieses Peptid die HIV-Replikation über einen Zeitraum von 22 Tagen<sup>214</sup>. Antivirale Wirksamkeit zeigen auch im Rahmen von gentherapeutischen Ansätzen gegen HIV applizierte und intrazellulär exprimierte Antikörper (Intrabodies)<sup>163</sup>. Ein gegen die Reverse Transkriptase gerichtetes scFv-Fragment mit einer Affinität von  $170 \text{ nM}$  verhindert die cDNA-Synthese und inhibiert infolgedessen die HIV-Replikation bis zu 22 Tage lang<sup>275</sup>. Die intrazelluläre Expression von scFv-Fragmenten, welche die HIV Integrase binden, resultiert sogar in einer nahezu vollständigen Hemmung der HIV-Replikation auf Ebene der Integration proviraler DNA über einen Zeitraum von mehr als 22 Tagen<sup>30,181</sup>.

Der Vergleich dieser publizierten Hemmstoffe mit der inhibitorischen Kapazität des HKWPWW-Peptids lässt vermuten, dass die relativ hohen  $\text{IC}_{50}$ - bzw.  $\text{IC}_{90}$ -Werte vermutlich auf die Dissoziationskonstante des HKWPWW-Peptids zurückzuführen sind. Der  $K_D$ -Wert des Peptids liegt bei  $1,1 \mu\text{M}$  für die SL3-RNA und befindet sich in einem ähnlichen Affinitätsbereich wie die Mehrzahl der mittels Phage Display selektierten Peptide<sup>72,190,295</sup>. Da Bindung nicht mit Inhibition gleichzusetzen ist, war zu erwarten, dass der  $\text{IC}_{50}$ -Wert in einem höheren Konzentrationsbereich als die Dissoziationskonstante liegt. Darüber hinaus

hemmte die stabile Expression des HKWPWW-Peptids in PM1-Zellen die HIV-Replikation nur über einen Zeitraum von fünf Tagen (Kapitel 4.3). Dieses Zeitintervall ist deutlich kürzer als das der oben beschriebenen Inhibitoren. Möglicherweise könnte eine erhöhte Affinität des HKWPWW-Peptids für die  $\Psi$ -Region auch dessen inhibitorische Kapazität verbessern. Jedoch ist auch zu beachten, dass ein direkter Vergleich zweier Hemmstoffe, welche in verschiedenen Systemen auf antivirale Wirksamkeit getestet wurden, schwer möglich ist. Abhängig von dem verwendeten Assay zur Bestimmung der Affinität bzw. der antiviralen Wirksamkeit sowie je nach dem verwendeten Virusstamm bzw. der eingesetzten MOI kann es zu abweichenden Ergebnissen kommen. Streng genommen ist nur ein Vergleich von zwei Inhibitoren, welche in dem gleichen System analysiert wurden, aussagekräftig.

Aus vorangegangenen Studien war bekannt, dass das HKWPWW-Peptid, wenn auch schwächer, ebenfalls an die HIV-1 TAR-RNA-Struktur bindet <sup>241</sup>. Daher wurde vermutet, dass das Peptid zusätzlich die Tat-TAR-Interaktion und somit die Transkription viraler Gene hemmen könnte. Dies lässt sich in den gleichen Zellen, den P4.R5 MAGI-Zellen, analysieren. Diese Zellen exprimieren über einem HIV-LTR-Promotor (und somit abhängig von Tat) stabil integriert das  *$\beta$ -galaktosidase*-Gen. Um den Einfluss des HKWPWW-Peptids auf die frühen Replikationsschritte von HIV zu untersuchen, erfolgte die Adaption des oben beschriebenen Versuchsaufbaus (Kapitel 3.5.4.2). Zu den frühen HIV-Replikationsschritten gehören die Reverse Transkription, die Integration sowie die Transkription des HIV-Genoms (Kapitel 1.1.6) <sup>92,93,110</sup>. Die mit HIV-1 infizierten P4.R5 MAGI-Zellen wurden am zweiten Tag nach der Infektion mit Peptiden behandelt und bereits am vierten Tag die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Zelllysaten ermittelt. Die frühere Beendigung des Experiments sollte den Beginn der nächsten HIV-Replikationsrunde verhindern und erforderte lediglich die einmalige Peptidzugabe (Abb. 3.30, Kapitel 3.5.4.2). Es stellte sich heraus, dass das HKWPWW-Peptid die  $\beta$ -Galaktosidaseexpression konzentrationsabhängig bis zu 60% nach der Behandlung mit 40  $\mu$ M Peptid hemmt (Abb. 3.31). Dies ist ein Hinweis für eine Inhibition auf der Transkriptionsebene. Jedoch ist in der niedrigsten Peptidkonzentration (4,4  $\mu$ M), in der bereits eine 40%ige Reduktion des HIV-Titers nachgewiesen werden konnte, lediglich eine geringe Inhibition der  $\beta$ -Galaktosidaseexpression feststellbar. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die beobachteten Unterschiede in der HIV-Produktion nicht alleine auf eine Hemmung der frühen Replikationsschritte zurückzuführen sind, sondern dass hierfür tatsächlich noch ein weiterer, späterer Schritt im Lebenszyklus von HIV verantwortlich ist.

Das HKWPWW-Peptid weist interessanterweise Homologien zu kurzen kationischen Peptiden auf, welche auf HIV eine virolytische Aktivität ausüben<sup>250,268</sup>. Ziel war zu analysieren, ob der hemmende Effekt des HKWPWW-Peptids auf die Generierung von HI-Viren zusätzlich auf einen virolytischen Effekt zurückzuführen ist. Hierfür wurden lentivirale Pseudoviren, die das *gfp*-Gen enthalten, mit verschiedenen Konzentrationen des HKWPWW-Peptids bzw. des Kontrollpeptids behandelt und anschließend die Infektiosität der Viren bestimmt (Abb. 3.32, Kapitel 3.5.4.3). Es konnte lediglich in sehr hohen Peptidkonzentrationen (174  $\mu$ M) eine minimale Abnahme des infektiösen Virustiters beobachtet werden. Nach Behandlung mit 174  $\mu$ M des HKWPWW-Peptids beläuft sich die Reduktion des Virustiters auf 20% im Vergleich zu dem Kontrollpeptid, wobei es sich hierbei nicht um signifikante Unterschiede handelt (Abb. 3.32). Dies deutet auf einen marginalen virolytischen Effekt des HKWPWW-Peptids in hohen Peptidkonzentrationen hin. In den Peptidkonzentrationen, welche zur Testung der antiviralen Aktivität des Peptids verwendet wurden (maximal 2x 40  $\mu$ M), konnte keine virolytische Aktivität festgestellt werden. Darüber hinaus erfolgte in den Experimenten zur antiviralen Wirksamkeitsanalyse zuerst die HIV-Infektion und erst nach Wegwaschen des Virus die Peptidzugabe. Dadurch wurde ein direkter Kontakt des Virus mit dem Peptid verhindert. Somit ist der beobachtete antivirale Effekt nicht auf eine Lyse der HI-Viren durch das HKWPWW-Peptid zurückzuführen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für das freie HKWPWW-Peptid und das Kontrollpeptid über eine Proteintransduktionsdomäne in eukaryotische Zellen aufgenommen werden. Ferner ist das freie HKWPWW-Peptid in infizierten Zellen funktionell aktiv und inhibiert die Produktion von HI-Viren ohne dabei toxische oder virolytische Effekte auszuüben.

## 4.5 Wirkmechanismus des HKWPWW-Peptids

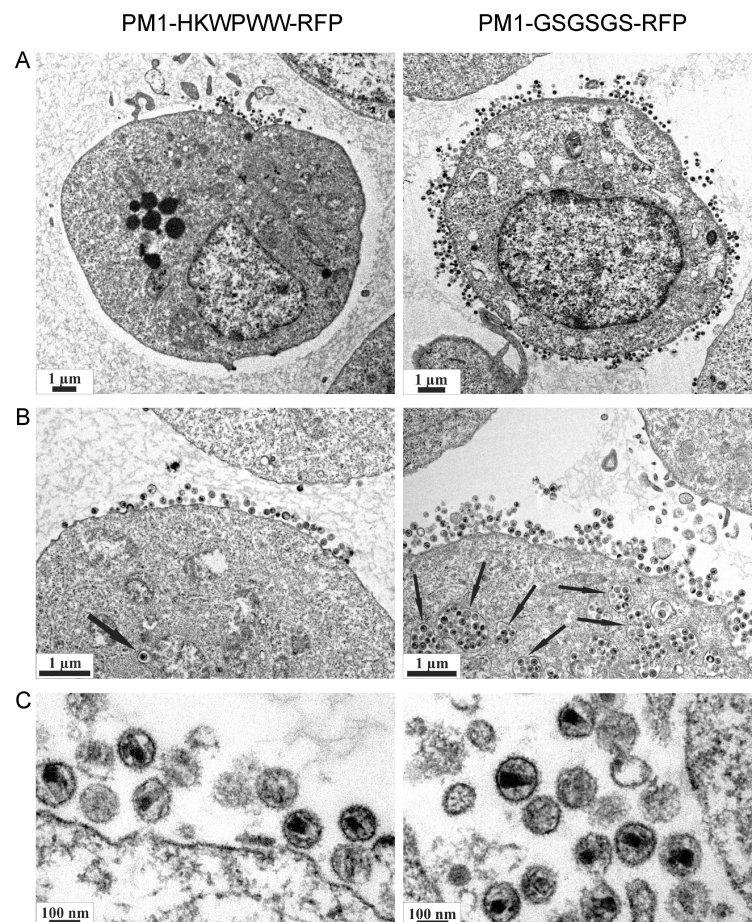
Bis heute ist noch nicht vollkommen aufgeklärt, in welchem Phänotyp eine Inhibition der HIV-Verpackung resultiert. Jedoch zeigt der Vergleich mit veröffentlichten Hemmstoffen der HIV-Verpackung bzw. mit Mutationsanalysen, dass ein Inhibitor der Verpackung die vermehrte Entstehung viraler Partikel zur Folge hat, welche keine  $\Psi$ -RNA enthalten<sup>4,21,22,40,49,74,103,122,157</sup>. Messbar ist dies an einer reduzierten Menge verpackter  $\Psi$ -RNA pro Viruspartikel sowie anhand eines veränderten Verhältnisses infektiöser Viren zur Gesamtzahl der Viren. Die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins führt jedoch nicht zu einer Veränderung dieses Verhältnisses, sondern vielmehr unterscheidet sich die relative Infek-

tiosität der entstandenen Viren kaum von der beider Kontrollen (Kapitel 4.2.2). Auch der  $\Psi$ -RNA-Gehalt der in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins hergestellten Pseudoviren ist vergleichbar mit dem der Kontrollen und steht mit den Daten zur relativen Infektiosität in Übereinstimmung (Kapitel 4.2.3).

Aus den Ergebnissen zur antiviralen Aktivität des HKWPWW-Peptids in verschiedenen Testsystemen, wie transiente Transfektion, stabile Expression oder Transduktion des freien Peptids ist abzuleiten, dass das Peptid die HIV-Produktion und Replikation inhibiert. Auch eine geringere Hemmung der frühen Replikationsschritte von HIV konnte gezeigt werden. Jedoch lag zunächst kein direkter Beweis vor, dass das HKWPWW-Peptid tatsächlich die Verpackung der HIV-RNA hemmt. In Zusammenhang mit einer Hemmung der HIV-1 RNA-Verpackung aufgrund von Mutationen in der NCp7-Domäne bzw. in der  $\Psi$ -Region wurde häufig eine veränderte Morphologie der abgeschnürten, nicht-infektiösen Partikel beobachtet<sup>4,25,225,320</sup>. Auch die Anwendung anderer Inhibitoren des HIV-Zusammenbaus oder der HIV-Reifung führen zu ähnlichen Effekten<sup>102,262,297</sup>. Elektronenmikroskopisch ist dieses Phänomen an einer veränderten Kapsidstruktur erkennbar. Kennzeichnend ist für nicht-infektiösen Viren, dass diese unreif erscheinen und keinen elektrodichten, kegelförmigen Kern wie infektiöse HI-Viren aufweisen. Des Weiteren sind nicht-infektiöse Partikel instabiler und zerfallen nach der Knospung von der Zelloberfläche<sup>96,225</sup>. Im Kontext mit einer Hemmung des HIV-Zusammenbaus wurde auch davon berichtet, dass die Virionen in den Zellen akkumulieren und nicht an der Oberfläche knospen<sup>242</sup>. Um die Morphologie der in Gegenwart des HKWPWW-RFP-Proteins produzierten HI-Viren zu untersuchen, wurden in Kooperation mit Dr. Norbert Bannert am Robert-Koch-Institut in Berlin elektronenmikroskopische Studien durchgeführt. Diese zeigen eindeutig, dass nach Infektion mit HIV-1 von der PM1-HKWPWW-RFP-Zelllinie weniger Viren freigesetzt werden (Abb 4.2 A und B). Dies bestätigt zunächst die Resultate zur antiviralen Aktivität des Peptids nach transienter Transfektion der Peptid-kodierenden DNA sowie nach stabiler Expression des Peptids (Kapitel 4.2 und 4.3). Auch die Knospung von HI-Viren in endosomalen Kompartimenten ist in den HKWPWW-RFP-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie reduziert, wie Pfeile andeuten (Abb. 4.2 B). Des Weiteren ergab die elektronenmikroskopische und computergestützte Analyse, dass die in Anwesenheit des HKWPWW-RFP-Proteins knospenden Virionen einen weniger kondensierten Kern aufweisen (Abb. 4.2 C). Im Vergleich dazu ist die Virusproduktion in der PM1-GSGSGS-RFP-Kontrollzelllinie erhöht und auch die Morphologie der Virionen lässt den für HIV typischen kegelförmigen Kern erkennen<sup>72</sup>.

Dies ist ein Hinweis, dass das HKWPWW-Peptid in der Tat mit dem korrekten Zusammenbau der Viruspartikel interferiert. Auch die Western Blot Analyse transfizierter Zellen zeigt

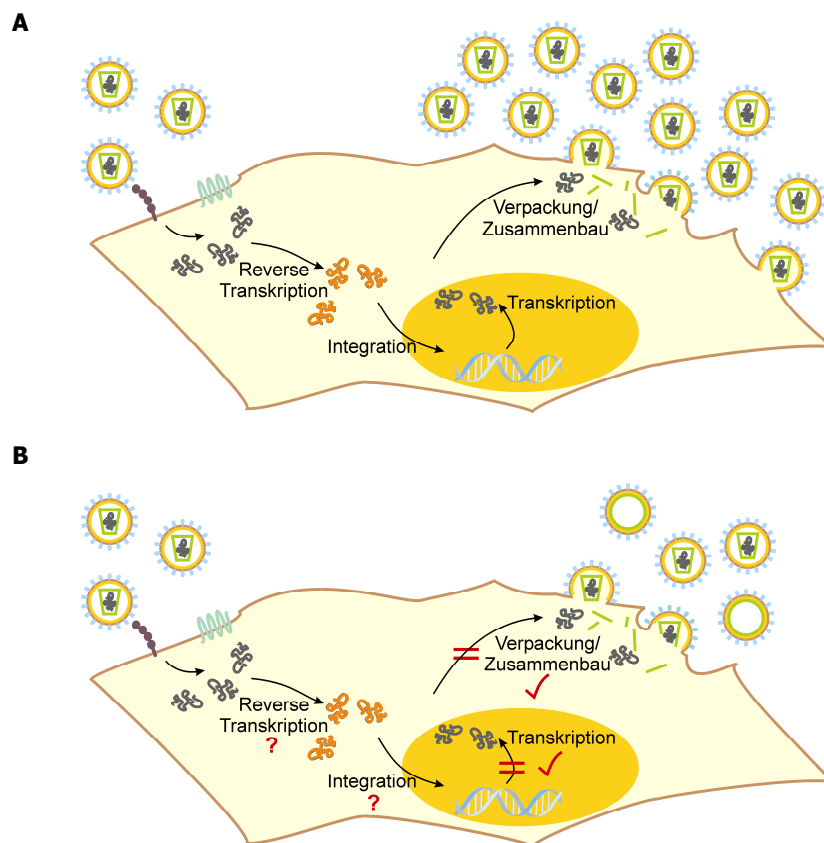
te, dass in Anwesenheit des HKWPWW-Peptids die Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins verlangsamt oder beeinträchtigt ist (Kapitel 4.2.4). Dies ließ bereits vermuten, dass HKWPWW auf Ebene der RNA-Verpackung bzw. der viralen Partikelentstehung in den HIV-Replikationszyklus eingreift.



**Abbildung 4.2:** Die Expression des HKWPWW-RFP-Proteins hemmt die Virusproduktion und führt zu einer veränderten Morphologie der HI-Viren. Stabile PM1-HKWPWW-RFP- (linke Felder) bzw. PM1-GSGSGS-RFP- (rechte Felder) exprimierende Zelllinien wurden mit HIV-1 infiziert und fünf Tage nach der Infektion fixiert und am Elektronenmikroskop analysiert. **A:** Einfluss der Peptidexpression auf die Virusproduktion. **B:** Effekt auf die Knospung an endosomalen Kompartimenten. **C:** Morphologie der in Anwesenheit von HKWPWW-RFP bzw. GSGSGS-RFP hergestellten Viren. *In Zusammenarbeit mit Dr. Norbert Bannert, RKI, Berlin*<sup>72</sup>.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der antivirale Effekt des HKWPWW-Peptids wahrscheinlich auf einem kombinierten Wirkmechanismus beruht. Für diese Annahme gibt es weitere Hinweise: Das HKWPWW-Peptid bindet mit einer Affinität von  $1,1 \mu\text{M}$  an den GGAG-Tetraloop der SL3-RNA, ähnlich wie der natürliche Ligand NCp7<sup>72</sup>. Vorangegangenen Studien zeigten, dass die Affinität des HKWPWW-Peptid für die TAR- und PBS-Strukturen in einem ähnlichen Konzentrationsbereich liegt (Kapitel 4.1)<sup>241</sup>. Im HIV-Replikationszyklus bindet das NCp7-Protein nicht nur an Elemente der  $\Psi$ -Region, sondern auch an die TAR- und PBS-Strukturen und vermittelt den Strangtransfer während der Reversen

Transkription<sup>11,24,52,243,301</sup>. Darüber hinaus wurde basierend auf Mutationen in den Zinkfingern von NCp7 eine Rolle des Proteins in der Integration proviraler DNA nachgewiesen. Das NCp7-Protein assistiert vermutlich der Integrase bei der Erkennung der LTR-Regionen innerhalb des Präintegrationskomplexes<sup>32,234</sup>. Somit weist das HKWPWW-Peptid vergleichbare Bindungseigenschaften für Nukleinsäuren auf, die auch Zielstrukturen des NCp7-Proteins sind. Dies wurde damit in Zusammenhang gebracht, dass HKWPWW die hydrophobe Plattform von NCp7 nachahmen könnte, welche für die Nukleinsäurebindung und -destabilisierung verantwortlich ist (Kapitel 4.1)<sup>72,241</sup>. Vor diesem Hintergrund ist anzunehmen, dass das Peptid in verschiedene Schritte des HIV-Replikationszyklus eingreift, welche die funktionelle Aktivität des Chaperons NCp7 benötigen (Abb. 4.3).



**Abbildung 4.3:** Angenommener Wirkmechanismus des HKWPWW-Peptids. **A:** Wildtyp-Situation bei der Infektion von Zellen ohne Peptidzugabe. **B:** Schritte im HIV-Replikationszyklus, mit welchen das HKWPWW-Peptid interferiert.

In diesem Kontext sind auch einige ältere Studien, welche den Einfluss von Mutationen bzw. der Inaktivierung des NCp7-Proteins auf die Infektiosität von HIV untersuchten, kritisch zu sehen. Die Autoren führten oftmals die beobachtete Produktion nicht-infektiöser HI-Virionen auf eine Hemmung der RNA-Verpackung zurück, ohne zu untersuchen, ob andere HIV-Replikationsschritte ebenfalls gehemmt werden<sup>4,74,225,247,304</sup>. Mittlerweile konnte jedoch nachgewiesen werden, dass NCp7 direkt mit der Reversen Transkriptase inter-

agiert und dass Deletionen in den NCp7 Zinkfingern diese Bindung verhindern<sup>78</sup>. Ferner resultieren Mutationen in den NCp7-Zinkfingern oder deren Inaktivierung neben einer Hemmung der HIV-Verpackung auch in einer reduzierten proviralen DNA-Synthese sowie in einer Inhibition der Integration viraler DNA<sup>25,32,79,296,300</sup>. Die in diesen Studien beobachtete reduzierte Infektiosität und veränderte Morphologie der Viren könnte somit nicht nur auf eine Hemmung der RNA-Verpackung, sondern auch auf eine Inhibition der reversen Transkription bzw. Integration zurückzuführen sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die in Anwesenheit des HKWPWW-Peptids beobachtete Hemmung der HIV-Virusproduktion mindestens auf zwei Effekte zurückzuführen ist: Zum einen inhibiert das HKWPWW-Peptid den korrekten Zusammenbau der Viren während der RNA-Verpackung und zum anderen sind ebenfalls frühe Replikationsschritte von HIV beeinträchtigt (Abb. 4.3). Ob die Hemmung früher Replikationsschritte nur auf einer Inhibition der Transkription viraler Gene beruht, oder ob die Reverse Transkription bzw. die Integration ebenfalls eingeschränkt sind, kann anhand der durchgeführten Experimente nicht eindeutig festgestellt werden und soll das Ziel nachfolgender Arbeiten sein.

## 4.6 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

Bis heute befinden sich nur wenige therapeutische Peptide in klinischer Anwendung, da Peptide nur eine geringe Bioverfügbarkeit aufweisen und unter physiologischen Bedingungen relativ instabil sind (Kapitel 1.2.3)<sup>99,168,265</sup>. Dennoch fanden einige hochwirksame Peptide Einsatz in der Therapie. Dies waren meist natürlich vorkommende Peptide, welche z.B. aus Pflanzen- oder Tiertoxinen isoliert wurden. Diese Peptide werden bis heute u.a. zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen angewendet<sup>182</sup>. Darüber hinaus werden Peptide zur Behandlung von Diabetes, Schmerzen, Tumoren sowie zur Therapie neurologischer Erkrankungen und viraler Infektionen eingesetzt<sup>168,172,185,189</sup>. Soweit bekannt, greifen alle sich bis heute auf dem Markt befindenden Peptide ein extrazelluläres Ziel an und aktivieren z.B. einen Rezeptor oder verhindern eine Rezeptor-Liganden-Interaktion. Darunter auch Enfuvirtid, das den HIV-Eintritt hemmt (Kapitel 1.2.1)<sup>156,198</sup>. Trotz ausführlicher Literaturrecherche konnte kein Peptid identifiziert werden, das auf eine intrazelluläre Struktur abzielt und in der Klinik eingesetzt wird, dies verdeutlicht die Schwierigkeiten, welche mit diesem therapeutischen Ansatz verbunden sind. Auch wenn das Problem, dass Peptide als relativ große Moleküle nur extrazellulär lokalisierte Ziele angreifen können,



---

durch das Ankoppeln von Proteintransduktionsdomänen überwunden werden kann, so scheint sich dieser Ansatz primär für Studien *in vitro* zu eignen. Es existieren z.B. nur wenige Publikationen über die Testung intrazellulärer Peptide *in vivo*<sup>29,33,70</sup>. Im Rahmen einer Studie wurde das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase mittels einer PTD in verschiedenen Gewebe von Mäusen transportiert und zeigte dort enzymatische Aktivität<sup>272</sup>. Eine andere Arbeitsgruppe injizierte ein PTD-Bcl-xL-Fusionsprotein in Mäuse, welches die Blut-Hirn-Schranke überquerte und zu einer reduzierten Apoptose der Neuronen führte<sup>38</sup>. Die Behandlung von Mäusen mit einem anderen PTD-gekoppelten Peptid resultierte in der Hemmung eines in Diabetes involvierten, intrazellulären Signalwegs<sup>150</sup>. Dennoch verdeutlicht dies, dass sich intrazelluläre Peptide in den meisten Fällen nicht selbst als therapeutisches Molekül eignen, sondern vielmehr eine Leitstruktur für das computer- oder strukturgestützte Design niedermolekularer Substanzen darstellen<sup>73,155,171,249</sup>. Vor dem Hintergrund der vorliegenden Ergebnisse sowie unter den beschriebenen Gesichtspunkten handelt es sich bei dem HKWPWW-Peptid eher um eine Leitstruktur, welche einen Ausgangspunkt für die Ableitung niedermolekularer Substanzen zur Behandlung der HIV-Infektion repräsentiert.

## 5 Literaturverzeichnis

### 5.1 Referenzen

1. Accola, M.A., Strack, B. & Gottlinger, H.G. Efficient particle production by minimal Gag constructs which retain the carboxy-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 capsid-p2 and a late assembly domain. *J Virol* **74**, 5395-5402 (2000).
2. Adam, G.I., Miller, S.J., Ulleras, E. & Franklin, G.C. Cell-type-specific modulation of PDGF-B regulatory elements via viral enhancer competition: a caveat for the use of reference plasmids in transient transfection assays. *Gene* **178**, 25-29 (1996).
3. Agris, P.F., Marchbank, M.T., Newman, W., Guenther, R., Ingram, P., Swallow, J., Mucha, P., Szyk, A., Rekowski, P., Peletskaya, E. & Deutscher, S.L. Experimental models of protein-RNA interaction: isolation and analyses of tRNA(Phe) and U1 snRNA-binding peptides from bacteriophage display libraries. *J Protein Chem* **18**, 425-435 (1999).
4. Aldovini, A. & Young, R.A. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol* **64**, 1920-1926 (1990).
5. Amarasinghe, G.K., De Guzman, R.N., Turner, R.B., Chancellor, K.J., Wu, Z.R. & Summers, M.F. NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *J Mol Biol* **301**, 491-511 (2000).
6. Amarasinghe, G.K., De Guzman, R.N., Turner, R.B. & Summers, M.F. NMR structure of stem-loop SL2 of the HIV-1 psi RNA packaging signal reveals a novel A-U-A base-triple platform. *J Mol Biol* **299**, 145-156 (2000).
7. Amarasinghe, G.K., Zhou, J., Miskimon, M., Chancellor, K.J., McDonald, J.A., Matthews, A.G., Miller, R.R., Rouse, M.D. & Summers, M.F. Stem-loop SL4 of the HIV-1 psi RNA packaging signal exhibits weak affinity for the nucleocapsid protein. structural studies and implications for genome recognition. *J Mol Biol* **314**, 961-970 (2001).
8. Azzazy, H.M. & Highsmith, W.E., Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* **35**, 425-445 (2002).
9. Bahner, I., Kearns, K., Hao, Q.L., Smogorzewska, E.M. & Kohn, D.B. Transduction of human CD34+ hematopoietic progenitor cells by a retroviral vector expressing an RRE decoy inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in myelomonocytic cells produced in long-term culture. *J Virol* **70**, 4352-4360 (1996).
10. Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11984-11989 (2000).
11. Bampi, C., Jacquenet, S., Lener, D., Decimo, D. & Darlix, J.L. The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1668-1686 (2004).
12. Banerjea, A., Li, M.J., Bauer, G., Remling, L., Lee, N.S., Rossi, J. & Akkina, R. Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Mol Ther* **8**, 62-71 (2003).

13. Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K. & Silverman, G.J. *Phage Display: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004).
14. Bardy, M., Gay, B., Pebernard, S., Chazal, N., Courcoul, M., Vigne, R., Decroly, E. & Boulanger, P. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vif with Gag and Gag-Pol precursors: co-encapsidation and interference with viral protease-mediated Gag processing. *J Gen Virol* **82**, 2719-2733 (2001).
15. Barquinero, J., Eixarch, H. & Perez-Melgosa, M. Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther* **11 Suppl 1**, S3-9 (2004).
16. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
17. Beltz, H., Azoulay, J., Bernacchi, S., Clamme, J.P., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J.L. & Mely, Y. Impact of the terminal bulges of HIV-1 cTAR DNA on its stability and the destabilizing activity of the nucleocapsid protein NCp7. *J Mol Biol* **328**, 95-108 (2003).
18. Beltz, H., Clauss, C., Piemont, E., Ficheux, D., Gorelick, R.J., Roques, B., Gabus, C., Darlix, J.L., de Rocquigny, H. & Mely, Y. Structural determinants of HIV-1 nucleocapsid protein for cTAR DNA binding and destabilization, and correlation with inhibition of self-primed DNA synthesis. *J Mol Biol* **348**, 1113-1126 (2005).
19. Beltz, H., Piemont, E., Schaub, E., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J.L. & Mely, Y. Role of the structure of the top half of HIV-1 cTAR DNA on the nucleic acid destabilizing activity of the nucleocapsid protein NCp7. *J Mol Biol* **338**, 711-723 (2004).
20. Berglund, J.A., Charpentier, B. & Rosbash, M. A high affinity binding site for the HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res* **25**, 1042-1049 (1997).
21. Berkhout, B. & van Wamel, J.L. Role of the DIS hairpin in replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**, 6723-6732 (1996).
22. Berkowitz, R., Fisher, J. & Goff, S.P. RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 177-218 (1996).
23. Berkowitz, R.D., Ohagen, A., Høglund, S. & Goff, S.P. Retroviral nucleocapsid domains mediate the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging in vivo. *J Virol* **69**, 6445-6456 (1995).
24. Bernacchi, S., Stoylov, S., Piemont, E., Ficheux, D., Roques, B.P., Darlix, J.L. & Mely, Y. HIV-1 nucleocapsid protein activates transient melting of least stable parts of the secondary structure of TAR and its complementary sequence. *J Mol Biol* **317**, 385-399 (2002).
25. Berthoux, L., Pechoux, C. & Darlix, J.L. Multiple effects of an anti-human immunodeficiency virus nucleocapsid inhibitor on virus morphology and replication. *J Virol* **73**, 10000-10009 (1999).
26. Bieniasz, P.D. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* **344**, 55-63 (2006).
27. Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L. & Ramratnam, B. Efficient gene transfer of HIV-1-specific short hairpin RNA into human lymphocytic cells using recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther* **9**, 396-402 (2004).
28. Bombarda, E., Ababou, A., Vuilleumier, C., Gerard, D., Roques, B.P., Piemont, E. & Mely, Y. Time-resolved fluorescence investigation of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein: influence of the binding of nucleic acids. *Biophys J* **76**, 1561-1570 (1999).
29. Borghouts, C., Kunz, C. & Groner, B. Current strategies for the development of peptide-based anti-cancer therapeutics. *J Pept Sci* **11**, 713-726 (2005).
30. BouHamdan, M., Duan, L.X., Pomerantz, R.J. & Strayer, D.S. Inhibition of HIV-1 by an anti-integrase single-chain variable fragment (SFv): delivery by SV40 provides

31. Briggs, J.A., Simon, M.N., Gross, I., Krausslich, H.G., Fuller, S.D., Vogt, V.M. & Johnson, M.C. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 672-675 (2004).
32. Buckman, J.S., Bosche, W.J. & Gorelick, R.J. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zn(2+) fingers are required for efficient reverse transcription, initial integration processes, and protection of newly synthesized viral DNA. *J Virol* **77**, 1469-1480 (2003).
33. Buerger, C., Nagel-Wolfrum, K., Kunz, C., Wittig, I., Butz, K., Hoppe-Seyler, F. & Groner, B. Sequence-specific peptide aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cells. *J Biol Chem* **278**, 37610-37621 (2003).
34. Bukrinskaya, A.G. HIV-1 assembly and maturation. *Archives of virology* **149**, 1067-1082 (2004).
35. Buonaguro, L., Tornesello, M.L. & Buonaguro, F.M. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* **81**, 10209-10219 (2007).
36. Butz, K., Denk, C., Fitscher, B., Crnkovic-Mertens, I., Ullmann, A., Schroder, C.H. & Hoppe-Seyler, F. Peptide aptamers targeting the hepatitis B virus core protein: a new class of molecules with antiviral activity. *Oncogene* **20**, 6579-6586 (2001).
37. Butz, K., Denk, C., Ullmann, A., Scheffner, M. & Hoppe-Seyler, F. Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6693-6697 (2000).
38. Cao, G., Pei, W., Ge, H., Liang, Q., Luo, Y., Sharp, F.R., Lu, A., Ran, R., Graham, S.H. & Chen, J. In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* **22**, 5423-5431 (2002).
39. Carr, R. & Jhoti, H. Structure-based screening of low-affinity compounds. *Drug Discov Today* **7**, 522-527 (2002).
40. Chadwick, D.R. & Lever, A.M. Antisense RNA sequences targeting the 5' leader packaging signal region of human immunodeficiency virus type-1 inhibits viral replication at post-transcriptional stages of the life cycle. *Gene Ther* **7**, 1362-1368 (2000).
41. Chen, C.J., Banerjea, A.C., Harmison, G.G., Haglund, K. & Schubert, M. Multitarget-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication--potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates. *Nucleic Acids Res* **20**, 4581-4589 (1992).
42. Cheng, A.C., Calabro, V. & Frankel, A.D. Design of RNA-binding proteins and ligands. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 478-484 (2001).
43. Choudhury, I., Wang, J., Rabson, A.B., Stein, S., Pooyan, S. & Leibowitz, M.J. Inhibition of HIV-1 replication by a Tat RNA-binding domain peptide analog. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **17**, 104-111 (1998).
44. Cimorelli, A. & Darlix, J.L. Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1166-1184 (2002).
45. Cimorelli, A., Sandin, S., Høglund, S. & Luban, J. Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *J Virol* **74**, 3046-3057 (2000).
46. Clever, J., Sasseti, C. & Parslow, T.G. RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**, 2101-2109 (1995).

47. Clever, J.L., Eckstein, D.A. & Parslow, T.G. Genetic dissociation of the encapsidation and reverse transcription functions in the 5' R region of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **73**, 101-109 (1999).
48. Clever, J.L., Mirandar, D., Jr. & Parslow, T.G. RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* **76**, 12381-12387 (2002).
49. Clever, J.L. & Parslow, T.G. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J Virol* **71**, 3407-3414 (1997).
50. Clever, J.L., Taplitz, R.A., Lochrie, M.A., Polisky, B. & Parslow, T.G. A heterologous, high-affinity RNA ligand for human immunodeficiency virus Gag protein has RNA packaging activity. *J Virol* **74**, 541-546 (2000).
51. Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. & et al. Human immunodeficiency viruses. *Science* **232**, 697 (1986).
52. Cruceanu, M., Urbaneja, M.A., Hixson, C.V., Johnson, D.G., Datta, S.A., Fivash, M.J., Stephen, A.G., Fisher, R.J., Gorelick, R.J., Casas-Finet, J.R., Rein, A., Rouzina, I. & Williams, M.C. Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res* **34**, 593-605 (2006).
53. D'Souza, V. & Summers, M.F. Structural basis for packaging the dimeric genome of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* **431**, 586-590 (2004).
54. D'Souza, V. & Summers, M.F. How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* **3**, 643-655 (2005).
55. Damgaard, C.K., Dyhr-Mikkelsen, H. & Kjems, J. Mapping the RNA binding sites for human immunodeficiency virus type-1 gag and NC proteins within the complete HIV-1 and -2 untranslated leader regions. *Nucleic Acids Res* **26**, 3667-3676 (1998).
56. Daniels, D.A. & Lane, D.P. Phage Peptide Libraries. *Methods* **9**, 494-507 (1996).
57. Das, A.T., Klaver, B., Klasens, B.I., van Wamel, J.L. & Berkhout, B. A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication. *J Virol* **71**, 2346-2356 (1997).
58. De Clercq, E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral research* **38**, 153-179 (1998).
59. De Clercq, E. New anti-HIV agents and targets. *Medicinal research reviews* **22**, 531-565 (2002).
60. de Fougères, A., Vornlocher, H.P., Maraganore, J. & Lieberman, J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 443-453 (2007).
61. De Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N. & Summers, M.F. Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* **279**, 384-388 (1998).
62. De Rocquigny, H., Shvadchak, V., Avilov, S., Dong, C.Z., Dietrich, U., Darlix, J.L. & Mely, Y. Targeting the viral nucleocapsid protein in anti-HIV-1 therapy. *Mini Rev Med Chem* **in press** (2008).
63. Demaison, C., Parsley, K., Brouns, G., Scherr, M., Battmer, K., Kinnon, C., Grez, M. & Thrasher, A.J. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* **13**, 803-813 (2002).
64. Demene, H., Dong, C.Z., Ottmann, M., Rouyez, M.C., Jullian, N., Morellet, N., Mely, Y., Darlix, J.L., Fournie-Zaluski, M.C., Saragosti, S. & et al. 1H NMR structure and biological studies of the His23-->Cys mutant nucleocapsid protein of HIV-1 in-

- dicare that the conformation of the first zinc finger is critical for virus infectivity. *Biochemistry* **33**, 11707-11716 (1994).
65. Demirov, D.G., Ono, A., Orenstein, J.M. & Freed, E.O. Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 955-960 (2002).
  66. Deshayes, S., Morris, M.C., Divita, G. & Heitz, F. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1839-1849 (2005).
  67. Dey, A., York, D., Smalls-Mantey, A. & Summers, M.F. Composition and sequence-dependent binding of RNA to the nucleocapsid protein of Moloney murine leukemia virus. *Biochemistry* **44**, 3735-3744 (2005).
  68. Dietrich, U., Adamski, M., Kreutz, R., Seipp, A., Kuhnel, H. & Rubsamen-Waigmann, H. A highly divergent HIV-2-related isolate. *Nature* **342**, 948-950 (1989).
  69. Dietrich, U., Grez, M., von Briesen, H., Panhans, B., Geissendorfer, M., Kuhnel, H., Maniar, J., Mahambre, G., Becker, W.B., Becker, M.L. & et al. HIV-1 strains from India are highly divergent from prototypic African and US/European strains, but are linked to a South African isolate. *AIDS (London, England)* **7**, 23-27 (1993).
  70. Dietz, G.P. & Bahr, M. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci* **27**, 85-131 (2004).
  71. Dietz, J. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2003).
  72. Dietz, J., Koch, J., Kaur, A., Raja, C., Stein, S., Grez, M., Pustowka, A., Mensch, S., Ferner, J., Möller, L., Bannert, N., Tampé, R., Divita, G., Mely, Y., Schwalbe, H. & Dietrich, U. Inhibition of HIV-1 by a peptide ligand of the genomic RNA packaging signal psi. *ChemMedChem* **in press**(2008).
  73. Dings, R.P. & Mayo, K.H. A journey in structure-based drug discovery: from designed peptides to protein surface topomimetics as antibiotic and antiangiogenic agents. *Accounts of chemical research* **40**, 1057-1065 (2007).
  74. Dorfman, T., Luban, J., Goff, S.P., Haseltine, W.A. & Gottlinger, H.G. Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol* **67**, 6159-6169 (1993).
  75. Dorman, N. & Lever, A.M. RNA-based gene therapy for HIV infection. *HIV Med* **2**, 114-122 (2001).
  76. Dorman, N.M. & Lever, A.M. Investigation of RNA transcripts containing HIV-1 packaging signal sequences as HIV-1 antivirals: generation of cell lines resistant to HIV-1. *Gene Ther* **8**, 157-165 (2001).
  77. Draper, D.E. Themes in RNA-protein recognition. *J Mol Biol* **293**, 255-270 (1999).
  78. Druillennec, S., Caneparo, A., de Rocquigny, H. & Roques, B.P. Evidence of interactions between the nucleocapsid protein NCp7 and the reverse transcriptase of HIV-1. *J Biol Chem* **274**, 11283-11288 (1999).
  79. Druillennec, S., Dong, C.Z., Escaich, S., Gresh, N., Bousseau, A., Roques, B.P. & Fournie-Zaluski, M.C. A mimic of HIV-1 nucleocapsid protein impairs reverse transcription and displays antiviral activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4886-4891 (1999).
  80. Druillennec, S. & Roques, B.P. HIV-1 NCp7 as a target for the design of novel antiviral agents. *Drug news & perspectives* **13**, 337-349 (2000).
  81. Ennifar, E., Paillart, J.C., Bernacchi, S., Walter, P., Pale, P., Decout, J.L., Marquet, R. & Dumas, P. A structure-based approach for targeting the HIV-1 genomic RNA dimerization initiation site. *Biochimie* (2007).
  82. Ennifar, E., Paillart, J.C., Bodlenner, A., Walter, P., Weibel, J.M., Aubertin, A.M., Pale, P., Dumas, P. & Marquet, R. Targeting the dimerization initiation site of HIV-1 RNA with aminoglycosides: from crystal to cell. *Nucleic Acids Res* **34**, 2328-2339 (2006).

83. Ennifar, E., Paillart, J.C., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Dumas, P. & Walter, P. HIV-1 RNA dimerization initiation site is structurally similar to the ribosomal A site and binds aminoglycoside antibiotics. *J Biol Chem* **278**, 2723-2730 (2003).
84. Ennifar, E., Walter, P., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Dumas, P. Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nat Struct Biol* **8**, 1064-1068 (2001).
85. Ennifar, E., Yusupov, M., Walter, P., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Dumas, P. The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. *Structure* **7**, 1439-1449 (1999).
86. Eshete, M., Marchbank, M.T., Deutscher, S.L., Sproat, B., Leszczynska, G., Malkiewicz, A. & Agris, P.F. Specificity of phage display selected peptides for modified anticodon stem and loop domains of tRNA. *The protein journal* **26**, 61-73 (2007).
87. Este, J.A. & Telenti, A. HIV entry inhibitors. *Lancet* **370**, 81-88 (2007).
88. Ferre, F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR methods and applications* **2**, 1-9 (1992).
89. Follenzi, A. & Naldini, L. Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Methods Enzymol* **346**, 454-465 (2002).
90. Frankel, A.D. Fitting peptides into the RNA world. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 332-340 (2000).
91. Frankel, A.D. & Young, J.A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25 (1998).
92. Freed, E.O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**, 1-15 (1998).
93. Freed, E.O. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* **26**, 13-33 (2001).
94. Friesen, W.J. & Darby, M.K. Specific RNA binding by a single C2H2 zinc finger. *J Biol Chem* **276**, 1968-1973 (2001).
95. Fujii, T., Austin, D., Guo, D., Srimatkandada, S., Wang, T., Kubushiro, K., Masumoto, N., Tsukazaki, K., Nozawa, S. & Deisseroth, A.B. Peptides inhibitory for the transcriptional regulatory function of human papillomavirus E2. *Clin Cancer Res* **9**, 5423-5428 (2003).
96. Fuller, S.D., Wilk, T., Gowen, B.E., Krausslich, H.G. & Vogt, V.M. Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle. *Curr Biol* **7**, 729-738 (1997).
97. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B. & et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503 (1984).
98. Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G. & Sundquist, W.I. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**, 55-65 (2001).
99. Gentilucci, L., Tolomelli, A. & Squassabia, F. Peptides and peptidomimetics in medicine, surgery and biotechnology. *Current medicinal chemistry* **13**, 2449-2466 (2006).
100. Girard, F., Barbault, F., Gouyette, C., Huynh-Dinh, T., Paoletti, J. & Lancelot, G. Dimer initiation sequence of HIV-1Lai genomic RNA: NMR solution structure of the extended duplex. *Journal of biomolecular structure & dynamics* **16**, 1145-1157 (1999).
101. Gleenberg, I.O., Herschhorn, A. & Hizi, A. Inhibition of the activities of reverse transcriptase and integrase of human immunodeficiency virus type-1 by peptides

- derived from the homologous viral protein R (Vpr). *J Mol Biol* **369**, 1230-1243 (2007).
102. Goila-Gaur, R., Demirov, D.G., Orenstein, J.M., Ono, A. & Freed, E.O. Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol* **77**, 6507-6519 (2003).
  103. Gorelick, R.J., Gagliardi, T.D., Bosche, W.J., Wiltrout, T.A., Coren, L.V., Chabot, D.J., Lifson, J.D., Henderson, L.E. & Arthur, L.O. Strict conservation of the retroviral nucleocapsid protein zinc finger is strongly influenced by its role in viral infection processes: characterization of HIV-1 particles containing mutant nucleocapsid zinc-coordinating sequences. *Virology* **256**, 92-104 (1999).
  104. Gorelick, R.J., Nigida, S.M., Jr., Bess, J.W., Jr., Arthur, L.O., Henderson, L.E. & Rein, A. Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J Virol* **64**, 3207-3211 (1990).
  105. Gottlinger, H.G., Dorfman, T., Sodroski, J.G. & Haseltine, W.A. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3195-3199 (1991).
  106. Gowda, S.D., Stein, B.S. & Engleman, E.G. Identification of protein intermediates in the processing of the p55 HIV-1 gag precursor in cells infected with recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem* **264**, 8459-8462 (1989).
  107. Gowda, S.D., Stein, B.S., Steimer, K.S. & Engleman, E.G. Expression and processing of human immunodeficiency virus type 1 gag and pol genes by cells infected with a recombinant vaccinia virus. *J Virol* **63**, 1451-1454 (1989).
  108. Greatorex, J. The retroviral RNA dimer linkage: different structures may reflect different roles. *Retrovirology* **1**, 22 (2004).
  109. Green, L.M. & Berg, J.M. A retroviral Cys-Xaa2-Cys-Xaa4-His-Xaa4-Cys peptide binds metal ions: spectroscopic studies and a proposed three-dimensional structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4047-4051 (1989).
  110. Greene, W.C. & Peterlin, B.M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* **8**, 673-680 (2002).
  111. Grez, M., Dietrich, U., Balfe, P., von Briesen, H., Maniar, J.K., Mahambre, G., Delwart, E.L., Mullins, J.I. & Rubsamen-Waigmann, H. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infections in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of these viruses. *J Virol* **68**, 2161-2168 (1994).
  112. Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, P., Darlix, J.L. & Muriaux, D. Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol* **359**, 848-862 (2006).
  113. Grigorov, B., Decimo, D., Smagulova, F., Pechoux, C., Mougel, M., Muriaux, D. & Darlix, J.L. Intracellular HIV-1 Gag localization is impaired by mutations in the nucleocapsid zinc fingers. *Retrovirology* **4**, 54 (2007).
  114. Gu, S., Ji, J., Kim, J.D., Yee, J.K. & Rossi, J.J. Inhibition of infectious human immunodeficiency virus type 1 virions via lentiviral vector encoded short antisense RNAs. *Oligonucleotides* **16**, 287-295 (2006).
  115. Gulick, R.M. New antiretroviral drugs. *Clin Microbiol Infect* **9**, 186-193 (2003).
  116. Hagan, N. & Fabris, D. Direct mass spectrometric determination of the stoichiometry and binding affinity of the complexes between nucleocapsid protein and RNA stem-loop hairpins of the HIV-1 Psi-recognition element. *Biochemistry* **42**, 10736-10745 (2003).
  117. Hagan, N.A. & Fabris, D. Dissecting the protein-RNA and RNA-RNA interactions in the nucleocapsid-mediated dimerization and isomerization of HIV-1 stemloop 1. *J Mol Biol* **365**, 396-410 (2007).
  118. Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J., Jr., Feinberg, J.E., Balfour, H.H., Jr., Deyton, L.R., Chodakewitz,



- J.A. & Fischl, M.A. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *The New England journal of medicine* **337**, 725-733 (1997).
119. Hannon, G.J. RNA interference. *Nature* **418**, 244-251 (2002).
120. Harrich, D., Hooker, C.W. & Parry, E. The human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA upper stem-loop plays distinct roles in reverse transcription and RNA packaging. *J Virol* **74**, 5639-5646 (2000).
121. Harrison, G.P. & Lever, A.M. The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol* **66**, 4144-4153 (1992).
122. Harrison, G.P., Miele, G., Hunter, E. & Lever, A.M. Functional analysis of the core human immunodeficiency virus type 1 packaging signal in a permissive cell line. *J Virol* **72**, 5886-5896 (1998).
123. Hayashi, T., Shioda, T., Iwakura, Y. & Shibuta, H. RNA packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **188**, 590-599 (1992).
124. Helga-Maria, C., Hammarskjold, M.L. & Rekosh, D. An intact TAR element and cytoplasmic localization are necessary for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Virol* **73**, 4127-4135 (1999).
125. Hendrix, M., Priestley, E.S., Joyce, G.F. & Wong, C.H. Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance. *J Am Chem Soc* **119**, 3641-3648 (1997).
126. Henriques, S.T., Melo, M.N. & Castanho, M.A. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem J* **399**, 1-7 (2006).
127. Hermann, T. Strategies for the Design of Drugs Targeting RNA and RNA-Protein Complexes. *Angew Chem Int Ed Engl* **39**, 1890-1904 (2000).
128. Hermann, T. & Patel, D.J. Stitching together RNA tertiary architectures. *J Mol Biol* **294**, 829-849 (1999).
129. Hermann, T. & Westhof, E. RNA as a drug target: chemical, modelling, and evolutionary tools. *Curr Opin Biotechnol* **9**, 66-73 (1998).
130. Hildinger, M., Abel, K.L., Ostertag, W. & Baum, C. Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* **73**, 4083-4089 (1999).
131. Hildinger, M., Dittmar, M.T., Schult-Dietrich, P., Fehse, B., Schnierle, B.S., Thaler, S., Stiegler, G., Welker, R. & von Laer, D. Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J Virol* **75**, 3038-3042 (2001).
132. Hillis, D.M. AIDS. Origins of HIV. *Science* **288**, 1757-1759 (2000).
133. Hoet, R.M., Pieffers, M., Stassen, M.H., Raats, J., de Wildt, R., Pruijn, G.J., van den Hoogen, F. & van Venrooij, W.J. The importance of the light chain for the epitope specificity of human anti-U1 small nuclear RNA autoantibodies present in systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* **163**, 3304-3312 (1999).
134. Hoffmann, C., Rockstroh, J.K. & Kamps, S.B. *HIV.NET 2007*, (Steinhäuser Verlag, Wuppertal-Beyenburg, 2007).
135. Houzet, L., Paillart, J.C., Smagulova, F., Maurel, S., Morichaud, Z., Marquet, R. & Mougel, M. HIV controls the selective packaging of genomic, spliced viral and cellular RNAs into virions through different mechanisms. *Nucleic Acids Res* **35**, 2695-2704 (2007).
136. Huang, M., Maynard, A., Turpin, J.A., Graham, L., Janini, G.M., Covell, D.G. & Rice, W.G. Anti-HIV agents that selectively target retroviral nucleocapsid protein zinc fingers without affecting cellular zinc finger proteins. *J Med Chem* **41**, 1371-1381 (1998).

137. Huang, M., Orenstein, J.M., Martin, M.A. & Freed, E.O. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* **69**, 6810-6818 (1995).
138. Humbert, M., Antoni, S., Brill, B., Landersz, M., Rodes, B., Soriano, V., Wintergerst, U., Knechten, H., Staszewski, S., von Laer, D., Dittmar, M.T. & Dietrich, U. Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *Eur J Immunol* **37**, 501-515 (2007).
139. Hüther, A. & Dietrich, U. The emerge of peptides as therapeutic drugs for the inhibition of HIV-1. *AIDS reviews* **9**, 208-217 (2007).
140. Hwang, S., Tamilarasu, N., Ryan, K., Huq, I., Richter, S., Still, W.C. & Rana, T.M. Inhibition of gene expression in human cells through small molecule-RNA interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12997-13002 (1999).
141. Ironmonger, A., Whittaker, B., Baron, A.J., Clique, B., Adams, C.J., Ashcroft, A.E., Stockley, P.G. & Nelson, A. Scanning conformational space with a library of stereo- and regiochemically diverse aminoglycoside derivatives: the discovery of new ligands for RNA hairpin sequences. *Org Biomol Chem* **5**, 1081-1086 (2007).
142. Ivanova, G., Arzumanov, A.A., Turner, J.J., Reigadas, S., Toulme, J.J., Brown, D.E., Lever, A.M. & Gait, M.J. Anti-HIV activity of steric block oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci* **1082**, 103-115 (2006).
143. Jacque, J.M., Triques, K. & Stevenson, M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* **418**, 435-438 (2002).
144. Jenkins, L.M., Byrd, J.C., Hara, T., Srivastava, P., Mazur, S.J., Stahl, S.J., Inman, J.K., Appella, E., Omichinski, J.G. & Legault, P. Studies on the mechanism of inactivation of the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 with 2-mercaptobenzamide thioesters. *J Med Chem* **48**, 2847-2858 (2005).
145. Jeong, C.W., Ahn, K.S., Rho, N.K., Park, Y.D., Lee, D.Y., Lee, J.H., Lee, E.S. & Yang, J.M. Differential in vivo cytokine mRNA expression in lesional skin of intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis patients using semiquantitative RT-PCR. *Clin Exp Allergy* **33**, 1717-1724 (2003).
146. Jewell, N.A. & Mansky, L.M. In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *J Gen Virol* **81**, 1889-1899 (2000).
147. Jones, K.A. & Peterlin, B.M. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* **63**, 717-743 (1994).
148. Jouan, V., Canron, X., Alemany, M., Caen, J.P., Quentin, G., Plouet, J. & Bikfalvi, A. Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action. *Blood* **94**, 984-993 (1999).
149. Jouvenet, N., Neil, S.J., Bess, C., Johnson, M.C., Virgen, C.A., Simon, S.M. & Bieniasz, P.D. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS biology* **4**, e435 (2006).
150. Kaneto, H., Nakatani, Y., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Matsuoka, T.A., Matsuhisa, M., Kajimoto, Y., Ichijo, H., Yamasaki, Y. & Hori, M. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med* **10**, 1128-1132 (2004).
151. Kay, B.K., Kasanov, J. & Yamabhai, M. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods* **24**, 240-246 (2001).
152. Kay, M.A., Glorioso, J.C. & Naldini, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* **7**, 33-40 (2001).
153. Kehoe, J.W. & Kay, B.K. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev* **105**, 4056-4072 (2005).
154. Khandogin, J., Musier-Forsyth, K. & York, D.M. Insights into the regioselectivity and RNA-binding affinity of HIV-1 nucleocapsid protein from linear-scaling quantum methods. *J Mol Biol* **330**, 993-1004 (2003).

155. Kieber-Emmons, T., Murali, R. & Greene, M.I. Therapeutic peptides and peptidomimetics. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 435-441 (1997).
156. Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., DiMassimo, B., Cloud, G.A., Lee, J.Y., Aldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M.R., Nowak, M.A., Shaw, G.M. & Saag, M.S. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**, 1302-1307 (1998).
157. Kim, M.Y. & Jeong, S. Inhibition of the functions of the nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus-1 by an RNA aptamer. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 1181-1186 (2004).
158. Kim, S.J., Kim, M.Y., Lee, J.H., You, J.C. & Jeong, S. Selection and stabilization of the RNA aptamers against the human immunodeficiency virus type-1 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 925-931 (2002).
159. Klein, K.C., Reed, J.C. & Lingappa, J.R. Intracellular destinies: degradation, targeting, assembly, and endocytosis of HIV Gag. *AIDS reviews* **9**, 150-161 (2007).
160. Kolb, G. & Boiziau, C. Selection by phage display of peptides targeting the HIV-1 TAR element. *RNA Biol* **2**, 28-33 (2005).
161. Konigs, C., Rowley, M.J., Thompson, P., Myers, M.A., Scealy, M., Davies, J.M., Wu, L., Dietrich, U., Mackay, C.R. & Mackay, I.R. Monoclonal antibody screening of a phage-displayed random peptide library reveals mimotopes of chemokine receptor CCR5: implications for the tertiary structure of the receptor and for an N-terminal binding site for HIV-1 gp120. *Eur J Immunol* **30**, 1162-1171 (2000).
162. Konopka, K., Lee, N.S., Rossi, J. & Duzgunes, N. Rev-binding aptamer and CMV promoter act as decoys to inhibit HIV replication. *Gene* **255**, 235-244 (2000).
163. Kontermann, R.E. Intrabodies as therapeutic agents. *Methods* **34**, 163-170 (2004).
164. Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C. & Detours, V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British medical bulletin* **58**, 19-42 (2001).
165. Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B.H., Wolinsky, S. & Bhattacharya, T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**, 1789-1796 (2000).
166. Kuhnel, H., von Briesen, H., Dietrich, U., Adamski, M., Mix, D., Biesert, L., Kreutz, R., Immelmann, A., Henco, K., Meichsner, C. & et al. Molecular cloning of two west African human immunodeficiency virus type 2 isolates that replicate well in macrophages: a Gambian isolate, from a patient with neurologic acquired immunodeficiency syndrome, and a highly divergent Ghanian isolate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2383-2387 (1989).
167. Lacourciere, K.A., Stivers, J.T. & Marino, J.P. Mechanism of neomycin and Rev peptide binding to the Rev responsive element of HIV-1 as determined by fluorescence and NMR spectroscopy. *Biochemistry* **39**, 5630-5641 (2000).
168. Ladner, R.C., Sato, A.K., Gorzelany, J. & de Souza, M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today* **9**, 525-529 (2004).
169. Laham-Karam, N. & Bacharach, E. Transduction of human immunodeficiency virus type 1 vectors lacking encapsidation and dimerization signals. *J Virol* **81**, 10687-10698 (2007).
170. Lalezari, J.P., Henry, K., O'Hearn, M., Montaner, J.S., Piliero, P.J., Trottier, B., Walmsley, S., Cohen, C., Kuritzkes, D.R., Eron, J.J., Jr., Chung, J., DeMasi, R., Donatucci, L., Drobnes, C., Delehanty, J. & Salgo, M. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *The New England journal of medicine* **348**, 2175-2185 (2003).

171. Langer, T. & Hoffmann, R.D. Virtual screening: an effective tool for lead structure discovery? *Curr Pharm Des* **7**, 509-527 (2001).
172. Latham, P.W. Therapeutic peptides revisited. *Nat Biotechnol* **17**, 755-757 (1999).
173. Laughrea, M., Jette, L., Mak, J., Kleiman, L., Liang, C. & Wainberg, M.A. Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *J Virol* **71**, 3397-3406 (1997).
174. Lawrence, D.C., Stover, C.C., Noznitsky, J., Wu, Z. & Summers, M.F. Structure of the intact stem and bulge of HIV-1 Psi-RNA stem-loop SL1. *J Mol Biol* **326**, 529-542 (2003).
175. Layne, S.P., Merges, M.J., Dembo, M., Spouge, J.L., Conley, S.R., Moore, J.P., Raina, J.L., Renz, H., Gelderblom, H.R. & Nara, P.L. Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology* **189**, 695-714 (1992).
176. Lee, S.K., Dykxhoorn, D.M., Kumar, P., Ranjbar, S., Song, E., Maliszewski, L.E., Francois-Bongarcon, V., Goldfeld, A., Swamy, N.M., Lieberman, J. & Shankar, P. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs protects CD4 T cells from multiple clades and primary isolates of HIV. *Blood* **106**, 818-826 (2005).
177. Lee, Y.M., Liu, B. & Yu, X.F. Formation of virus assembly intermediate complexes in the cytoplasm by wild-type and assembly-defective mutant human immunodeficiency virus type 1 and their association with membranes. *J Virol* **73**, 5654-5662 (1999).
178. Lee, Y.M. & Yu, X.F. Identification and characterization of virus assembly intermediate complexes in HIV-1-infected CD4+ T cells. *Virology* **243**, 78-93 (1998).
179. Leitner, T., Foley, B., Hahn, B., Marx, P., McCutchan, F., Mellors, J., Wolinsky, S. & Korber, B. *HIV Sequence Compendium 2006/2007*, (Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, NM, LA-UR 07-4826, 2006/2007).
180. Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W. & Sodroski, J. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol* **63**, 4085-4087 (1989).
181. Levy-Mintz, P., Duan, L., Zhang, H., Hu, B., Dornadula, G., Zhu, M., Kulkosky, J., Bizub-Bender, D., Skalka, A.M. & Pomerantz, R.J. Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol* **70**, 8821-8832 (1996).
182. Lewis, R.J. & Garcia, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 790-802 (2003).
183. Liang, C., Rong, L., Cherry, E., Kleiman, L., Laughrea, M. & Wainberg, M.A. Deletion mutagenesis within the dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 results in delayed processing of the p2 peptide from precursor proteins. *J Virol* **73**, 6147-6151 (1999).
184. Liang, C., Rong, L., Laughrea, M., Kleiman, L. & Wainberg, M.A. Compensatory point mutations in the human immunodeficiency virus type 1 Gag region that are distal from deletion mutations in the dimerization initiation site can restore viral replication. *J Virol* **72**, 6629-6636 (1998).
185. Lien, S. & Lowman, H.B. Therapeutic peptides. *Trends Biotechnol* **21**, 556-562 (2003).
186. Lindwasser, O.W. & Resh, M.D. Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies. *J Virol* **78**, 6013-6023 (2004).
187. Lo, K.M., Biasolo, M.A., Dehni, G., Palu, G. & Haseltine, W.A. Inhibition of replication of HIV-1 by retroviral vectors expressing tat-antisense and anti-tat ribozyme RNA. *Virology* **190**, 176-183 (1992).

188. Lochrie, M.A., Waugh, S., Pratt, D.G., Jr., Clever, J., Parslow, T.G. & Polisky, B. In vitro selection of RNAs that bind to the human immunodeficiency virus type-1 gag polyprotein. *Nucleic Acids Res* **25**, 2902-2910 (1997).
189. Loffet, A. Peptides as drugs: is there a market? *J Pept Sci* **8**, 1-7 (2002).
190. Lowman, H.B. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **26**, 401-424 (1997).
191. Luban, J. & Goff, S.P. Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol* **68**, 3784-3793 (1994).
192. Ludwig, V., Krebs, A., Stoll, M., Dietrich, U., Ferner, J., Schwalbe, H., Scheffer, U., Durner, G. & Gobel, M.W. Tripeptides from Synthetic Amino Acids Block the Tat-TAR Association and Slow Down HIV Spread in Cell Cultures. *ChemBiochem* **8**, 1850-1856 (2007).
193. Luedtke, N.W., Liu, Q. & Tor, Y. RNA-ligand interactions: affinity and specificity of aminoglycoside dimers and acridine conjugates to the HIV-1 Rev response element. *Biochemistry* **42**, 11391-11403 (2003).
194. Lunde, B.M., Moore, C. & Varani, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 479-490 (2007).
195. Mae, M. & Langel, U. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 509-514 (2006).
196. Maki, A.H., Ozarowski, A., Misra, A., Urbaneja, M.A. & Casas-Finet, J.R. Phosphorescence and optically detected magnetic resonance of HIV-1 nucleocapsid protein complexes with stem-loop sequences of the genomic Psi-recognition element. *Biochemistry* **40**, 1403-1412 (2001).
197. Martin-Serrano, J. & Bieniasz, P.D. A bipartite late-budding domain in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**, 12373-12377 (2003).
198. Matthews, T., Salgo, M., Greenberg, M., Chung, J., DeMasi, R. & Bolognesi, D. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 215-225 (2004).
199. Mayer, G. & Famulok, M. Aptamere als Therapeutika und als Werkzeuge zur Wirkstoffsuche. Nukleinsäuren im Drug Discovery Prozess. *Pharmazie in unserer Zeit* **36**, 432-436 (2007).
200. McBride, M.S. & Panganiban, A.T. Position dependence of functional hairpins important for human immunodeficiency virus type 1 RNA encapsidation in vivo. *J Virol* **71**, 2050-2058 (1997).
201. McPike, M.P., Goodisman, J. & Dabrowiak, J.C. Footprinting and circular dichroism studies on paromomycin binding to the packaging region of human immunodeficiency virus type-1. *Bioorg Med Chem* **10**, 3663-3672 (2002).
202. McPike, M.P., Goodisman, J. & Dabrowiak, J.C. Specificity of neomycin analogues bound to the packaging region of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Bioorg Med Chem* **12**, 1835-1843 (2004).
203. McPike, M.P., Sullivan, J.M., Goodisman, J. & Dabrowiak, J.C. Footprinting, circular dichroism and UV melting studies on neomycin B binding to the packaging region of human immunodeficiency virus type-1 RNA. *Nucleic Acids Res* **30**, 2825-2831 (2002).
204. Mihailescu, M.R. & Marino, J.P. A proton-coupled dynamic conformational switch in the HIV-1 dimerization initiation site kissing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1189-1194 (2004).
205. Modrow, S., Falke, D. & Truyen, U. *Molekulare Virologie*, (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2003).
206. Modrow, S., Kattenbeck, B., von Poblitzki, A., Niedrig, M., Wagner, R. & Wolf, H. The gag proteins of human immunodeficiency virus type 1: mechanisms of virus

- assembly and possibilities for interference. *Med Microbiol Immunol* **183**, 177-194 (1994).
207. Moore, J.P. & Stevenson, M. New targets for inhibitors of HIV-1 replication. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 40-49 (2000).
208. Moore, P.L., Crooks, E.T., Porter, L., Zhu, P., Cayanan, C.S., Grise, H., Corcoran, P., Zwick, M.B., Franti, M., Morris, L., Roux, K.H., Burton, D.R. & Binley, J.M. Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **80**, 2515-2528 (2006).
209. Morellet, N., de Rocquigny, H., Mely, Y., Jullian, N., Demene, H., Ottmann, M., Gerard, D., Darlix, J.L., Fournie-Zaluski, M.C. & Roques, B.P. Conformational behaviour of the active and inactive forms of the nucleocapsid NCp7 of HIV-1 studied by 1H NMR. *J Mol Biol* **235**, 287-301 (1994).
210. Morellet, N., Demene, H., Teilleux, V., Huynh-Dinh, T., de Rocquigny, H., Fournie-Zaluski, M.C. & Roques, B.P. Structure of the complex between the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7 and the single-stranded pentanucleotide d(ACGCC). *J Mol Biol* **283**, 419-434 (1998).
211. Morellet, N., Jullian, N., De Rocquigny, H., Maigret, B., Darlix, J.L. & Roques, B.P. Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by 1H NMR. *Embo J* **11**, 3059-3065 (1992).
212. Morita, E. & Sundquist, W.I. Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 395-425 (2004).
213. Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. & Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol* **19**, 1173-1176 (2001).
214. Morris, M.C., Robert-Hebmann, V., Chaloin, L., Mery, J., Heitz, F., Devaux, C., Goody, R.S. & Divita, G. A new potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitor. A synthetic peptide derived from the interface subunit domains. *J Biol Chem* **274**, 24941-24946 (1999).
215. Mujeeb, A., Clever, J.L., Billeci, T.M., James, T.L. & Parslow, T.G. Structure of the dimer initiation complex of HIV-1 genomic RNA. *Nat Struct Biol* **5**, 432-436 (1998).
216. Mujeeb, A., Ulyanov, N.B., Georgantis, S., Smirnov, I., Chung, J., Parslow, T.G. & James, T.L. Nucleocapsid protein-mediated maturation of dimer initiation complex of full-length SL1 stemloop of HIV-1: sequence effects and mechanism of RNA re-folding. *Nucleic Acids Res* **35**, 2026-2034 (2007).
217. Muriaux, D., Darlix, J.L. & Cimarelli, A. Targeting the assembly of the human immunodeficiency virus type I. *Curr Pharm Des* **10**, 3725-3739 (2004).
218. Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D. & Rein, A. RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5246-5251 (2001).
219. Nagai, K. RNA-protein complexes. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 53-61 (1996).
220. Nagel-Wolfrum, K., Buerger, C., Wittig, I., Butz, K., Hoppe-Seyler, F. & Groner, B. The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. *Mol Cancer Res* **2**, 170-182 (2004).
221. Nielsen, M.H., Pedersen, F.S. & Kjems, J. Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology* **2**, 10 (2005).
222. Nimjee, S.M., Rusconi, C.P. & Sullenger, B.A. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annual review of medicine* **56**, 555-583 (2005).
223. Nisole, S. & Saib, A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* **1**, 9 (2004).
224. Ott, D.E., Coren, L.V., Copeland, T.D., Kane, B.P., Johnson, D.G., Sowder, R.C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L.O. & Henderson, L.E. Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and

- simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **72**, 2962-2968 (1998).
225. Ottmann, M., Gabus, C. & Darlix, J.L. The central globular domain of the nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus type 1 is critical for virion structure and infectivity. *J Virol* **69**, 1778-1784 (1995).
226. Oz Gleenberg, I., Herschhorn, A., Goldgur, Y. & Hizi, A. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase by a novel peptide derived from the viral integrase. *Archives of biochemistry and biophysics* **458**, 202-212 (2007).
227. Paillart, J.C., Dettenhofer, M., Yu, X.F., Ehresmann, C., Ehresmann, B. & Marquet, R. First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J Biol Chem* **279**, 48397-48403 (2004).
228. Paillart, J.C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R. & Mak, J. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat Rev Microbiol* **2**, 461-472 (2004).
229. Palu, G., Parolin, C., Takeuchi, Y. & Pizzato, M. Progress with retroviral gene vectors. *Rev Med Virol* **10**, 185-202 (2000).
230. Parolin, C., Dorfman, T., Palu, G., Gottlinger, H. & Sodroski, J. Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J Virol* **68**, 3888-3895 (1994).
231. Patel, D.J. Adaptive recognition in RNA complexes with peptides and protein modules. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 74-87 (1999).
232. Perlman, M. & Resh, M.D. Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic* **7**, 731-745 (2006).
233. Peterlin, B.M. & Trono, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* **3**, 97-107 (2003).
234. Poljak, L., Batson, S.M., Ficheux, D., Roques, B.P., Darlix, J.L. & Kas, E. Analysis of NCp7-dependent activation of HIV-1 cDNA integration and its conservation among retroviral nucleocapsid proteins. *J Mol Biol* **329**, 411-421 (2003).
235. Pomerantz, R.J. & Horn, D.L. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med* **9**, 867-873 (2003).
236. Poole, E., Strappe, P., Mok, H.P., Hicks, R. & Lever, A.M. HIV-1 Gag-RNA interaction occurs at a perinuclear/centrosomal site; analysis by confocal microscopy and FRET. *Traffic* **6**, 741-755 (2005).
237. Pornillos, O., Garrus, J.E. & Sundquist, W.I. Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol* **12**, 569-579 (2002).
238. Potash, M.J., Bentsman, G., Muir, T., Krachmarov, C., Sova, P. & Volsky, D.J. Peptide inhibitors of HIV-1 protease and viral infection of peripheral blood lymphocytes based on HIV-1 Vif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13865-13868 (1998).
239. Pustowka, A. Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2004).
240. Pustowka, A., Dietz, J., Ferner, J., Baumann, M., Landersz, M., Konigs, C., Schwalbe, H. & Dietrich, U. Identification of peptide ligands for target RNA structures derived from the HIV-1 packaging signal psi by screening phage-displayed peptide libraries. *Chembiochem* **4**, 1093-1097 (2003).
241. Raja, C., Ferner, J., Dietrich, U., Avilov, S., Ficheux, D., Darlix, J.L., de Rocquigny, H., Schwalbe, H. & Mely, Y. A tryptophan-rich hexapeptide inhibits nucleic acid destabilization chaperoned by the HIV-1 nucleocapsid protein. *Biochemistry* **45**, 9254-9265 (2006).
242. Rakotobe, D., Tardy, J.C., Andre, P., Hong, S.S., Darlix, J.L. & Boulanger, P. Human Polycomb group EED protein negatively affects HIV-1 assembly and release. *Retrovirology* **4**, 37 (2007).
243. Rein, A., Henderson, L.E. & Levin, J.G. Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem Sci* **23**, 297-301 (1998).

244. Resh, M.D. Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS reviews* **7**, 84-91 (2005).
245. Rice, W.G., Baker, D.C., Schaeffer, C.A., Graham, L., Bu, M., Terpening, S., Clanton, D., Schultz, R., Bader, J.P., Buckheit, R.W., Jr., Field, L., Singh, P.K. & Turpin, J.A. Inhibition of multiple phases of human immunodeficiency virus type 1 replication by a dithiane compound that attacks the conserved zinc fingers of retroviral nucleocapsid proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 419-426 (1997).
246. Rice, W.G., Schaeffer, C.A., Harten, B., Villinger, F., South, T.L., Summers, M.F., Henderson, L.E., Bess, J.W., Jr., Arthur, L.O., McDougal, J.S. & et al. Inhibition of HIV-1 infectivity by zinc-ejecting aromatic C-nitroso compounds. *Nature* **361**, 473-475 (1993).
247. Rice, W.G., Supko, J.G., Malspeis, L., Buckheit, R.W., Jr., Clanton, D., Bu, M., Graham, L., Schaeffer, C.A., Turpin, J.A., Domagala, J., Gogliotti, R., Bader, J.P., Halliday, S.M., Coren, L., Sowder, R.C., 2nd, Arthur, L.O. & Henderson, L.E. Inhibitors of HIV nucleocapsid protein zinc fingers as candidates for the treatment of AIDS. *Science* **270**, 1194-1197 (1995).
248. Rice, W.G., Turpin, J.A., Huang, M., Clanton, D., Buckheit, R.W., Jr., Covell, D.G., Wallqvist, A., McDonnell, N.B., DeGuzman, R.N., Summers, M.F., Zalkow, L., Bader, J.P., Haugwitz, R.D. & Sausville, E.A. Azodicarbonamide inhibits HIV-1 replication by targeting the nucleocapsid protein. *Nat Med* **3**, 341-345 (1997).
249. Ripka, A.S. & Rich, D.H. Peptidomimetic design. *Current opinion in chemical biology* **2**, 441-452 (1998).
250. Robinson, W.E., Jr., McDougall, B., Tran, D. & Selsted, M.E. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J Leukoc Biol* **63**, 94-100 (1998).
251. Rong, L., Russell, R.S., Hu, J., Laughrea, M., Wainberg, M.A. & Liang, C. Deletion of stem-loop 3 is compensated by second-site mutations within the Gag protein of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **314**, 221-228 (2003).
252. Rowland-Jones, S.L. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol* **3**, 343-348 (2003).
253. Roy, B.B., Russell, R.S., Turner, D. & Liang, C. The T12I mutation within the SP1 region of Gag restricts packaging of spliced viral RNA into human immunodeficiency virus type 1 with mutated RNA packaging signals and mutated nucleocapsid sequence. *Virology* **344**, 304-314 (2006).
254. Rubsamen-Waigmann, H., Becker, W.B., Helm, E.B., Brodt, R., Fischer, H., Henco, K. & Brede, H.D. Isolation of variants of lymphocytopathic retroviruses from the peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with ARC or AIDS. *Journal of medical virology* **19**, 335-344 (1986).
255. Rulli, S.J., Jr., Hibbert, C.S., Mirro, J., Pederson, T., Biswal, S. & Rein, A. Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *J Virol* **81**, 6623-6631 (2007).
256. Russell, R.S., Hu, J., Beriault, V., Mouland, A.J., Laughrea, M., Kleiman, L., Wainberg, M.A. & Liang, C. Sequences downstream of the 5' splice donor site are required for both packaging and dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol* **77**, 84-96 (2003).
257. Russell, R.S., Hu, J., Laughrea, M., Wainberg, M.A. & Liang, C. Deficient dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA caused by mutations of the u5 RNA sequences. *Virology* **303**, 152-163 (2002).
258. Russell, R.S., Liang, C. & Wainberg, M.A. Is HIV-1 RNA dimerization a prerequisite for packaging? Yes, no, probably? *Retrovirology* **1**, 23 (2004).
259. Sakuragi, J., Iwamoto, A. & Shioda, T. Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **76**, 959-967 (2002).



260. Sakuragi, J., Shioda, T. & Panganiban, A.T. Duplication of the primary encapsidation and dimer linkage region of human immunodeficiency virus type 1 RNA results in the appearance of monomeric RNA in virions. *J Virol* **75**, 2557-2565 (2001).
261. Sakuragi, J., Ueda, S., Iwamoto, A. & Shioda, T. Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus type 1 genome RNA packaging. *J Virol* **77**, 4060-4069 (2003).
262. Salzwedel, K., Martin, D.E. & Sakalian, M. Maturation inhibitors: a new therapeutic class targets the virus structure. *AIDS reviews* **9**, 162-172 (2007).
263. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467 (1977).
264. Santiago, M.L., Range, F., Keele, B.F., Li, Y., Bailes, E., Bibollet-Ruche, F., Fruteau, C., Noe, R., Peeters, M., Brookfield, J.F., Shaw, G.M., Sharp, P.M. & Hahn, B.H. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercopithecus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* **79**, 12515-12527 (2005).
265. Sato, A.K., Viswanathan, M., Kent, R.B. & Wood, C.R. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr Opin Biotechnol* **17**, 638-642 (2006).
266. Scarlata, S. & Carter, C. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta* **1614**, 62-72 (2003).
267. Schambach, A., Mueller, D., Galla, M., Verstegen, M.M., Wagemaker, G., Loew, R., Baum, C. & Bohne, J. Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors. *Gene Ther* **13**, 1524-1533 (2006).
268. Schibli, D.J., Eband, R.F., Vogel, H.J. & Eband, R.M. Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions. *Biochem Cell Biol* **80**, 667-677 (2002).
269. Schmalzbauer, E., Strack, B., Dannull, J., Guehmann, S. & Moelling, K. Mutations of basic amino acids of NCp7 of human immunodeficiency virus type 1 affect RNA binding in vitro. *J Virol* **70**, 771-777 (1996).
270. Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R. & Bushman, F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521-529 (2002).
271. Schubert, U., Ott, D.E., Chertova, E.N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M.F., Bennink, J.R., Krausslich, H.G. & Yewdell, J.W. Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13057-13062 (2000).
272. Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S.F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**, 1569-1572 (1999).
273. Scott, J.K. Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem Sci* **17**, 241-245 (1992).
274. Sczakiel, G., Oppenlander, M., Rittner, K. & Pawlita, M. Tat- and Rev-directed antisense RNA expression inhibits and abolishes replication of human immunodeficiency virus type 1: a temporal analysis. *J Virol* **66**, 5576-5581 (1992).
275. Shaheen, F., Duan, L., Zhu, M., Bagasra, O. & Pomerantz, R.J. Targeting human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle. *J Virol* **70**, 3392-3400 (1996).
276. Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Ingmundson, A., Horner, S.M., Cicchetti, G., Allen, P.G., Pypaert, M., Cunningham, J.M. & Mothes, W. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**, 785-801 (2003).

277. Shubsda, M.F., Paoletti, A.C., Hudson, B.S. & Borer, P.N. Affinities of packaging domain loops in HIV-1 RNA for the nucleocapsid protein. *Biochemistry* **41**, 5276-5282 (2002).
278. Shuto, T., Sarkar, G., Bronk, J.T., Matsui, N. & Bolander, M.E. Osteoblasts express types I and II activin receptors during early intramembranous and endochondral bone formation. *J Bone Miner Res* **12**, 403-411 (1997).
279. Sidhu, S.S., Fairbrother, W.J. & Deshayes, K. Exploring protein-protein interactions with phage display. *Chembiochem* **4**, 14-25 (2003).
280. Sierra, S., Kupfer, B. & Kaiser, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* **34**, 233-244 (2005).
281. Skripkin, E., Paillart, J.C., Marquet, R., Blumenfeld, M., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. Mechanisms of inhibition of in vitro dimerization of HIV type I RNA by sense and antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* **271**, 28812-28817 (1996).
282. Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317 (1985).
283. Smith, G.P. & Petrenko, V.A. Phage Display. *Chem Rev* **97**, 391-410 (1997).
284. Soker, S., Gollamudi-Payne, S., Fidler, H., Charmahelli, H. & Klagsbrun, M. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem* **272**, 31582-31588 (1997).
285. Stevenson, M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* **9**, 853-860 (2003).
286. Sticht, J., Humbert, M., Findlow, S., Bodem, J., Muller, B., Dietrich, U., Werner, J. & Krausslich, H.G. A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 671-677 (2005).
287. Stitz, J., Buchholz, C.J., Engelstadter, M., Uckert, W., Bloemer, U., Schmitt, I. & Cichutek, K. Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* **273**, 16-20 (2000).
288. Stote, R.H., Kellenberger, E., Muller, H., Bombarda, E., Roques, B.P., Kieffer, B. & Mely, Y. Structure of the His44 --> Ala single point mutant of the distal finger motif of HIV-1 nucleocapsid protein: a combined NMR, molecular dynamics simulation, and fluorescence study. *Biochemistry* **43**, 7687-7697 (2004).
289. Sucheck, S.J., Greenberg, W.A., Tolbert, T.J. & Wong, C.H. Design of Small Molecules That Recognize RNA: Development of Aminoglycosides as Potential Antitumor Agents That Target Oncogenic RNA Sequences This work was supported by the NIH. We thank Professor Peter Voght for his suggestion of the oncogenic RNA sequences as targets. *Angew Chem Int Ed Engl* **39**, 1080-1084 (2000).
290. Sullenger, B.A., Gallardo, H.F., Ungers, G.E. & Gilboa, E. Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell* **63**, 601-608 (1990).
291. Sullenger, B.A., Gallardo, H.F., Ungers, G.E. & Gilboa, E. Analysis of trans-acting response decoy RNA-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transactivation. *J Virol* **65**, 6811-6816 (1991).
292. Sullenger, B.A. & Gilboa, E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature* **418**, 252-258 (2002).
293. Summers, M.F., Henderson, L.E., Chance, M.R., Bess, J.W., Jr., South, T.L., Blake, P.R., Sagi, I., Perez-Alvarado, G., Sowder, R.C., 3rd, Hare, D.R. & et al. Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci* **1**, 563-574 (1992).
294. Swanson, C.M. & Malim, M.H. Retrovirus RNA trafficking: from chromatin to invasive genomes. *Traffic* **7**, 1440-1450 (2006).

295. Szardenings, M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *Journal of receptor and signal transduction research* **23**, 307-349 (2003).
296. Tanchou, V., Decimo, D., Pechoux, C., Lener, D., Rogemond, V., Berthoux, L., Ottmann, M. & Darlix, J.L. Role of the N-terminal zinc finger of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein in virus structure and replication. *J Virol* **72**, 4442-4447 (1998).
297. Tang, C., Loeliger, E., Kinde, I., Kyere, S., Mayo, K., Barklis, E., Sun, Y., Huang, M. & Summers, M.F. Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein. *J Mol Biol* **327**, 1013-1020 (2003).
298. Taube, R., Fujinaga, K., Wimmer, J., Barboric, M. & Peterlin, B.M. Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation. *Virology* **264**, 245-253 (1999).
299. Teunissen, S.W., Stassen, M.H., Pruijn, G.J., van Venrooij, W.J. & Hoet, R.M. Characterization of an anti-RNA recombinant autoantibody fragment (scFv) isolated from a phage display library and detailed analysis of its binding site on U1 snRNA. *Rna* **4**, 1124-1133 (1998).
300. Thomas, J.A., Gagliardi, T.D., Alvord, W.G., Lubomirski, M., Bosche, W.J. & Gorelick, R.J. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zinc-finger mutations cause defects in reverse transcription and integration. *Virology* **353**, 41-51 (2006).
301. Tisne, C., Roques, B.P. & Dardel, F. The annealing mechanism of HIV-1 reverse transcription primer onto the viral genome. *J Biol Chem* **279**, 3588-3595 (2004).
302. Tripathi, S., Chaubey, B., Barton, B.E. & Pandey, V.N. Anti HIV-1 virucidal activity of polyamide nucleic acid-membrane transducing peptide conjugates targeted to primer binding site of HIV-1 genome. *Virology* (2007).
303. Tummino, P.J., Harvey, P.J., McQuade, T., Domagala, J., Gogliotti, R., Sanchez, J., Song, Y. & Hupe, D. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein zinc ejection activity of disulfide benzamides and benzisothiazolones: correlation with anti-HIV and virucidal activities. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 394-400 (1997).
304. Tummino, P.J., Scholten, J.D., Harvey, P.J., Holler, T.P., Maloney, L., Gogliotti, R., Domagala, J. & Hupe, D. The in vitro ejection of zinc from human immunodeficiency virus (HIV) type 1 nucleocapsid protein by disulfide benzamides with cellular anti-HIV activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 969-973 (1996).
305. Turner, B.G. & Summers, M.F. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**, 1-32 (1999).
306. Turner, J.J., Ivanova, G.D., Verbeure, B., Williams, D., Arzumanov, A.A., Abes, S., Lebleu, B. & Gait, M.J. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic Acids Res* **33**, 6837-6849 (2005).
307. Turner, K.B., Hagan, N.A. & Fabris, D. Inhibitory effects of archetypical nucleic acid ligands on the interactions of HIV-1 nucleocapsid protein with elements of Psi-RNA. *Nucleic Acids Res* **34**, 1305-1316 (2006).
308. Turner, K.B., Hagan, N.A. & Fabris, D. Understanding the isomerization of the HIV-1 dimerization initiation domain by the nucleocapsid protein. *J Mol Biol* **369**, 812-828 (2007).
309. Turner, K.B., Hagan, N.A., Kohlway, A.S. & Fabris, D. Mapping noncovalent ligand binding to stemloop domains of the HIV-1 packaging signal by tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **17**, 1401-1411 (2006).
310. Turpin, J.A., Song, Y., Inman, J.K., Huang, M., Wallqvist, A., Maynard, A., Covell, D.G., Rice, W.G. & Appella, E. Synthesis and biological properties of novel pyridinioalkanoyl thioesters (PATE) as anti-HIV-1 agents that target the viral nucleocapsid protein zinc fingers. *J Med Chem* **42**, 67-86 (1999).

311. Turpin, J.A., Terpening, S.J., Schaeffer, C.A., Yu, G., Glover, C.J., Felsted, R.L., Sausville, E.A. & Rice, W.G. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 zinc fingers prevent normal processing of gag precursors and result in the release of noninfectious virus particles. *J Virol* **70**, 6180-6189 (1996).
312. Ulrich, H., Trujillo, C.A., Nery, A.A., Alves, J.M., Majumder, P., Resende, R.R. & Martins, A.H. DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **9**, 619-632 (2006).
313. Vandevelde, M., Witvrouw, M., Schmit, J.C., Sprecher, S., De Clercq, E. & Tassinon, J.P. ADA, a potential anti-HIV drug. *AIDS research and human retroviruses* **12**, 567-568 (1996).
314. Vigna, E. & Naldini, L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* **2**, 308-316 (2000).
315. Vives, E., Brodin, P. & Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* **272**, 16010-16017 (1997).
316. Vivet-Boudou, V., Didierjean, J., Isel, C. & Marquet, R. Nucleoside and nucleotide inhibitors of HIV-1 replication. *Cell Mol Life Sci* **63**, 163-186 (2006).
317. von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.P., Cimbara, D.M., Scott, A., Krausslich, H.G., Kaplan, J., Morham, S.G. & Sundquist, W.I. The protein network of HIV budding. *Cell* **114**, 701-713 (2003).
318. Vuilleumier, C., Bombarda, E., Morellet, N., Gerard, D., Roques, B.P. & Mely, Y. Nucleic acid sequence discrimination by the HIV-1 nucleocapsid protein NCp7: a fluorescence study. *Biochemistry* **38**, 16816-16825 (1999).
319. Wang, S., Huber, P.W., Cui, M., Czarnik, A.W. & Mei, H.Y. Binding of neomycin to the TAR element of HIV-1 RNA induces dissociation of Tat protein by an allosteric mechanism. *Biochemistry* **37**, 5549-5557 (1998).
320. Wang, S.W. & Aldovini, A. RNA incorporation is critical for retroviral particle integrity after cell membrane assembly of Gag complexes. *J Virol* **76**, 11853-11865 (2002).
321. Warrilow, D. & Harrich, D. HIV-1 replication from after cell entry to the nuclear periphery. *Current HIV research* **5**, 293-299 (2007).
322. Weiss, M.A. & Narayana, N. RNA recognition by arginine-rich peptide motifs. *Biopolymers* **48**, 167-180 (1998).
323. Welsch, S., Keppler, O.T., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J. & Krausslich, H.G. HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS pathogens* **3**, e36 (2007).
324. Williamson, J.R. Induced fit in RNA-protein recognition. *Nat Struct Biol* **7**, 834-837 (2000).
325. Wu, Y. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* **1**, 13 (2004).
326. Zeffman, A., Hassard, S., Varani, G. & Lever, A. The major HIV-1 packaging signal is an extended bulged stem loop whose structure is altered on interaction with the Gag polyprotein. *J Mol Biol* **297**, 877-893 (2000).
327. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L. & Trono, D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15**, 871-875 (1997).
328. Zybarth, G. & Carter, C. Domains upstream of the protease (PR) in human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol influence PR autoprocessing. *J Virol* **69**, 3878-3884 (1995).

## 5.2 Eigene Veröffentlichungen

### 5.2.1 Publikationen

Pustowka, A., Dietz, J., Ferner, J., Baumann, M., Landersz, M., Konigs, C., Schwalbe, H., Dietrich, U. Identification of peptide ligands for target RNA structures derived from the HIV-1 packaging signal Psi by screening phage-displayed peptide libraries. *ChemBioChem* **4**: 1093-1097 (2003)

Dietz, J., Koch, J., Kaur, A., Raja, C., Stein, S., Grez, M., Pustowka, A., Mensch, S., Ferner, J., Möller, L., Bannert, N., Tampé, R., Divita, G., Mely, Y., Schwalbe, H., Dietrich, U. Inhibition of HIV-1 by a peptide ligand of the genomic RNA packaging signal psi. *ChemMedChem*: in Druck (2008)

### 5.2.2 Posterpräsentationen

**2004** Annual Meeting of the Society of Virology GfV/SIV, Tübingen, Germany  
*Anette Pustowka, Julia Dietz, Margot Landersz, Michael Baumann, Jan Ferner, Harald Schwalbe, Ursula Dietrich*  
Identification of peptide ligands for the packaging structure PSI of HIV-1

**2005** Annual Meeting of the Society of Virology GfV, Hannover, Germany  
*Julia Dietz, Anette Pustowka, Efim Borodowski, Margot Landersz, Michaela Stoll, Sarah Mensch, Manuel Grez, Harald Schwalbe, Ursula Dietrich*  
Selection and functional characterization of peptide ligands for complex RNA-structures from phage displayed peptide libraries

- 2006** Annual Meeting of the Society of Virology GfV, München, Germany  
*Julia Dietz, Anette Pustowka, Ajit Kaur, Joachim Koch, Sarah Mensch, Stefan Stein, Manuel Grez, Gilles Divita, Yves Mély, Harald Schwalbe, Ursula Dietrich*  
Intracellular delivery and functional characterization of peptide ligands for the HIV-1 packaging signal PSI
- 2007** 3<sup>rd</sup> European Congress of Virology (Annual Meeting of the Society of Virology GfV), Nürnberg, Germany  
*Julia Dietz, Anette Pustowka, Ajit Kaur, Joachim Koch, Stefan Stein, Manuel Grez, Gilles Divita, Yves Mély, Harald Schwalbe, Ursula Dietrich*  
Intracellular delivery and functional characterization of peptide ligands for the HIV-1 packaging signal PSI
- 2007** RNA-Ligand-Interactions, Frankfurt, Germany  
*Julia Dietz, Anette Pustowka, Ajit Kaur, Joachim Koch, Stefan Stein, Manuel Grez, Gilles Divita, Yves Mély, Harald Schwalbe, Ursula Dietrich*  
Intracellular delivery and functional characterization of peptide ligands for the HIV-1 packaging signal PSI

### 5.2.3 Vorträge

- 2006** XVI International AIDS Conference, Toronto, Kanada  
*Julia Dietz, Anette Pustowka, Ajit Kaur, Joachim Koch, Sarah Mensch, Stefan Stein, Manuel Grez, Gilles Divita, Yves Mély, Harald Schwalbe, Ursula Dietrich*  
Optimization and antiviral analysis of peptide ligands for the HIV-1 packaging signal PSI

## 6 Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
A	Adenin
A	Absorption
A (Ala)	Alanin
Abb.	Abbildung
AIDS	Erworbene Immunschwäche (acquired immunodeficiency syndrome)
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARM	Arginine rich motifs
AS	Aminosäure/n
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
bp	Basenpaar(e) (base pairs)
C (Cys)	Cystein
CA	Kapsidprotein
CCR5	CC-Chemokinrezeptor 5
CD4	T-Zell Rezeptor 4
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CLSM	Konfokale Laser-Rastermikroskopie (confocal laser scanning microscope)
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CXCR5	CX-Chemokinrezeptor
D (Asp)	Asparaginsäure
d	Desoxy
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
dd	Dideoxy
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5´-Triphosphat
ddNTP	Dideoxynukleotidtriphosphat

---

ds	doppelsträngig (double stranded)
E (Glu)	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay (enzyme-linked immunosorbent assay)
Em	Emission
Env	Hüllprotein (envelope)
ER	endoplasmatisches Reticulum
ESI-FMST	electrospray ionization-fourier transform mass spectrometry
EtBr	Ethidiumbromid
F (Phe)	Phenylalanin
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
G (Gly)	Glycin
G	Guanin
g	Gramm
g	Zentrifugalkraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gag	Gruppenspezifisches Antigen (group specific antigen)
GaLV	gibbon ape leukemia virus
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
gp	Glykoprotein
H (His)	Histidin
h	Stunde(n)
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie (highly active anti-retroviral therapy)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horse-radish-peroxidase)
I (Ile)	Isoleucin
IC	Inhibitionskonzentration (inhibition of concentration)
IgG	Immunglobulin G
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid



---

IU	Infektiöse Einheiten (infectious units)
K (Lys)	Lysin
kb	Kilobasen
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
L (Leu)	Leucin
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LTR	long terminal repeat
LU	Lichteinheit (light unit)
M (Met)	Methionin
M	Molar
MA	Matrixprotein
MAGI	multinuclear-activation-of-galactosidase-indicator
MESV	Mouse embryonic stem cell virus
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity)
mg	Miligramm
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MLV	Murines Leukämievirus (murine leukemia virus)
mM	Milimolar
MOI	multiplicity of infection
MoMLV	Moloney MLV
MV	Millivolt
N (Asn)	Asparagin
Nef	negative factor
NC	Nukleokapsidprotein
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
P (Pro)	Prolin
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)

---

PBS	Primer Bindungsstelle (primer binding site)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PIC	Präintegrationskomplex (preintegration-complex)
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Pikomol
Pol	Polymerase
PR	Protease
PSI ( $\Psi$ )	HIV-1 Verpackungssignal
Q (Gln)	Glutamin
R (Arg)	Arginin
Rev	regulator of expression of viral proteins
RFP	Rot fluoreszierendes Protein (red fluorescent protein)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RRE	rev responsive element
RT	Reverse Transkriptase
S (Ser)	Serin
s	Sekunde(n)
scFv	single chain fragment variable
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIN	selbstinaktivierend
siRNA	small interfering RNA
SIV	Simian Immundefizienz Virus
SFFV	spleen focus forming virus
SL	Stemloop-Struktur
SU	Oberflächeneinheit (surface unit)
ss	einzelsträngig (single stranded)
T (Thr)	Threonin
Tab.	Tabelle
TAE	Trisacetat-Puffer
TAR	tat-responsive RNA-element
Tat	transactivator of viral transcription
tdu	Transduzierende Einheiten (transducing units)
TEMED	NNN´N´ Tetramethylethylendiamin

T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TM	Transmembraneinheit (transmembran unit)
tRNA	transfer-RNA
U	Uracil
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V (Val)	Valin
V	Volt
Vif	viral infectivity factor
Vpr	Virusprotein r (viral protein r)
Vpu	Virusprotein u (viral protein u)
VSV.G	vesicular stomatitis virus glycoprotein
W (Trp)	Tryptophan
WPRE	woodchuck hepatitis virus postregulatory element
Y (Tyr)	Tyrosin
Zn	Zink
∞	unendlich
°C	Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als Doktorandin am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Ursula Dietrich. Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Groner für die Möglichkeit, diese Arbeit am Georg-Speyer-Haus anfertigen zu können. Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz für die freundliche Betreuung seitens der Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ursula Dietrich, die durch ihre Erfahrung auf dem Gebiet der HIV-Forschung und der Auswahl meines Dissertationsthemas die Erstellung dieser Arbeit ermöglichte. Für das interessante Projekt, die fachliche Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre danke ich ihr ganz herzlich.

Herrn Prof. Dr. Harald Schwalbe danke ich für die Möglichkeit im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 579 mit einer Vielzahl von Wissenschaftlern auf dem Gebiet der Forschung an RNA-Liganden-Wechselwirkungen zusammenzuarbeiten.

Für die interne Betreuung der Doktorarbeit am Georg-Speyer-Haus bedanke ich mich bei Herrn Dr. Manuel Grez und Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Georg-Speyer-Hauses sowie insbesondere bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dietrich bedanken, die durch die freundschaftliche Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank an Dr. Anette Pustowka für die verständnisvolle Einarbeitung in mein Thema. Bei Sascha Antoni und Dr. Michael Humbert bedanke ich mich für die tolle, kollegiale Zeit sowie für zahlreiche wertvolle Anregungen. Ein Dankschön an Dr. Stefan Stein und Dr. Felix Hermann für viele hilfreiche Denkanstöße und für ihre Diskussionsbereitschaft sowie an Margot Landersz, Michaela Stoll und Hana Kunkel für ihre tatkräftige Unterstützung .

Boris Brill danke ich besonders für seine Geduld und das Korrekturlesen der Arbeit.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, bei meiner Schwester und bei meiner Großmutter für ihre Unterstützung und die Ermutigungen bedanken.

# Lebenslauf

**Name:** Julia Dietz  
**Anschrift:** Röternstraße 3  
61137 Schöneck  
**Telefon:** 0178-458 17 97  
**eMail:** julia-dietz@web.de  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch  
**Geburtsdatum:** 21. Juni 1978  
**Geburtsort:** Bad Homburg v. d. Höhe

## Schulbildung

---

**1984 - 1988** Grundschule, Kilianstädten/Schöneck  
**1988 - 1997** Georg-Büchner-Gymnasium, Bad Vilbel

## Hochschulbildung

---

**10/1997 – 11/1999** Grundstudium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main  
**11/1999** Vordiplom  
**11/1999 – 09/2002** Hauptstudium der Biologie in dem Schwerpunktfach Genetik und in den Fächern Mikrobiologie sowie Zell- und Entwicklungsbiologie  
**09/2002** Diplomprüfung  
**10/2002 – 06/2003** Diplomarbeit: "Selektion von Peptidliganden für RNA-Strukturen des HIV-1 Verpackungssignals  $\Psi$  aus Phagen-assoziierten Peptidbanken"  
Arbeitsgruppe Dr. Ursula Dietrich, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main  
**06/2003** Abschluss: Diplom-Biologin  
**Seit 09/2003** Doktorarbeit: „Funktionelle Charakterisierung von Peptidliganden für das komplexe HIV-1 RNA-Verpackungssignal  $\Psi$ “  
Arbeitsgruppe Dr. Ursula Dietrich, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main

## **Stipendien**

---

**2006** GlaxoSmithKline, Reiestipendium

## **Praktische Tätigkeiten**

---

**12/1999-02/2000** Praktikum: Biologische Qualitätskontrolle, Fresenius Kabi Dt. GmbH, Friedberg

**02/2002-04/2002** Praktikum: Protein Production & Engineering, Aventis Pharma Dt. GmbH, Frankfurt/Main

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main,

---

Julia Dietz

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Funktionelle Charakterisierung von Peptidliganden für das komplexe HIV-1 RNA-Verpackungssignal  $\Psi$ “ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main,

---

Julia Dietz

*Zu wissen, was man weiß,  
und zu wissen, was man tut,  
das ist Wissen.*

Konfuzius (551 – 479 v. Chr.)