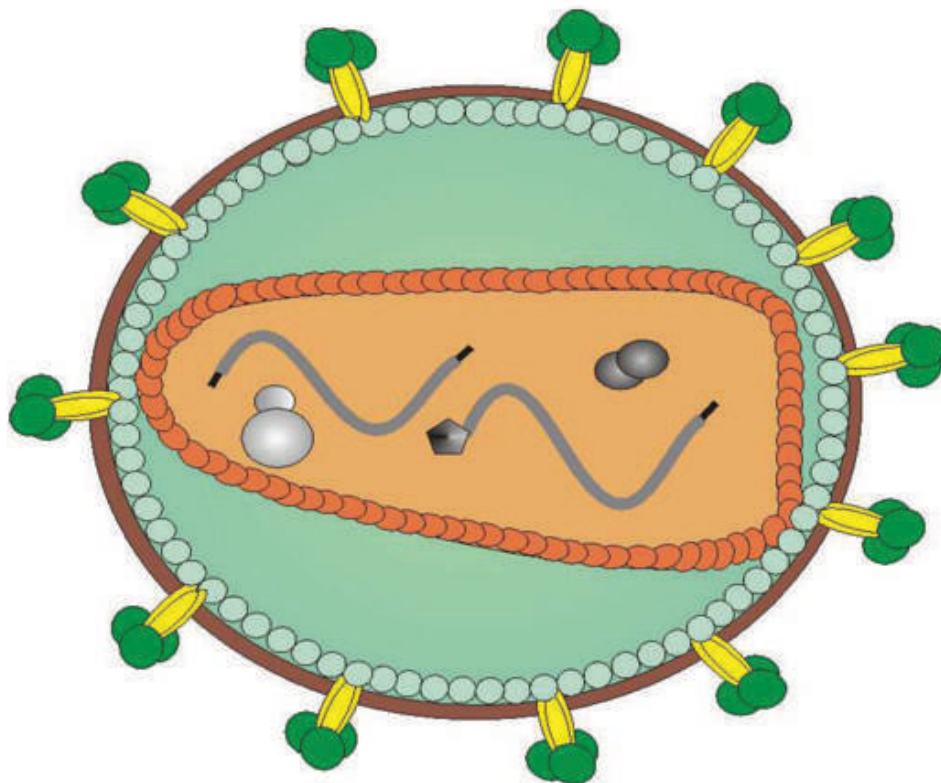


**Kai Lieder**

---

**Interface-Peptide der viralen Protease von HIV-1  
als gentherapeutisch einsetzbare  
antivirale Substanzen**

---



**Cuvillier Verlag Göttingen**

---

**Interface-Peptide der viralen Protease von HIV-1  
als gentherapeutisch einsetzbare  
antivirale Substanzen**

---

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Kai Lieder  
aus Wolfenbüttel

Göttingen 2002

## **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2003  
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2002  
ISBN 3-89873-692-X

D 7

Referent: Prof. Dr. W. Liebl  
Korreferent: Prof. Dr. W. Engel  
Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2003

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2003  
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen  
Telefon: 0551-54724-0  
Telefax: 0551-54724-21  
[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2003  
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-692-X



Sei wie ein Leuchtturm in der Nacht  
sende Licht ins Dunkel  
zeig dem Reisenden die Richtung  
nicht den Weg!

K.G.B.

*Für die Leuchttürme meines Lebens!*

---



---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>		<b>Seite</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	HIV/AIDS: Ursache und Wirkung	1
1.2	Genomstruktur und Morphologie von HIV-1	2
1.3	Viraler Replikationszyklus	4
1.4	Therapie	7
1.5	Neue Therapieformen	8
1.6	Protease als therapeutisches Ziel	10
1.7	Aufgabenstellung	12
<b>2.</b>	<b>Material</b>	<b>14</b>
2.1	Chemikalien	14
2.2	Puffer und Medien	14
2.3	<i>E. coli</i> -Stamm	15
2.4	Vektoren	16
2.5	Zelllinien	17
2.6	Oligonukleotide	17
2.7	Antisera und Antikörper	18
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Kultivierung eukaryotischer Zellen</b>	<b>19</b>
3.1.1	Kultivierung von COS-7 Zellen	19
3.1.2	Kultivierung von LC-5 Zellen	19
3.1.3	Kultivierung von MT-2 Zellen	20
3.1.4	Bestimmung der Lebendzellzahl	20
3.1.5	Lagerung der Zellkulturen / Passagen	21
<b>3.2</b>	<b>Protein-biochemische Methoden</b>	<b>22</b>
3.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
3.2.2	Proteinfärbung mit Coomassie Blue	23
3.2.3	Western-Blot zum Proteinnachweis	24
3.2.4	X-Gal-Färbung	26
3.2.5	Virusernte aus dem Überstand kotransfizierter Zellen	27
3.2.6	Zelllyse kotransfizierter LC-5 Zellen	27

	<b>Seite</b>
<b>3.3</b>	<b>Verwendete Transfektionsmethoden</b> <b>28</b>
3.3.1	Transfektion nach der DEAE-Dextranmethode 28
3.3.2	Transfektion von LC-5 Zellen mittels Effectene <sup>®</sup> 28
<b>3.4</b>	<b>Molekulargenetische Methoden</b> <b>29</b>
3.4.1	Agarose-Gelelektrophorese 29
3.4.2	Minipräparation von Plasmid-DNA 30
3.4.3	Midipräparation von Plasmid-DNA 31
3.4.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 32
3.4.5	Präzipitation von DNA-Fragmenten mit Ethanol oder Isopropanol 33
3.4.6	Bestimmung der DNA-Konzentration 33
3.4.7	Präparation transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen 34
3.4.8	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ 34
3.4.9	Bestimmung der optischen Dichte 35
3.4.10	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen 35
3.4.11	Ligation von DNA-Fragmenten 35
3.4.12	Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung 36
3.4.13	Methoden der Polymerase Kettenreaktion (PCR) 37
3.4.14	PCR-Technik mit Plasmid-DNA 38
<b>3.5</b>	<b>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</b> <b>39</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> <b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Interface-Peptide und die Wirkung auf HIV-1</b> <b>40</b>
4.1.1	Verwendete Interface-Peptid exprimierende Vektoren 40
4.1.2	Inhibitorische Wirkung intrazellulär exprimierter Interface-Peptide in COS-7 Zellen 43
4.1.2.1	X-Gal Färbung zur Überprüfung der Kotransfektion 44
4.1.2.2	Antivirale Effekt der Interface-Peptide in COS-7 Zellen 45
4.1.2.3	Untersuchung der Lebendzellzahl nach Kotransfektion 48
4.1.3	Wirksamkeit der Interface-Peptide gegen HIV-1 in CD4 <sup>+</sup> LC-5 Zellen 49
4.1.3.1	Antiviraler Effekt von Interface-Peptiden in LC-5 Zellen 50
4.1.4	Einfluss der proviralen DNA-Konzentration auf den antiviralen Effekt der Interface-Peptide in COS-7 Zellen 52
4.1.5	Infektiösität von Virionen aus dem Überstand kotransfizierter LC-5 Zellen 55

	<b>Seite</b>	
4.1.6	Analyse des p24/p55 Verhältnisses in Viruspartikeln	57
4.1.6.1	Analyse der Virionen aus dem Zellkulturüberstand transfizierter COS-7 Zellen	58
4.1.6.2	Analyse der Virionen aus dem Zellkulturüberstand transfizierter LC-5 Zellen	60
<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen zur Verpackung intrazellulär exprimierter nicht-viraler Proteine</b>	<b>62</b>
4.2.1	Herstellung der Expressionsplasmide	62
4.2.2	Untersuchung zur Expression der EGF-Proteine	66
4.2.2.1	Expressionsnachweis der verschiedenen EGF-Proteine mittels Western-Blot	68
4.2.3	Nachweis der Lokalisation von EGF-Proteinen in kotransfizierten LC-5 Zellen und Viruspartikeln	71
4.2.3.1	Lokalisation von EGF-Proteinen in der Zytosolfraction kotransfizierter LC-5 Zellen	72
4.2.6	Lokalisation von EGF-Proteinen in der Membranfraction kotransfizierter LC-5 Zellen	75
4.2.6	Viruspartikel aus dem Zellkulturüberstand	80
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
5.1	Interface-Peptide als antivirale Substanzen	86
5.2	Antivirale Effekte der Interface-Peptide gegen HIV-1 in COS-7 Zellen	87
5.3	Kotransfektionsexperimente mit der CD4 <sup>+</sup> LC-5 Zelllinie	88
5.4	Kotransfektion von COS-7 Zellen mit erhöhter pNL4-3 Menge	89
5.5	Auswirkung der Interface-Peptidsequenz auf den antiviralen Effekt	90
5.6.	Untersuchung des antiviralen Effekts	93
5.7	Der antivirale Effekt der Interface-Peptide	94
5.8	Gezielte Verpackung nicht-viraler Proteine in HIV-1	95
5.9	Einfluss der viralen <i>leader</i> -Sequenz auf die Lokalisation von EGFP	99
5.10	Virale <i>leader</i> -Sequenz zur Verpackung nicht-viraler Proteine in HI-Virionen	101
5.11	Ausblick	101
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>105</b>
Anhang		118



---

**Verzeichnis der Abbildungen**

	<b>Seite</b>
<b>Abb. 1</b>	<b>Genomaufbau von HIV-1</b> <span style="float: right;"><b>3</b></span>
<b>Abb. 2</b>	<b>Schematischer Aufbau des Humanen Immundefizienz Virus 1</b> <span style="float: right;"><b>5</b></span>
<b>Abb. 3</b>	<b>Schematische Darstellung der Herstellung der peptidkodierenden Vektoren</b> <span style="float: right;"><b>41</b></span>
<b>Abb. 4</b>	<b>Schematische Darstellung der exprimierten <math>\beta</math>-Gal-Fusionsproteine mit Interface-Peptid</b> <span style="float: right;"><b>42</b></span>
<b>Abb. 5</b>	<b>X-Gal-Färbung von COS-7 Zellen zum Nachweis der <math>\beta</math>-Gal-Fusionsprotein Expression</b> <span style="float: right;"><b>45</b></span>
<b>Abb. 6</b>	<b>Prozentualer Gehalt an p24 im Zellkulturüberstand transfizierter COS-7 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>46</b></span>
<b>Abb. 7</b>	<b>Lebendzellzahl transfizierter COS-7 Zellen am dritten Tag nach der Transfektion</b> <span style="float: right;"><b>49</b></span>
<b>Abb. 8</b>	<b>Prozentualer p24-Gehalt im Zellkulturüberstand kotransfizierter LC-5 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>51</b></span>
<b>Abb. 9</b>	<b>Prozentualer p24-Gehalt kotransfizierter COS-7 Zellen nach 72 h</b> <span style="float: right;"><b>53</b></span>
<b>Abb. 10</b>	<b>Riesenzellbildung in MT-2 Kulturen nach Infektion mit Überständen kotransfizierter LC-5 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>56</b></span>
<b>Abb. 11</b>	<b>Western-Blot mit Viren aus Überständen transfizierter COS-7 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>59</b></span>
<b>Abb. 12</b>	<b>Western-Blot mit Überständen kotransfizierter LC-5 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>60</b></span>
<b>Abb. 13</b>	<b>Klonierungsschritte zur Herstellung des Gag<sup>Ap6</sup>-EGFP Expressionsplasmids</b> <span style="float: right;"><b>64</b></span>
<b>Abb. 14</b>	<b>Vektorkarten der verwendeten Plasmide</b> <span style="float: right;"><b>66</b></span>
<b>Abb. 15</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transfizierter LC-5 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>67</b></span>
<b>Abb. 16</b>	<b>Western-Blot zum Nachweis der Expression der EGF-Proteine in LC-5 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>69</b></span>
<b>Abb. 17</b>	<b>Western-Blot mit Zellkulturüberständen transfizierter LC-5 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>70</b></span>
<b>Abb. 18</b>	<b>Anti-EGFP Western-Blot der Zytosolfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>73</b></span>
<b>Abb. 19</b>	<b>Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum der Zytosolfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>74</b></span>
<b>Abb. 20</b>	<b>Anti-EGFP Western-Blot der Membranfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>76</b></span>
<b>Abb. 21</b>	<b>Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum der Membranfraktionen kotransfizierter LC-5 Zellen</b> <span style="float: right;"><b>78</b></span>
<b>Abb. 22</b>	<b>Anti-EGFP Western-Blot</b> <span style="float: right;"><b>81</b></span>
<b>Abb. 23</b>	<b>Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum</b> <span style="float: right;"><b>82</b></span>
<b>Abb. 24</b>	<b>Sequenzvergleich der Interface-Peptide</b> <span style="float: right;"><b>91</b></span>
<b>Abb. 25</b>	<b>Sequenzvergleich von PI 12 und PI 17</b> <span style="float: right;"><b>91</b></span>
<b>Abb. 26</b>	<b>Sequenzvergleich verschiedener Interface-Peptide</b> <span style="float: right;"><b>92</b></span>
<b>Abb. 27</b>	<b>Schema der Prozessierung von Gag und Gag-Pol mit der Modellvorstellung des Gag-Fusionsproteins</b> <span style="float: right;"><b>97</b></span>

---

---

**Verzeichnis der Tabellen**

	<b>Seite</b>	
<b>Tab. 1</b>	<b>Ziele neuer antiviraler Substanzen</b>	<b>9</b>
<b>Tab. 2</b>	<b>Puffer und Medien</b>	<b>14</b>
<b>Tab. 3</b>	<b>Verwendeter Bakterienstamm</b>	<b>15</b>
<b>Tab. 4</b>	<b>Verwendete Plasmide</b>	<b>16</b>
<b>Tab. 5</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>17</b>
<b>Tab. 6</b>	<b>Verwendete Primer</b>	<b>17</b>
<b>Tab. 7</b>	<b>Antisera und Antikörper</b>	<b>18</b>
<b>Tab. 8</b>	<b>Kodierende Abschnitte der Interface-Peptid-exprimierenden Vektoren</b>	<b>43</b>
<b>Tab. 9</b>	<b>Antivirale Effekte gegen HIV-1 nach Kotransfektion in COS-7</b>	<b>90</b>

---

## Verzeichnis der Abkürzungen

<b>Abkürzungen</b>	<b>Bedeutung</b>
Abb.	Abbildung
AIDS	Erworbenes Immunschwachesyndrom (engl.: acquired immunodeficiency syndrome)
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco's modified Egel's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzymgekoppelter Immunbindungstest (engl.: Enzyme-linked immunosorbent assay)
FCS	fötale Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
g	Gramm
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (engl.: hour)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
k	kilo
kDa	Kilodalton
l	Liter
LTR	lange endständig wiederholte Sequenz (engl.: long terminal repeat)
m	milli
M	mol pro Liter
MG	Molekulargewicht
min	Minute

mol	$6 \times 10^{23}$ Teilchen
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger-RNA)
$\mu$	mikro
n	nano
nm	nanometer
OD	Optische Dichte
p	Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der $H^+$ -Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecylsulphate)
sec	Sekunde
ssDNA	Einzelstrang-DNA (engl.: single-strand DNA)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Bohrsäure-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Einheit (engl.: unit)
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WB	Western Blot
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: weight per volume)
x g	x-fache Erdbeschleunigung



## 1. Einleitung

AIDS ist auch im 21. Jahrhundert eine ernste Bedrohung für die Menschheit. Nach Daten der UNAIDS lebten 2001 40 Millionen Menschen mit HIV oder zeigten AIDS Symptome. Allein im Jahr 2001 starben 3 Millionen Menschen an den Folgen der HIV-Infektion und 5 Millionen infizierten sich mit HIV-1. Über 95 % der Infizierten leben in den sogenannten Entwicklungsländern.

### 1.1 HIV/AIDS: Ursache und Wirkung

1981 wurden bei klinischen Untersuchungen junger, homosexueller Männer Häufungen sonst seltener Krankheitserscheinungen festgestellt. Diese waren der erste Hinweis auf eine neue, bis dahin unbekannte Krankheit. Die Erkrankten litten unter opportunistischen Infektionen, wie zum Beispiel Lungenentzündungen, ausgelöst durch *Pneumocystis carinii* (Gottlieb et al., 1981) oder an Infektionen verursacht durch Erreger aus dem *Mycobacterium avium*-Komplex (Zakowski et al., 1982; Greene et al., 1982). Häufig zeigte sich auch ein Gefäßtumor der Haut, der Kaposi-Tumor (Friedmann-Kien, 1981). Diese Erkrankung war bei jungen Menschen sonst recht selten. Die untersuchten jungen Männer zeigten einen starken Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. Aufgrund dieses Verlustes hatten sie keine dauerhaft effiziente antivirale Immunabwehr mehr (Gottlieb et al., 1981; Masur et al., 1981; Siegal et al., 1981; Ammann et al., 1983). Dieses Krankheitsbild wurde 1982 vom "Centers for Disease Control" (CDC, USA) als AIDS (acquired immunodeficiency syndrom) bezeichnet. Nicht nur Homosexuelle litten an der erworbenen Immunschwäche (AIDS), sondern auch Empfänger von Bluttransfusionen und Blutpräparaten, Spritzen benutzende Drogenabhängige und Neugeborene von Müttern mit AIDS (CDC, 1982a, b, c, d). 1983 wurden erste experimentelle Beweise für einen Zusammenhang zwischen einer Retrovirusinfektion und AIDS veröffentlicht. Am Pariser Pasteur Institut war es gelungen, ein neues Retrovirus zu isolieren, welches als LAV (lymphadenopathy-associated virus) bezeichnet wurde (Barre-Sinoussi et al., 1983). 1984 isolierten Wissenschaftler am NIH (National Institutes of Health) ein zytopathisch, T-Zell lymphotropes Virus aus AIDS-Patienten und Gesunden, die später an AIDS erkrankten (Gallo et al., 1984). Dieses Virus wurde als HTLV-III (human

T-lymphotropic virus type III) bezeichnet. Zur gleichen Zeit isolierten Wissenschaftler in San Francisco ein Retrovirus aus AIDS-Patienten, dem sie den Namen „AIDS-associated retrovirus“ (ARV) gaben (Levy et al., 1984).

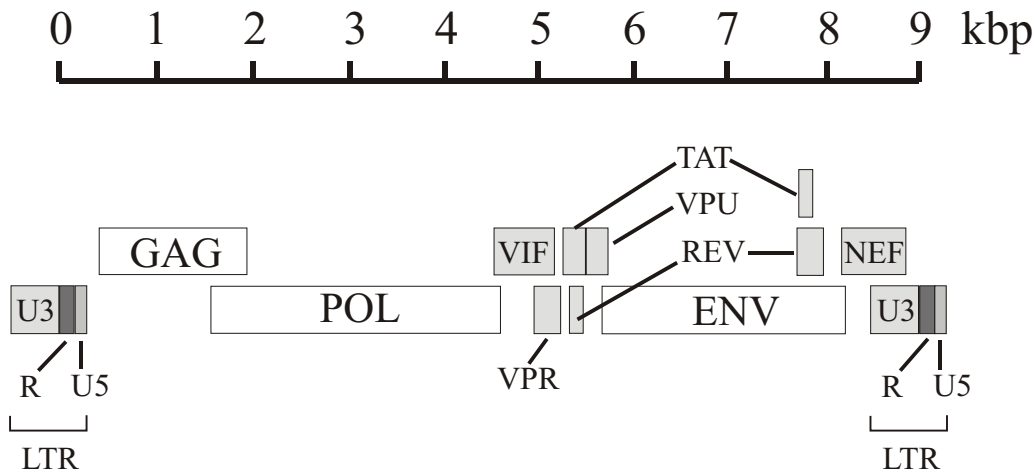
Nukleotidsequenz-Analysen von HTLV-III, LAV and ARV zeigten eine große Übereinstimmung zwischen den Isolaten, die demnach unabhängige Isolate des gleichen Virus waren (Wain-Hobson et al., 1985; Hahn et al., 1984; Ratner et al., 1985; Sanchez-Pescador et al., 1985). Vom International Committee of Viral Taxonomy wurden sie als „human immunodeficiency virus“ (HIV) zusammengefasst (Coffin et al., 1986).

1986 wurde in West-Afrika ein weiteres humanes Immundefizienzvirus isoliert (Clavel et al., 1986). Das Isolat unterschied sich sowohl in der serologischen Reaktivität als auch in der Genomstruktur (Clavel et al., 1986a) von HIV-1 und wurde HIV-2 genannt. HIV-1 und HIV-2 verursachen ein vergleichbares Spektrum an Erkrankungen, jedoch ist der Zeitraum von der Infektion bis zur Ausbildung des Krankheitsbildes AIDS bei einer Infektion mit HIV-2 deutlich länger (Dufort et al., 1988; Pepin et al., 1991).

## 1.2 Genomstruktur und Morphologie von HIV-1

Das HIV-1 Genom weist drei offene Leserahmen auf: *gag*, *pol* und *env*. Der *gag*-Leserahmen kodiert für das 55 kDa Vorläuferprotein (Gag: group-specific antigen) aus dem die Hauptstrukturproteine des Virus prozessiert werden: Matrixprotein (MA), Kapsidprotein (CA), Nukleokapsidprotein (NC) und Protein p6 (Gowda et al., 1989; Kaplan et al., 1991). Der Leserahmen *pol* kodiert für die viruseigenen Enzyme: Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT), RNase H und Integrase (IN) und wird als Gag-Pol exprimiert. Für die Translation von Gag und Gag-Pol wird die gleiche mRNA verwendet. Diese mRNA umfasst die R-Region im 5'-LTR und das gesamte Virusgenom (Modrow, 1997). Das Gag-Protein wird an freien Ribosomen im Zytosol von dieser mRNA translatiert bis zum Stopp-Codon nach dem p6. In dem Teil, der für das NC des Gag-Polyproteins kodiert, befindet sich eine uridinreiche Sequenzfolge in der mRNA. In ca. 5-10 % der Translationsereignisse erfolgt in diesem Bereich ein ribosomaler Leserasterschub von -1. Durch diese Verschiebung wird statt p6 nun im "neuen" Leseraster das Transframeprotein p6\* translatiert an dessen Ende es kein Stopp-Codon gibt. Die mRNA wird weiter translatiert und es kommt zur Expression des Gag-Pol-Fusionsproteins, dass neben den Strukturproteinen MA, CA und NC, im Pol-

Vorläuferprotein die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase enthält (Modrow, 1997). Durch *env* wird das Vorläuferprotein gp160 der viralen Hüllproteine gp41 (TM, Transmembranprotein) und gp120 (SU, Oberflächenprotein) kodiert (Abb. 1).



**Abb. 1 Genomaufbau von HIV-1**

Darstellung des proviralen Genoms mit flankierenden Enden. Die verschiedenen Exons für ein Protein sind durch Striche miteinander verbunden. U3: U3-Region, R: R-Region, U5: U5-Region, LTR: long terminal repeat, GAG: group-specific antigen, POL: polymerase, VIF: virion infectivity factor, VPR: viral protein R, REV: regulator of expression of virus proteins, ENV: envelope, TAT: transactivator of transcription, VPU: viral protein U, NEF: negativ factor

HIV-1 gehört zur Gruppe der komplexen Retroviren und kodiert noch für sechs weitere regulatorische Proteine. Die Genprodukte von *rev* (regulator of expression of virus proteins) und *tat* (transactivator of transcription) übernehmen regulatorische Aufgaben (Cullen, 1992), *nef* (negativ factor) und *vpu* (viral protein U) haben einen Einfluss auf die Expression des CD4-Rezeptors der Wirtszelle (Chen et al., 1996). Das Produkt von *vif* (virion infectivity factor) ist wichtig für die Ausbildung infektiöser Viren (Borman et al., 1995). Am Transport der viralen DNA vom Zytoplasma in den Nukleus ruhender Zellen ist das *vpr* (viral protein R) kodierte Protein als Bestandteil des Präintegrationskomplexes (PIC: preintegration complex) beteiligt (Heinzinger et al., 1994).

Retroviren besitzen als einzige Viren ein diploides Genom. Dieses (+)Strang-RNA-Genom dient nicht gleich nach einer Infektion als mRNA, sondern erst in der späten Phase der Virusvermehrung. Die ca. 9000 Nukleotide umfassende RNA weist die typischen Merkmale einer eukaryotischen mRNA auf. Sie trägt am 5'-Ende einen 7-Methylguanosenrest, eine

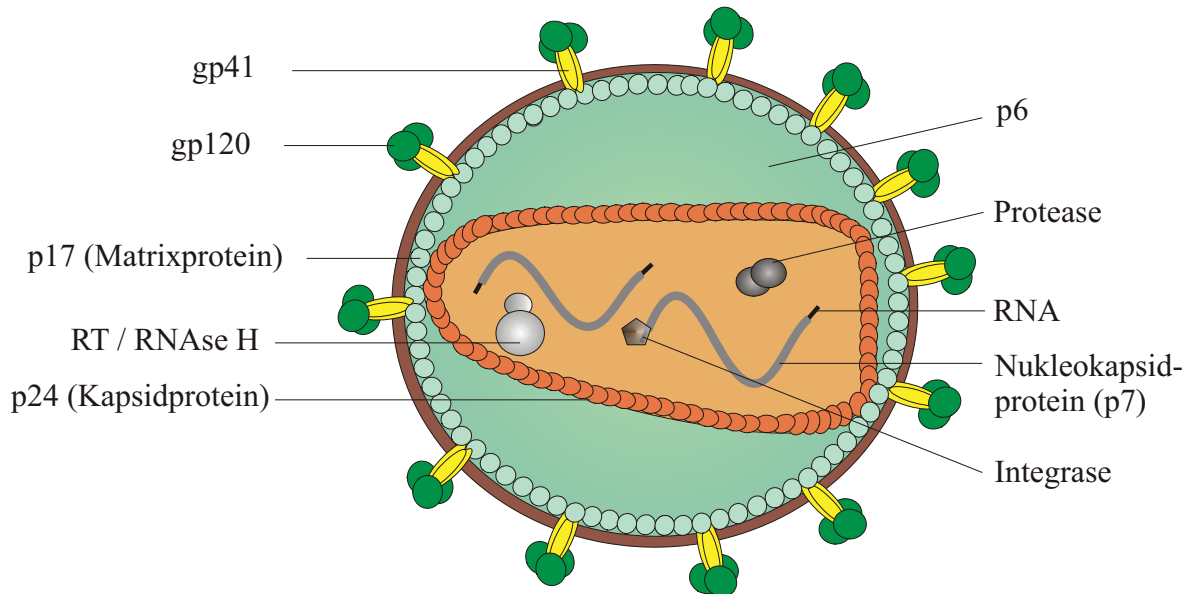


sogenannte „Kappe“ (cap). Dieser Rest ist über eine Triphosphatbrücke mit der 5'-OH-Gruppe des nachfolgenden Nukleotids verknüpft. Am 3'-Ende weist die virale mRNA einen poly(A)-Schwanz auf, eine Abfolge von etwa 200 Adenylatresten. Charakteristisch für das retrovirale RNA-Genom sind die R- und U<sub>5</sub>-Region sowie die Primerbindungsstelle am 5'-Ende und die U<sub>3</sub>- und R-Region am 3'-Ende. Dieses RNA-Genom wird durch die virale Reverse Transkriptase zum ds-DNA-Molekül umgeschrieben, in den Zellkern transportiert und mittels Integrase in das Wirtszellgenom integriert. Die provirale Form dient dann als Matrize für die Bildung neuer (+)Strang RNA-Genome, die in die sich neubildenden Viren eingeschlossen werden.

### **1.3 Viraler Replikationszyklus**

Beim Austritt aus der Wirtszelle schnürt sich das unreife Virus durch Knospung mit einem Teil der Zytoplasmamembran der Wirtszelle ab. In diese sind virale Glykoproteine (gp41) als transmembrane Proteine eingelagert, die über eine Region von ca. 20-25 hydrophoben Aminosäuren in der Membran verankert sind (Coffin, 1996). Mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des gp 41 ist ein externes virales Glykoprotein (gp120) durch nicht kovalente Bindungen assoziiert. Neben den viralen Proteinen enthält die Membran auch zelluläre Proteine (Gelderblom et al., 1987).

Im Inneren sind die Gag-Vorläuferproteine Gag und Gag-Pol radial mit den N-Termini an die Innenseite der Hüllmembran gelagert. Die C-Termini zeigen ins Innere des Viruspartikels (Wilk et al., 2001). Es kommt zur autokatalytischen Prozessierung der viralen Proteasemonomere aus dem Gag-Pol-Vorläuferprotein. Das enzymatisch aktive Proteasehomodimer prozessiert die Gag und Gag-Pol Vorläuferproteine (Kaplan et al., 1994). Durch die Freisetzung der viralen Strukturproteine und Enzyme bildet sich ein reifes, infektiöses Virus. Die reifen infektiösen Viruspartikel haben einen Durchmesser von 100 nm bis 300 nm (Abb. 2) (Wilk et al., 1999).



**Abb. 2 Schematischer Aufbau des Humanen Immundefizienz Virus 1**

Darstellung eines reifen, infektiösen HI-Virus; gp41: transmembranes Glykoprotein; gp120: externes Glykoprotein; RT: Reverse Transkriptase; p6: Linkerprotein; RNA: HIV-Genom.

An der Innenseite der Hüllmembran sind Matrixproteine (p17) über aminoterminalen Myristinsäurereste angelagert. Das Protein p6 verbindet das Viruskapsid im Inneren mit der Virushülle. Im Inneren des Viruskapsids, das aus Kapsidprotein (p24) gebildet wird, befinden sich zwei identische einzelsträngige (+)RNA-Moleküle als Virusgenom (Cann et al., 1989), an die jeweils im Bereich des 5'-Endes eine tRNA als Primer für die Initiierung der Reversen Transkriptase assoziiert ist. Weiterhin sind die viruseigenen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) und das Nukleoprotein (NC) Bestandteil des Kapsidinnenraumes. Das nukleinsäurebindende NC Protein (p7) bindet über Zink-Finger-Motive an das RNA-Genom.

Das externe Hüllprotein gp120 von reifen, infektiösen HI-Viren bindet an den CD4-Rezeptor der Zielzelle (McDougal et al., 1986). CD4 wird z.B. von T-Helferzellen und Makrophagen exprimiert. Der CD4-Rezeptor wurde für die Eintrittspforte des Virus in die Zielzelle gehalten. Durch Versuche mit Mäusezellen, die humane CD4-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimierten, wurde eine Bindung des Virus an CD4 erreicht, aber keine Anzeichen einer HIV-Infektion nachgewiesen (Levy, 1993). Die Bindung an CD4 ist notwendig für eine Infektion aber nicht ausreichend. Für die Membranfusion von Virus und Wirtszelle sind noch weitere zelluläre Oberflächenmoleküle notwendig. In den letzten Jahren wurden Rezeptoren identifiziert, die neben CD4 als Co-Rezeptor von gp120 erkannt werden

und eine Rolle bei der Infektion der Zelle spielen. Die Membranfusion kann durch Co-Rezeptoren wie CCR5, CXCR4 und weiteren Chemokin-Rezeptoren ausgelöst werden. Es hat sich weiter gezeigt, dass die Co-Rezeptoren beim Tropismus eine wichtige Rolle spielen. Mit CXCR4 wurde ein Co-Rezeptor T-Zelltropischer HIV-Stämme isoliert, die bevorzugt T-Zellen infizieren (Feng et al., 1996). CCR5 ist ein Co-Rezeptor M-Zelltropischer HIV-Stämme (Samson et al., 1996), die bevorzugt Makrophagen infizieren.

Das virale gp120 bindet zuerst an das CD4 der Zielzelle (McDougal et al., 1986), dadurch kommt es zu einer konformationellen Änderung des gp120. Die neue Konformation ermöglicht die Bindung an einen Co-Rezeptor. Es kommt zur Membranfusion von Virus und Wirtszelle, vermittelt durch eine Konformationsänderung des gp41 (Kliger et al., 2000). Durch die Transmembranprotein gp41 vermittelte Membranfusion (Perez et al., 1992; Gabuzda et al., 1992) gelangt das Viruskapsid ins Zellinnere. Nach dem Eintritt kommt es durch sogenanntes "uncoating" zur Auflösung des Kapsids. Es folgt der Prozess der Reversen Transkription, der durch die mitgeführte Reverse Transkriptase (RT) katalysiert wird. Nach dem Umschreiben der viralen RNA durch die RT, über ein RNA-DNA-Hybrid als Zwischenprodukt, in doppelsträngige DNA (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970; Fujiwara und Craigie, 1989) erfolgt die Integration der dsDNA durch die virale Integrase über die LTRs in das Wirtszellgenom. Im Gegensatz zu anderen retroviralen Unterfamilien muss die Zelle bei einer Infektion durch Lentiviren keine Mitose zur Integration des viralen Erbgutes durchlaufen. Am Ende der Prozesse des "uncoating" und der Reversen Transkription steht die Bildung eines Präintegrationskomplexes (PIC) (Fouchier et al., 1999). An diesem Komplex sind die Integrase, das Nukleoprotein, das MA-Protein, Vpr und die virale DNA beteiligt. Dieser PIC ermöglicht den Transport der DNA in den Nukleus und die Integration der proviralen DNA in das zelluläre Genom. Nach der Integration der proviralen DNA (Provirus) kommt es zur Expression der regulatorischen Gene *tat* und *rev* (Muesing et al., 1985). Das Tat-Protein bindet an einen als TAR (trans-activation responsible region) bezeichneten R-Abschnitt in der LTR und steigert die Transkriptionsrate (Muesing et al., 1987). Das Rev-Protein bindet im Zellkern an die RRE-Region (rev responsible element region) (Rosen et al., 1985; Malim et al., 1989). Diese ca. 240 Nukleotide lange RNA-Sequenz findet man im Bereich des *env*-Gens in allen einfachgespleißten oder ungespleißten viralen mRNA-Molekülen (Modrow, 1997). Die Anlagerung von Rev erhöht die Halbwertszeit der RNAs und bewirkt den bevorzugten Transport in das Zytoplasma (Malim et al., 1989). Die in das Zytoplasma transportierten RNA-Moleküle dienen zum einen der

Translation virusspezifischer Proteine und zum anderen werden ungespleißte mRNA-Stränge als genomische RNA in Viruspartikel verpackt.

Die Translation der *env*-mRNA erfolgt an den Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in das ER-Lumen als 160 kDa-Vorläuferprotein hinein (Wyatt et al., 1998). Das Vorläuferprotein ist im Lumen über hydrophobe Wechselwirkungen des C-Terminus mit der ER-Membran verankert. Die Env-Bereiche, die sich frei im Lumen befinden, werden an Asparaginresten glykosyliert (Fenouillet et al., 1995). Das gp160 Vorläuferprotein wird während des Transports über den Golgi-Apparat zur Zellmembran durch zelluläre Proteasen zu gp41 und gp120 prozessiert (Kimura et al., 1994). Die Translation aller anderen viruskodierten Proteine erfolgt an freien Ribosomen im Zytoplasma. Die Gag- und Pol-Vorläuferproteine werden während ihrer Synthese am N-Terminus myristiliert und mittels zellulärer Faktoren zur Zellmembran transportiert, an die sie sich anlagern. An der Zellmembran findet die weitere Morphogenese statt. Durch die Zusammenlagerung von ca. 2000 Gag und 200 Gag-Pol Molekülen mit viraler RNA (Göttlinger et al., 1989; Wilk et al., 1999), kommt es zur Ausbildung von ringförmigen, unreifen Partikeln (Gelderblom, 1991). Durch das Ausknospen werden die Partikel mit Wirtszellmembran umhüllt. Während des Abschnürvorgangs dieser Partikel von der Zellmembran kommt es zur autokatalytischen Freisetzung der Protease. Im freigesetzten Virus prozessiert die virale Protease Gag- und Gag-Pol Vorläuferproteine in Strukturproteine (MA, CA, NC und Linker-Protein p6) und virale Proteine (PR, RT, IN). Dadurch kommt es zur Entstehung reifer, infektiöser Viren.

#### **1.4 Therapie**

Im dritten Jahrzehnt nach der Beschreibung der ersten AIDS Symptome ist die Krankheit noch nicht heilbar. Für die Therapie HIV-Infizierter stehen 16 zugelassene Medikamente zur Verfügung (Shafer, 2002). Die Präparate sind gegen zwei Ziele gerichtet: die virale Protease und die Reverse Transkriptase. Die Wirkstoffe lassen sich nach der Art der Hemmung in drei Klassen einteilen: nukleosidanalogue Reverse Transkriptaseinhibitoren (nRTI), nicht-nukleosidanalogue Reverse Transkriptaseinhibitoren (nnRTI) und Proteaseinhibitoren (PI). Die nRTI bewirken einen Abbruch der DNA-Synthese während der Reversen Transkription. Die nnRTI binden an die RT und hemmen deren katalytische Funktion, dabei kommt es allerdings

nicht zur Blockierung der Substratbindung. Die Proteaseinhibitoren blockieren das aktive Zentrum der viralen Protease.

Durch den Einsatz der Reversen Transkriptase bei der Umschreibung der viruseigenen (+)-RNA in dsDNA und der Verwendung der zellulären RNA-Polymerase II zur Transkription des RNA-Virusgenoms, kommt es zu Mutationen im Virusgenom (Modrow, 1997), da beide Enzyme über keine proofreading-Funktion verfügen. Je stärker das Virus repliziert, desto öfter kann es zu Mutationen kommen. HIV-Infizierte weisen einen durch Mutation entstandenen heterogenen genomischen HI-Viren Pool in ihrem Körper auf. Mutationen im kodierenden Bereich für die viralen Enzyme RT und Protease können zur Resistenzbildung gegen in der Therapie verwendete Inhibitoren führen (Shafer, 2002). Durch die Ähnlichkeit von Inhibitoren einer Klasse kann es durch Mutationen auch zu Kreuzresistenzen gegen Inhibitoren kommen, die noch nicht für eine Therapie des Infizierten benutzt wurden. Seit 1995 wird deshalb anstatt der Monotherapie mit einem Inhibitor häufig eine Kombinationstherapie eingesetzt. In dieser Therapie werden nicht mehr nur ein Inhibitor, sondern z.B. zwei nukleosid-RT-Inhibitoren mit einem Protease-Inhibitor bzw. einem nicht-nukleosid-RT-Inhibitor zusammen verabreicht (O'Brien, 2000). Aufgrund der ursprünglich guten Erfolge wurde diese Therapieform als "hochaktive anti-retrovirale Therapie" (HAART: highly active anti-retroviral therapy) bezeichnet. Diese Behandlungsform konnte die Anzahl von HI-Viren pro ml Blut stark senken. Es konnten jedoch nach wie vor replikationskompetente Viren isoliert werden (Finzi et al., 1997). So lange aber HI-Viren noch replizieren, können neue Mutationen Resistenz gegen einen Inhibitor bewirken (Martinez-Picado et al., 2000).

## **1.5 Neue Therapieformen**

Die Integration des Virusgenoms von HIV-1 in das Genom infizierter Zellen bedingt nach dem heutigen Stand der Forschung eine lebenslange Therapie der infizierten Menschen (Finzi et al., 1999). Mit der HAART konnte die Sterblichkeitsrate gesenkt werden (Mocroft et al., 1998), das heißt mehr Menschen leben mit HIV/AIDS und benötigen Therapiekonzepte. Die größte Schwierigkeit bei HIV-Langzeittherapien ist die sich durch Resistenzbildung verringere Auswahl an Inhibitoren, die noch eingesetzt werden können. Sind die Viren im Körper des Infizierten gegen alle Medikamente resistent, steht keine antivirale Therapie mehr

zur Verfügung. Neben der Resistenzbildung sind die durch die tägliche Einnahme von bis zu fünf verschiedenen Präparaten verursachten Nebenwirkungen ein Problem. Die Nebenwirkungen unterscheiden sich je nach Kombinationstherapie. Sie reichen von Übelkeit, Kopf- und Nervenschmerzen über Hautveränderungen bis hin zu Entzündungen der Blutgefäße und innerer Organe (Schieferstein, 2002). Aus diesem Grund werden die Therapien häufig auf Wunsch der Patienten abgebrochen. Die zur Zeit verfügbaren Inhibitoren mit den aufgezeigten Nebenwirkungen sind nicht ausreichend und geeignet für lebenslange Therapiekonzepte HIV-Erkrankter. Für erfolgreiche Therapien werden neue Medikamente benötigt, die sich auch gegen neue virale Ziele richten müssen.

Aus diesem Grund werden neben der Erforschung von neuen Inhibitoren zur Hemmung von RT und PR, Inhibitoren weiterer Schritte im Replikationszyklus von HIV untersucht und getestet. Die Tab. 1 fasst Angriffspunkte für solche Inhibitoren zusammen.

**Tab. 1 Ziele neuer antiviraler Substanzen**

---

**Angriffspunkte für Inhibitoren**

---

Verhinderung der Bindung von gp120 an CD4

Inhibierung der Bindung von gp120 an Co-Rezeptoren

Verhinderung der Fusion von Virus- und Zellmembran

Inhibierung der Integration viraler DNA in das Erbgut

Verhinderung der Expression viraler Gene

Verhinderung des Zusammenbaus der Viren

---

Inhibitoren der erst genannten Angriffspunkte, können die Anheftung des Virus an die Zielzelle und die Membranfusion unterdrücken. Die Virusmembran und die Membran der Zielzelle sind physikalische Barrieren, die umhüllte Viren bei der Infektion der Zelle überwinden müssen. HIV-1 benutzt für die Membranfusion die Hüllproteine gp120 und gp41 als Mediatoren. Gelänge es gp120, Co-Rezeptoren oder gp41 zu blockieren, käme es nicht zur Penetration der Zellmembran und zur Aufnahme des Viruskapsids in die Zelle. Zur Blockierung von gp120 wurden zuerst verschiedene Formen rekombinanter CD4-Moleküle mit geringem Erfolg getestet (Daar et al., 1990). Zur Zeit untersuchte "attachment"

Inhibitoren wie z.B. PRO 542 (Jacobson et al., 2000), ein tetravalentes CD4-IgG2 Fusionsprotein, weisen ein stärkeres antivirales Potential gegen HIV-1 auf. Zur Verhinderung des Viruseintritts durch Blockierung der Co-Rezeptoren CXCR4 oder CCR5 werden ebenfalls verschiedene Ansätze untersucht. PRO 140 (Trkola et al., 2001) ist ein monoklonaler anti-CCR5 Antikörper der die Interaktion von HIV-1 und CCR5 blockiert. Die Blockierung hat aber keinen Einfluss auf die Aktivität von CCR5 als Chemokine-Rezeptor. Zur Verhinderung der durch gp41 vermittelten Membranfusion werden z.B. Peptide wie T20 (Kirby et al., 1998) getestet. Alternativ zur Verhinderung der Infektion würde durch die Blockierung der Integration des viralen Genoms in das humane Genom durch die Hemmung der viralen Integrase eine Therapie erleichtert. Ansatzpunkte für Inhibitoren der Integrase könnten Diketosäuren sein, wie L-731 (Espeseth et al., 2000).

Weitere Untersuchungen zum Einsatz von Peptidsequenzen gegen HIV-1 wie z.B. die Inhibition der viralen Integrase durch kurze Peptide (DeSoultrait et al., 2002), Hemmung der viralen Protease durch Vif abgeleitete Peptide (Blumenzweig et al., 2001) oder die Hemmung der Interface-Region der Protease (Cartas et al., 2001; Schramm et al., 1996) durch abgeleitete Peptide von der Proteasesequenz zeigten antivirale Effekte gegen HIV-1. Die Erforschung von Peptidsequenzen auf inhibitorische Eigenschaften könnte zur Entstehung einer neuen Klasse von HIV-Therapeutika führen.

## **1.6 Protease als therapeutisches Ziel**

Durch die zur Zeit angewendete HAART sollen die Reverse Transkriptase und die Protease von HIV gehemmt werden. Die Inhibition der RT stoppt einen Prozess in der frühen Phase des viralen Replikationszykluses, die Umschreibung des (+)RNA-Genoms in dsDNA. Ohne virale dsDNA kann es nicht zur Integration des Virusgenoms in das zelluläre Genom kommen. Durch die Hemmung der viralen Protease wird die Ausbildung reifer Viren in der späten Phase der Replikation unterbunden. Aus diesem Grund ist der Einsatz von Proteaseinhibitoren von hohem therapeutischen Nutzen bei der Behandlung chronisch HIV-infizierter Zellen.

Die enzymatisch aktive virale Protease von HIV-1 ist ein Homodimer. Die viralen Proteasemonomere prozessieren sich autokatalytisch *in trans* aus den Gag-Pol-Polyproteinen.

Das aktive Zentrum der Protease wird durch beide Untereinheiten gebildet. Jedes der 99 Aminosäure langen Proteasemonomere liefert einen aktivierten Aspartatsäurerest im konservierten Sequenzmotiv Asp-Thr-Gly für das zusammengesetzte aktive Zentrum. Die zur Zeit klinisch verwendeten Proteaseinhibitoren hemmen das aktive Zentrum der Protease.

Die Dimerbildung ist nicht an das aktive Zentrum gebunden, sondern hängt von der Ausbildung der sogenannten Interface-Region ab. Sie wird durch die N- und C-Termini beider Monomere gebildet, es entsteht eine anti-parallele  $\beta$ -Faltblattstruktur. Durch diese Konformation wird das Dimer hauptsächlich stabilisiert. Aufgrund dieser Bedingung zur Ausbildung des Dimers wurde eine Hemmung der viralen HIV-1 Protease durch Verhinderung der Bildung der Interface-Region postuliert und nachgewiesen (Weber, 1990; Zhang et al., 1991; Schramm et al., 1991). Die Arbeitsgruppen konnten einen inhibitorischen Effekt, ausgeübt von Peptiden, die von N- und C-terminalen Aminosäureresten der Proteasemonomere abgeleitet wurden, auf die Protease nachweisen. Diese Peptide wurden in der Folgezeit als Interface-Peptide bezeichnet (Schramm et al., 1996). Es konnte nachgewiesen werden, dass die ersten acht N- und acht letzten C-terminalen Aminosäurereste einen antiviralen Effekt auf die virale Protease *in vitro* hatten (Schramm et al., 1991, 1992). Der inhibitorische Effekt von Peptiden, die vom C-Terminus abgeleitet wurden, war stärker als der, die von N-terminalen Sequenzen abgeleitet wurden. Die C-terminale Aminosäuresequenz der viralen Protease von HIV-1 diente als Ausgang für das Computermodeling (Arbeitsgruppe Schramm) kurzer Peptidsequenzen mit starker Bindung an Proteasemonomere, erfolgversprechende Peptide wurden synthetisiert und in biochemischen Tests gegen rekombinante HIV-1 Protease getestet (Schramm et al., 1996). Die Untersuchung der antiviralen Wirkung solcher Peptide in HIV-1 infizierten Kulturen zeigte nur einen geringen inhibitorischen Effekt dieser Peptide (persönliche Mitteilung Dr. Petry). Die geringe Wirkung der Peptide in Zellkulturversuchen könnte in einer schlechten Aufnahme der Peptide in die Zellen begründet sein. Um auszuschließen, dass die geringe Wirkung der Peptide an einer schlechten Membrangängigkeit liegt, wurden am Deutschen Primatenzentrum Untersuchungen zur intrazellulären Expression der Interface-Peptide durchgeführt (Ast, 1998; Lieder, 1998). Diese Arbeiten lieferten erste Daten über antivirale Effekte intrazellulär exprimierter Interface-Peptide gegen HIV-1.



## 1.7 Aufgabenstellung

In vorausgegangenen Untersuchungen wurde in einem prokaryotischen Wachstumstest durch Expression rekombinanter viraler HIV-1 Protease und Interface-Peptiden eine Inhibition der Protease durch die Peptide nachgewiesen (Ast et al., 1998; Lieder 1998). Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der antivirale Effekt intrazellulär exprimierter Interface-Peptide in eukaryotischen Zellen untersucht werden. Der inhibitorische Effekt sollte nach Kotransfektion von Peptidexpressionsvektoren und einem HIV-1 exprimierenden Klon (pNL4-3) analysiert werden. Für die Untersuchung wurden die Zelllinien COS-7 und LC-5 verwendet.

Kommt es zur Hemmung der viralen Protease von HIV-1 werden die viralen Vorläuferproteine Gag (p55) und Gag-Pol (p160) nicht in die Strukturproteine MA(p17), CA(p24), NC(p7), p6 und die viralen Proteine Protease, Reverse Transkriptase und Integrase gespalten. Ohne die Prozessierung bilden sich keine reifen, infektiösen Viren.

Der Nachweis von Viren im Zellkulturüberstand transfizierter Zellen sollte über einen p24-ELISA erfolgen. Durch die Verhinderung der Prozessierung sollte es zu einer Zunahme von p55 in der Viruspopulation kommen. Funktionell sollte der Nachweis einer Hemmung der Protease durch Infektionsstudien mit Viren aus Zellkulturüberständen erfolgen und das Verhältnis von p24/p55 mittels Western-Blot Analyse der Virionen im Zellkulturüberstand analysiert werden.

Die virale Protease von HIV-1 wird in ausknospenden Viruspartikeln enzymatisch aktiv. Inhibitoren der Protease können nur wirken, wenn sie im Viruspartikel vorliegen. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, ob durch Fusion nicht-viraler Proteine an virale *leader*-Sequenzen ein Transport an die Zytoplasmamembran, dem Ort der Virusassemblierung und weitergehend eine Verpackung in neuentstehende Viruspartikel erfolgt. Für die anfänglichen Untersuchungen wurde das nicht-virale Protein EGFP (EGFP: enhanced green fluorescent protein) mit den viralen *leader*-Sequenz Gag<sup>Δp6</sup> und Myr<sup>+</sup>

fusioniert. Durch Fluoreszenzmikroskopie und Western-Blot Untersuchungen sollte die zelluläre Lokalisation der intrazellulär exprimierten Fusionsproteine innerhalb der Zellen untersucht werden. Ob die EGF-Proteine in neuentstehende HI-Virionen verpackt werden, sollte ebenfalls nach Kotransfektionen mit dem molekularen HIV-1 Klon pNL4-3 untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Hoechst (Frankfurt), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen.

### 2.2 Puffer und Medien

Häufig verwendete Puffer und Medien sind in Tab. 2 aufgeführt und wurden mit zweifach destilliertem Wasser ( $H_2O_{bid}$ ) angesetzt.

**Tab. 2 Puffer und Medien**

<b>Puffer / Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
BLOTTO	5 % [w/v] fettfreies Milchpulver, 0,2 % [v/v] Tween 20 in PBS
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium (PAN Biotech GmbH, Aidenbach), supplementiert mit 10 % [v/v] hitzeinaktiviertem FCS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach), 2 mM Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
LB-Medium	1 % [w/v] Bacto-Trypton (Applichem, Darmstadt), 0,5 % [w/v] Hefeextrakt (Applichem, Darmstadt), 1 % [w/v] NaCl
LB-Agar	1,5 % Agar [w/v] (Difco, Detroit, USA) in LB-Medium
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach), supplementiert mit 10 % [v/v] hitzeinaktiviertem FCS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)

Fortsetzung Tab. 2 nächste Seite

Fortsetzung Tab. 2

Puffer / Medium	Zusammensetzung
	50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
PBS	120 mM NaCl, 17 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
TAE	40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH8,0
TBS für Transfektion	25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,2
TE	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA

### 2.3 *E. coli*-Stamm

Für die Transformation und Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5α verwendet, dessen genetische Eigenschaften in Tab. 3 zusammengefaßt sind.

**Tab. 3      Verwendeter Bakterienstamm**

Stamm	Relevante Charakteristika*	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> , ( <i>Φ80 ΔlacZ M15</i> ), <i>relA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i>	Hanahan et al., 1983

\* Genotypbezeichnungen gemäß Berlyn et al. (1996)

## 2.4 Vektoren

Für Klonierung und Transfektionsexperimente wurden folgende Vektoren verwendet (Tab. 4).

**Tab. 4 Verwendete Plasmide**

Plasmid	Charakteristik	Referenz
pSV- $\beta$ -Gal	eukaryotischer Expressionsvektor für Säugetierzellen	Promega
pcDNA-3	eukaryotischer Expressionsvektor für Säugetierzellen	Invitrogen
pNL4-3	HIV-1-Gesamtklon	Adachi et al., 1986
pEGFP-C1	eukaryotischer Expressionvektor für EGFP-Fusionsproteine	Clontech
pSV- $\beta$ -Gal-PI 5	exprimiert Interface-Peptid (PI) 5	Lieder, 1998
pSV- $\beta$ -Gal-PI 7	exprimiert Interface-Peptid (PI) 7	Ast, 1998
pSV- $\beta$ -Gal-PI 12	exprimiert Interface-Peptid (PI) 12	Lieder, 1998
pSV- $\beta$ -Gal-PI 17	exprimiert Interface-Peptid (PI) 17	Lieder, 1998
pSV- $\beta$ -Gal-PI 24	exprimiert Interface-Peptid (PI) 24	Lieder, 1998
pSV- $\beta$ -Gal-PI 25	exprimiert Interface-Peptid (PI) 25	Lieder, 1998
pSV- $\beta$ -Gal-PI 26	exprimiert Interface-Peptid (PI) 26	Lieder, 1998
pSV- $\beta$ -Gal-PI 27	exprimiert Interface-Peptid (PI) 27	Lieder, 1998
pEGFP	EGFP kloniert in pcDNA-3	Strom, 1999 / d.A.
pMyr <sup>+</sup> -EGFP	Myr <sup>+</sup> -EGFP kloniert in pcDNA-3	Strom, 1999 / d.A.
pGag <sup><math>\Delta</math>p6</sup> -EGFP	Gag <sup><math>\Delta</math>p6</sup> -EGFP kloniert in pcDNA-3	Strom, 1999 / d.A.

d.A.: diese Arbeit

## 2.5 Zelllinien

Für die Kotransfektionsexperimente wurden adhärenente COS-7 Zellen (CV1-Affennierenzellen; Gluzman, 1981) und LC-5 Zellen verwendet. Für die Infektionsversuche die Suspensionszelllinie MT-2.

**Tab. 5 Zelllinien**

Zelllinie	Spezies	aus	Medium	Referenz
COS-7	Affe	Niere	DMEM	Gluzman, 1981
LC-5	Mensch	Lunge	RPMI 1640	Mellert et al., 1990
MT-2	Mensch	Blut	RPMI 1640	Miyoshi et al., 1981

## 2.6 Oligonukleotide

Die in Tab. 6 aufgeführten Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

**Tab. 6 Verwendete Primer**

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Beschreibung
AS-7( <i>Kpn</i> I)	GCT GCT GGT ACC GCT AGC GTG AGT ACG CCA AAA ATT	5' HIV-1 spez. Primer des <i>gag</i>
AS-6( <i>Bgl</i> II)	TAT ATA AGA TCT TGC TTC AGC CAA AAC TCT TGC AGT ACA ATC TTT CAT TTG GTG	3' HIV-1 spez. Primer des <i>gag</i> ohne p6, führt noch kodierenden Bereich für Erkennungssequenz der HIV-1 Protease ein
AS-1( <i>Bgl</i> II)	TAT ATA AGA TCT GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG	pEGFP spez. Primer für 5' <i>egfp</i> ohne Startcodon
AS-2( <i>Eco</i> R I)	TGA CTA GAA TTC TTA TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT	pEGFP spez. Primer für 3' <i>egfp</i>
OA44( <i>Hind</i> III)	GCT GCA AGC TTG CTA GCG TGA GTA CGC CAA AAA TT	5' HIV-1 spez. Primer für den kodierenden Bereich der ersten 31 AS von MA

Fortsetzung Tab. 6 nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Beschreibung
OA45( <i>Hinf</i> I)	CCA GAG TCG TAG TTT ATA TTG TTT CTT	3' HIV-1 spez. Primer für den kodierenden Bereich der ersten 31 AS von MA
AS-2( <i>Kpn</i> I)	TGA CTA GGT ACC TTA TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT	pEGFP spez. Primer für 3' <i>egfp</i>
AS-1( <i>Hinf</i> I)	TAT ATA GAA TCG TGA GCA AGG GGG AGG AGC T	pEGFP spez. Primer für 5' <i>egfp</i> ohne Startcodon
T7_seq	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	5' Primer zur Sequenzierung
T3_seq	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G	3' Primer zur Sequenzierung
GFP1( <i>Hind</i> III)	TCT GAA GCT TAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA GCT GTT	pEGFP spez. Primer für 5' <i>egfp</i> mit Startcodon

## 2.7 Antisera und Antikörper

Die verwendeten Antikörper und das Antiserum sind in Tab. 7 zusammengefaßt. Die Antikörper wurden von den Firmen Roche (Mannheim) und Dianova (Hamburg) bezogen.

Tab. 7 Antisera und Antikörper

Antisera / Antikörper	Spezifität
humanes HIV-1 spezifische Antiserum	gepooltes polyklonales Serum HIV-1 infizierter Patienten, eingesetzt zum Nachweis von p24/p55
mouse anti-GFP (monoklonal)	zum Nachweis von EGF-Proteinen
anti-mouse IgG (H+L)-AP	gegen Maus IgG gerichteter Antikörper, konjugiert mit alkaliner Phosphatase

---

## 3. Methoden

### 3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die mikroskopische Betrachtung der Zellkultur wurde ein Invers-Mikroskop Typ IX-70 (Olympus, Hamburg) verwendet. Das Mikroskop verfügte über eine Fluoreszenzausstattung. Zur Dokumentation der Ergebnisse diente eine Olympusphotokamera (SC35) am Fotoport. EGFP exprimierende Zellen wurden mit dem GFP-Filtermodul (Olympus, Hamburg) betrachtet.

#### 3.1.1 Kultivierung von COS-7 Zellen

Die adhärenenten COS-7 Zellen wurden mit supplementiertem DME-Medium (DMEM) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) kultiviert. Die Kulturen wurden in einem Brutschrank (Labotect, Göttingen) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % [v/v] CO<sub>2</sub> bei 37 °C gehalten. Die Morphologie der Zellen wurde täglich mikroskopisch überprüft. Dreimal wöchentlich mußten die Zellen passagiert werden. Das alte Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und durch anschließende Behandlung mit 1,5 ml EDTA-Trypsin (0,125 % [w/v] EDTA und 0,125 % [w/v] Trypsin in PBS) von der Aufwuchsfläche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 ml Medium von der Fläche gespült und für 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach noch zweimal mit je 5 ml Medium gewaschen und wieder zentrifugiert. Nach dem Waschen wurde das Pellet 1:3 bis 1:5 aufgeteilt und die Zellen auf neue Platten umgesetzt.

#### 3.1.2 Kultivierung von LC-5 Zellen

Die adhärenenten LC-5 Zellen wurden mit supplementiertem RPMI 1640 Medium in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) kultiviert. Die Kulturen wurden in einem Brutschrank (Labotect, Göttingen) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % [v/v] CO<sub>2</sub> bei



37 °C gehalten. Die Morphologie der Zellen wurde täglich mikroskopisch überprüft. Die Zellen wurden bei Erreichen von 80 % Konfluenz passagiert. Das alte Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und durch anschließende Behandlung mit 1,5 ml EDTA-Trypsin (0,125 % [w/v] EDTA und 0,125 % [w/v] Trypsin in PBS) von der Aufwuchsfläche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 ml Medium von der Fläche gespült, in ein konisches 15 ml Röhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt und für 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach noch zweimal mit je 5 ml Medium gewaschen und wieder zentrifugiert. Nach dem Waschen wurde das Pellet 1:3 bis 1:5 aufgeteilt und die Zellen auf neue Platten umgesetzt.

### **3.1.3 Kultivierung von MT-2 Zellen**

Die Suspensionszelllinie MT-2 wurde mit supplementiertem RPMI 1640 Medium, das mit 2 mM Glutamin komplementiert war, in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) kultiviert. Die Kulturflaschen wurden stehend in einem Brutschrank (Labotect, Göttingen) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % [v/v] CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert. Die Morphologie der Zellen wurde täglich mikroskopisch überprüft. Die Kultur wurde in einer Zelldichte von 2-9 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml gehalten. Wurde die Zellzahl überschritten, wurden Zellen aus dem Kulturgefäß abgesaugt. Alle drei Wochen wurden die Zellen in ein neues Zellkulturgefäß überführt. Das Zellkulturmedium wurde nie vollständig erneuert. Aus der Zellkultur wurden 2/3 Medium abgesaugt und durch frischen Medium ersetzt (konditioniertes Medium).

### **3.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Zur Bestimmung der lebenden Zellen pro ml Kulturvolumen wurde eine Zählkammer nach Neubauer benutzt. Die adhärennten Zellen wurden mittels Zellschaber vorsichtig vom Kulturgefäßboden gelöst und mit Medium aus der Flasche in ein Greiner-Röhrchen überführt. Suspensionszellen wurden aus dem Zellkulturgefäß entnommen.

Die Zellen wurden für 5 min bei 1200 Upm sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 3 ml DMEM (RPMI) resuspendiert. Ein Probevolumen der Zellkultur wurde mit dem gleichen Volumen an Trypanblau-Lösung (0,5 % [w/v] in PBS) versetzt und für

5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Tote Zellen waren danach im Hellfeld des Lichtmikroskops aufgrund ihrer blauen Färbung gut von ungefärbten lebenden Zellen zu unterscheiden.

### 3.1.5 Lagerung der Zellkulturen / Passagen

Für die verschiedenen Versuche wurden Zellen einer Passage verwendet, dafür wurden die Zellen in Kultur genommen, expandiert und die so entstandenen Kulturen einer Passage im Kryotank mit Stickstoff gelagert. Die Zellen wurde in Einfriermedium kontrolliert eingefroren. Dazu wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert und das Pellet mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließen wieder durch Zentrifugation pelletiert und in 0,8 ml Einfriermedium suspendiert.

**Einfriermedium:**

- 10 % [v/v] DMSO
- 20 % [v/v] FCS
- 70 % [v/v] des jeweiligen Kulturmediums

Die Suspension wurde in 2,0 ml Cryoröhrchen (Cryo.s<sup>TM</sup>; Greiner, Frickenhausen) überführt. Die Lagerröhrchen wurden beschriftet in einen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Nalgene Cryo 1 °C Freezing container; Nunc, Wiesbaden) gestellt. Der verschlossene Einfrierbehälter wurde in den -80 °C Tiefkühlschrank gestellt. Der Behälter sorgte für ein gleichmäßiges Abkühlen der Röhrchen um -1 °C/min auf -80 °C. Nach 12 h wurden die gefrorenen Röhrchen in den Kryotank überführt.

## 3.2 Protein-biochemische Methoden

### 3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische können durch Elektrophorese in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) aufgetrennt werden. Unter denaturierenden Bedingungen werden Proteine hauptsächlich aufgrund ihrer Masse und Ladung getrennt. Die Denaturierung wurde durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) erreicht.

#### Probenpuffer:

- 40 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 0,25 M DTT
- 7,5 M Harnstoff
- 2,3 % [w/v] SDS
- 0,05 % [w/v] Bromphenolblau

SDS bewirkt die Zerstörung der nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen, und DTT diente zur Reduktion von Disulfidbrücken. Es bindet etwa ein SDS-Anion pro zwei Aminosäurereste. Der Komplex aus denaturiertem Protein und SDS ist negativ geladen und wandert zur Anode im elektrischen Feld. Die Wanderungsstrecke der Komplexe ist ungefähr ihrer Masse proportional.

Die Gele wurden in Flachbettkammern von 1 mm Stärke, einer Breite von 16 cm und einer Höhe von 14 cm gegossen, wobei 2 cm der Höhe vom Sammelgel gebildet wurden.

#### Trenngel:

- 12 % [v/v] Acrylamid (Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1 [w/w])
- und 1 % [w/v] SDS
- in 375 mM Tris-HCl, pH 8,0;
- Zur Polymerisation (pro 12 ml Gelvolumen):
- 24 µl 10 % [w/v] Ammoniumpersulfat (APS) als Kettenstarter und
- 8 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Radikalüberträger zugegeben

Zum späteren Probenauftrag wurden im Sammelgel Taschen mit einem Volumen von 35 µl mit einem Gelkamm erzeugt.

**Sammelgel:**

- 5 % [w/v] Acrylamid
- 0,1 % [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid
- 0,1 % SDS in 375 mM Tris-HCl, pH 6,8
- zur Polymerisation wurden zu 10 ml Gelvolumen
- 100 µl 10 % [w/v] Ammoniumpersulfat (APS)
- 10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Die Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophoresekammer (Penguin™ water-cooled dual-gel electrophoresis system) bei konstanten Stromstärken von 20 mA während der Konzentrierung der Proben im Sammelgel und 40 mA beim anschließenden Lauf im Trenngel. Beim Lauf von zwei Gelen pro Kammer wurden die Stromstärken verdoppelt.

**Elektrodenpuffer:**

- 25 mM Tris-HCl, pH 8,3
- 200 mM Glycin
- 0,1 % SDS

**Markerproteine (gefärbt):**

- $\alpha_2$ -Makroglobulin (180 kDa)
- $\beta$ -Galaktosidase (116 kDa)
- Fructose-6-Phosphatkinase (84 kDa)
- Pyruvat-Kinase (58 kDa)
- Fumarase (48,5 kDa)
- Lactat-Dehydrogenase (36,5 kDa)
- Triose-Phosphat-Isomerase (26,6 kDa)
- durch die Färbung der Markerproteine schwankte das Molekulargewicht der Markerproteine je nach Charge, tatsächliches Gewicht siehe Beschriftung der Western-Blots (Sigma, Deisenhofen)

**3.2.2 Proteinfärbung mit Coomassie Blue**

Polyacrylamidgele wurden für 20-30 min in Färbelösung (modifiziert nach Weber und Osborn, 1969) und anschließend in Entfärbelösung geschwenkt.

**Färbelösung:**

- 1,25 g Serva Blue R-250
- 227 ml Methanol
- 46 ml 96 % Essigsäure
- ad 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>

Die Entfärbelösungen wurden mehrfach gewechselt, bis der Gelhintergrund vollständig entfärbt war und nur die Proteinbanden gut sichtbar blieben.

**Entfärbelösung I:**

- 450 ml Methanol
- 160 ml Essigsäure (60 %)
- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>

**Entfärbelösung II:** zur Entfärbung über Nacht

- 50 ml Methanol
- 80 ml Essigsäure (60 %)
- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>

Die gefärbten Gele wurden auf Filterpapier gelegt und mittels Geltrockner (Slab-Geldryer GD 40/50, GIBCO BRL) getrocknet. Nach der Trocknung wurden sie mit Folie überzogen.

### 3.2.3 Western-Blot zum Proteinnachweis

Bei dieser Methode werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilm (z.B. Nitrozellulose- oder Nylon-Membran) übertragen. Durch die Übertragung der Proteine entsteht eine Kopie des Gels, wobei die Proteine auf der Membran immobilisiert werden. Bei geeigneten Transferbedingungen bleibt sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine erhalten (Ibelgaufits, 1993).

Die Proteine wurden denaturiert und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll, Dassel) übertragen. Die Übertragung erfolgte durch das Blottgerät (Biotec-Fischer, Reiskirchen) bei konstanter Stromstärke von 250 mA über Nacht im Puffertank.

**Transferpuffer:**

- 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,2 % [w/v] SDS
- in 20 % [v/v] Methanol

Auf die Membran übertragene Proteine wurde durch eine Antikörperreaktion sichtbar gemacht.

Vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran zunächst 30 min mit Blotto bei 37 °C abgesättigt. Danach folgte die Inkubation mit dem in Blotto verdünnten ersten Antikörper oder Anitserum bei 37 °C für 1 h. Nach diesem Schritt wurde die Membran fünfmal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zum optischen Nachweis spezifischer Banden wurde die Membran mit einem zweiten in Blotto verdünnten Antikörper wieder für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der zweite Antikörper war an Alkalischer Phosphatase gekoppelt. Im Anschluß an die Inkubation wurde die Membran fünfmal für 10 min mit TBS-Puffer und anschließend dreimal für 20 min mit Carbonat-Puffer gewaschen.

**TBS:**

- 20 mM Tris-HCl
- 500 mM NaCl, pH 7,5

**Carbonat-Puffer:**

- 100 mM NaHCO<sub>3</sub>
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8

Zur enzymatischen Farbreaktion wurden 100 µl NBT-Lösung und 133 µl BCIP-Lösung in 30 ml Carbonat-Puffer gegeben.

**NBT-Lösung:**

- 30 mg/ml p-Nitroblau-tetrazoliumchlorid in 70 % [v/v] N,N'-Dimethylformamid

**BCIP-Lösung:**

- 15 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Toluidensalz in 100 % [v/v] N,N'-Dimethylformamid

In der Färbelösung wurde die Membran bei Raumtemperatur ca. 10 - 30 min inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> beendet und die Nitrozellulosemembran zwischen Fließpapier getrocknet.

**Nachweis viraler HIV-1 Proteine:**

- primär: humanes HIV-1 spezifisches Antiserum, 1:1000
- 2. Antikörper, goat anti-human IgG (H+L), 1:2000

**Nachweis von EGFP-Fusionsproteinen:**

- 1. Antikörper mouse-anti-GFP, 1:2000
- 2. Antikörper goat-anti-mouse, 1:2000

**3.2.4 X-Gal Färbung**

Am dritten Tag nach Transfektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 2,5 ml Fixierlösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

**Fixierlösung:**

- 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,25 % Glutaraldehyd
- 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,0

Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit der Färbelösung im Wärmeschrank (37 °C) für 4 h.

**Färbelösung:**

- 0,2 % X-Gal
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 150 mM NaCl
- 3,3 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> x 3 H<sub>2</sub>O
- 3,3 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>
- 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Nach 4 h wurden die Zellen mikroskopiert. Zellen die β-Gal-Fusionspeptide exprimierten konnten an der Blaufärbung identifiziert werden. Durch Überschichten der angefärbten Zellen mit Glycerin konnte der Inkubationsansatz konserviert werden.

### 3.2.5 Virusernte aus dem Überstand kotransfizierter Zellen

Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und bei 10000 rpm (Kontron-Rotor TST 41-14) für 60 min bei 4 °C zentrifugiert, um Zelldebris zu pelletieren. Die Viren die sich nach der Zentrifugation im Überstand befanden, wurden durch Ultrazentrifugation über ein 20 % Saccharosekissen für 16 h bei 24000x g (TST41-14) und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen und für 2 h inkubiert. Danach wurden die Proben mit dem gleichen Volumen an reduzierendem Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C gekocht und anschließend über ein 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt.

### 3.2.6 Zellyse kotransfizierter LC-5 Zellen

Zur Gewinnung der Zytosol- und Membranfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen wurden die Überstände von den kotransfizierten LC-5 Zellen 48 h nach der Transfektion abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mittels Zellschaber von der Aufwuchsfläche gelöst und in PBS aufgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nochmal in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in LSEB (low salt extraction buffer) suspendiert.

#### **LSEB:**

- 0,14 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl
- 2 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O
- 2 mM Dithiothreitol
- in 900 ml H<sub>2</sub>O lösen, pH 8,0 einstellen
- 3 ml NP-40 zugeben
- 2 ml Aceton mit 2 ml NP-40 mischen und 350 mg Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) darin auflösen
- Lösung tropfenweise zu den 900 ml zugeben
- Lagerung bei -20 °C

Die Ansätze wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Zelllysate mit 4000x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der so erhaltene klare Überstand wurde in einer Tischzentrifuge mit 14000x g bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet enthielt die Membranfraktion, der Überstand die Zytosolfraction. Das Pellet wurde in einer dem Volumen des Überstands entsprechenden Menge an PBS resuspendiert. Beide Fraktionen wurden mit reduzierendem



---

Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben wurden über ein 12 % Polyacrlyamidigel aufgetrennt.

### 3.3 Verwendete Transfektionsmethoden

#### 3.3.1 Transfektion nach der DEAE-Dextranmethode

DEAE-Dextran (Diethyl-aminoethyl-Dextran) wurde als polykationisches Transfektionsreagenz verwendet. Das Polykation DEAE-Dextran bildet aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem negativ geladenem Phosphatrückgrat von Nukleinsäuren Komplexe, welche auf der negativ geladenen Zelloberfläche adsorbieren und durch Endozytose aufgenommen werden. COS-7 und LC-5 Zellen wurden mit der DEAE-Dextran-Methode (Vaheri und Pagano, 1965) transfiziert. Dazu wurden 24 h vor der Transfektion je  $3 \times 10^5$  Zellen in  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit TBS-Puffer gewaschen und die Transfektionslösung (DNA in 250  $\mu\text{l}$  TBS und 250  $\mu\text{l}$  DEAE-Dextran (0,5 mg/ml in TBS)) vorsichtig aufgetragen. Die Flaschen wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dabei alle 10 min geschwenkt. Das Schwenken sollte ein Austrocknen der Zellen verhindern und die gleichmäßige Verteilung der Lösung gewährleisten. Anschließend folgte die Inkubation mit 15 % [v/v] DMSO (Dimethylsulfoxid) in DMEM (COS-7) bzw. RPMI (LC-5) für 2 min. Nach diesem Schritt wurden die Zellen einmal mit TBS gewaschen und für 3 h in DMEM (COS-7) bzw. RPMI (LC-5) mit 0,1 mM Chloroquine (Sigma, Deisenhofen) im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt und durch 5,0 ml DMEM (COS-7) bzw. RPMI (LC-5) ersetzt.

#### 3.3.2 Transfektion von LC-5 Zellen mittels Effectene<sup>®</sup>

Die für die Transfektion geeignetsten Bedingungen wurden nach dem Protokoll des Herstellers ermittelt. LC-5 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) mit  $2 \times 10^5$  Zellen / 5 ml Medium umgesetzt. Am nächsten Tag wurde die zur Transfektion benötigte Menge DNA X  $\mu\text{g}$  (min 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mit EC-Puffer (DNA-Kondensationspuffer) zu 150  $\mu\text{l}$  ergänzt. Dem Ansatz wurden 8  $\mu\text{l}$  Enhancer zugesetzt und für

1 Sekunde gevortext. Nach der Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz kurz zentrifugiert. Nach der Zugabe von 10 µl Effectene-Reagenz wurde der Ansatz 10 Sekunden durch vortexen gemischt. Die Ansätze wurden für 5 – 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert. In der Inkubationszeit wurde das Medium aus den für die Transfektion vorbereiteten Zellkulturgefäßen abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 4 ml frischem Medium versorgt. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 1 ml Zellkulturmedium zu den Transfektionsansätzen. Durch zweimaliges Aufsaugen mit der Pipette wurde der Ansatz durchmischt und der Komplex schnell tröpfchenweise auf die Zellen geben. Das Zellkulturgefäß wurde leicht geschüttelt um eine gute Durchmischung zu erreichen. Anschließend folgte die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.4 Molekulargenetische Methoden**

#### **3.4.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Reinigung, Identifizierung und Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Elektrophoresen in Agarosegelen (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Je nach Größe der zu erwartenden Fragmente (0,1 - 14 kb) wurden Horizontalgele verwendet, die 0,7 % - 2 % [w/v] Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) in TAE-Puffer enthielten. Zum späteren Nachweis der DNA-Banden mit UV-Licht (UV-Tisch Chroma 43,  $\lambda = 302$  nm, Vetter, Wiesloch) wurden pro 100 ml Gelvolumen 2,5 µl einer 0,1 % [w/v] Ethidiumbromidlösung zugesetzt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 ihres Volumens an Probenpuffer versetzt.

#### **Probenpuffer:**

- 50 % [v/v] Glycerin
- 0,25 % [w/v] Bromphenolblau
- 0,25 % [w/v] Xylencyanol

Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet.

**50x TAE-Laufpuffer:**

- 242 g Tris-HCl
- 100 ml 0,5 mM EDTA
- 57,1 ml konz. Essigsäure
- ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>
- einstellen auf pH 8,5

Als Längenstandard diente 1 µg des 1 kb-Markers der Firma GIBCO (75 - 12216 bp, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) (Hartley and Gregori, 1981) in 10 µl Probenpuffer. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei konstanter Spannung von 80 V in einer Agargel Midi-Wide Horizontalelektrophoresekammer (Biometra, Göttingen) mit 1x TAE als Laufpuffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem Gel Print 2000i (Biophotonics) fotografiert.

### **3.4.2 Minipräparation von Plasmid-DNA**

Kleine Mengen an DNA wurden nach der Methode von Birnbaum und Doly (1979) isoliert. Hierzu wurden von Einzelkolonien 2 ml LB-Flüssigkulturen (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Rundschtüttler inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Morgen durch 3minütige Zentrifugation bei 13000x g pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl Lösung 1 resuspendiert.

**Lösung 1:**

- 4 mg/ml Lysozym
- 50 mM Glucose
- 10 mM EDTA
- 25 mM Tris-HCl, pH 8,0

Die Suspension wurde geschüttelt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 400 µl frisch angesetzte Lösung 2 zugegeben.

**Lösung 2:**

- 0,2 N NaOH
- 1 % [w/v] SDS

Der Ansatz wurde gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 300 µl einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung zugegeben, kurz durchmischt und für 10 min auf Eis

inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend bei 13000x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,7 Volumen Isopropanol versehen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 13000x g für 30 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0,6 Volumen 70 % [v/v] Ethanol gewaschen, zentrifugiert, getrocknet und in 40 µl TE-Puffer aufgenommen.

Geringe DNA-Mengen für Sequenzierungen wurden durch Spin-Präparation (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

### 3.4.3 Midipräparation von Plasmid-DNA

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden durch den Einsatz des Midi-Präparations-Kit der Firma Qiagen (Hilden) erhalten.

50 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum versetzt) wurden mit dem jeweiligen Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Rundschtüttler inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 3500x g für 20 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer 1 resuspendiert und dann mit 4 ml Puffer 2 versetzt, vorsichtig geschwenkt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **Puffer P1:**

- 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 10 mM EDTA
- 100 µg/ml RNase A

#### **Puffer P2:**

- 200 mM NaOH,
- 1 % [w/v] SDS

Anschließend wurden 4 ml Puffer 3 zugesetzt und sofort geschwenkt.

#### **Puffer 3:**

- 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 40 min mit 3500x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf eine mit 4 ml QBT-Puffer equilibrierte Qiagen-100-Säule gegeben.

**QBT-Puffer:**

- 750 mM NaCl
- 50 mM MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure, pH7,0)
- 15 % [v/v] Isopropanol
- 0,15 % [v/v] Triton<sup>®</sup> X-100

Die Säule wurde mit 2 x 10 ml Puffer QC gewaschen und die DNA anschließend mit 5 ml QF-Puffer eluiert.

**QC-Puffer:**

- 1 M NaCl
- 50 mM MOPS, pH 7,0
- 15 % [v/v] Isopropanol

**QF-Puffer:**

- 1,25 M NaCl
- 50 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 15 % [v/v] Isopropanol

Das Eluat wurde mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt und wie unter 3.4.2 beschrieben gewaschen und in einem geeignetem Volumen H<sub>2</sub>O / TE aufgenommen.

### **3.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten und mit dem GFX<sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wie folgt isoliert:

Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Auf einer mit dem leeren Reaktionsgefäß tarierten Waage wurde die Masse des Gelstücks bestimmt (max. 300 mg). Pro 10 mg Masse wurden 10 µl Capture Buffer in das Reaktionsgefäß pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und der Ansatz kräftig geschüttelt. Anschließend folgte eine Inkubation im Heizblock bei 60 °C bis sich das Gelstück vollständig gelöst hatte (ca. 15 min). Während der Inkubation wurde eine GFX-Säule in ein 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt. Nachdem sich das Agarosegelstück gelöst hatte, wurde der Ansatz kurz zentrifugiert. Die Lösung wurde im Anschluß auf die GFX-Säule überführt und 1 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 15000x g in einer Tischzentrifuge. Das Säuleneluat wurde aus dem Sammelgefäß dekantiert,

anschließend wurde die Säule wieder in das Sammelgefäß gestellt. Auf die GFX-Säule wurden 500 µl Waschpuffer pipettiert. Der Ansatz wurde für 1 min mit 15000x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Auf die GFX-Säule wurden 40 µl steriles H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> pipettiert. Nach 1 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz für 1 min mit 15000x g zentrifugiert. Die so aus dem Gelblock isolierte DNA wurde im Anschluß weiter verwendet.

### **3.4.5 Präzipitation von DNA-Fragmenten mit Ethanol oder Isopropanol**

DNA wurde zur Konzentrierung und Entsalzung mit Ethanol gefällt. Dazu wurden wässrige DNA-Lösungen mit 3 M Natriumacetat-Lsg. (pH 4,8) auf eine Salzkonzentration von 0,3 M Natriumacetat eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen 96 % [v/v] Ethanol versetzt. Die Proben wurden 1 h bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend 15 min bei 4 °C mit 13000x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und danach getrocknet. Das trockene Pellet wurde in einem geeigneten Volumen sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> oder TE-Puffer resuspendiert. Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (Sambrook et al., 1989; s. 3.4.6).

Zur Konzentrierung der DNA oder zur Entfernung sehr kleiner DNA-Fragmente wurden die Ansätze mit dem 0,6-fachen Volumen an Isopropanol ohne Salzzugabe versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Danach wurde wie für die Ethanolfällung beschrieben verfahren (Sambrook et al., 1989).

### 3.4.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde in entsprechenden Verdünnungen photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Freiburg) gegen TE-Puffer bzw. gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  in Quarzglasküvetten durchgeführt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht für dsDNA eine  $\text{OD}_{260}$ -Einheit  $50 \mu\text{g dsDNA} / \text{ml}$  (Sambrook et al., 1989). Die Reinheit der DNA ergab sich aus dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm. DNA-Lösungen mit einem geringen Proteinanteil zeigen dabei Quotienten von 1,8-2,0.

### 3.4.7 Präparation transformationskompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen (Cohen et al., 1972) wurden 2 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Stamm angeimpft und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  auf dem Rundschüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Morgen 200 ml LB-Medium versetzt und unter den gleichen Bedingungen weiter kultiviert. Das Wachstum der Kultur wurde photometrisch bei 600 nm verfolgt. Beim Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 bis 0,3 wurden die Zellen durch 10minütiges Zentrifugieren mit  $3500\times g$  pelletiert und anschließend mit 50 ml eiskalter 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung suspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen wieder 10 min bei  $3500\times g$  ( $4^\circ\text{C}$ ) pelletiert. Das Pellet wurde danach in 10 ml Lagermedium (20 % Glycerin, 50 mM  $\text{CaCl}_2$ ) aufgenommen. Die Zellen wurden in 0,5 ml Portionen aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.4.8 Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$

Zum Ligationsansatz wurden  $50 \mu\text{l}$  TCM-Puffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) und  $125 \mu\text{l}$  auf Eis aufgetaute kompetente *E. coli* Zellen gegeben. Der Ansatz wurde danach leicht durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei  $42^\circ\text{C}$  und danach die Zugabe von 1 ml LB-Medium. Der Ansatz wurde für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  auf dem Rundschüttler inkubiert. Die transformierten Zellen wurden danach bei  $3500\times g$  für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet im

Restvolumen suspendiert. Der Ansatz wurde auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C kultiviert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge nicht transformierter Bakterien ausgestrichen.

### **3.4.9 Bestimmung der optischen Dichte**

Die optische Dichte (OD) von Bakterienkulturen wurde in 0,5 ml Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer (UVIKON 810, Kontron) bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) gegen das entsprechende Medium als Leerwert bestimmt. Proben mit hohen Zelldichten wurden mit Medium auf Werte unter 0,4 verdünnt, um den Bereich der linearen Beziehung zwischen Zellmasse und Extinktion nicht zu verlassen.

### **3.4.10 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Charakterisierung der dsDNA-Moleküle über Restriktionsfragmente wurde die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen entsprechend den Angaben der Herstellerfirma (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Anschließend wurden die Fragmente durch Agarosegelelektrophorese getrennt, nachgewiesen und bei weiterer Verwendung aus dem Gel eluiert. Bei Verwendung von Restriktionsenzymen mit unterschiedlich optimalen Reaktionsbedingungen wurde zuerst das bei einer niedrigeren Salzkonzentration arbeitende Enzym eingesetzt, dann die Salzkonzentration erhöht und mit dem zweiten Enzym im Überschuß weiter inkubiert.

### **3.4.11 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation wurde zur Verknüpfung von Vektor- und Insert-DNA genutzt (Weiss et al., 1968; Sambrook et al., 1989).



**Ligationsansatz:**

- 10 - 50 ng Vektor-DNA
- 3:1 Überschuß an Insert-DNA
- 1 µl 10x Ligationspuffer
- 1 µl T4-Ligase (5 U)
- ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>

Die Ligation wurde über Nacht bei 14 °C im Wasserbad durchgeführt.

**10 x Ligationspuffer:**

- 300 mM Tris-HCl, pH 7,8
- 100 mM MgCl<sub>2</sub>
- 100 mM DTT
- 10 mM ATP

**3.4.12 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung**

Es wurde eine Methode zur direkten Sequenzierung von PCR-Fragmenten eingesetzt, die auf dem Kettenabbruchverfahren zur Sequenzierung von ssDNA beruht (Sanger et al., 1977). Es wurde ein DNA-Sequenziergerät der Serie LI-COR 4000 (Fa. MWG, Ebersberg) verwendet. Der zu sequenzierende dsDNA-Bereich wurde auf dem nicht-kodierenden Strang durch ein Oligonukleotid in 3'-Richtung als Primer definiert begrenzt. Das verwendete Oligonukleotid mußte für den späteren Nachweis mit IRDye<sub>800</sub><sup>TM</sup> gelabelten dNTPs synthetisiert werden (Fa. MWG, Ebersberg). Es wurde der CycleReader<sup>TM</sup> Auto DNA Sequencing Kit (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Die "cycle-sequencing" Reaktion wurde in vier getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt. Als Substrat für die Reader<sup>TM</sup>-Taq DNA-Polymerase dienten jeweils die vier in der DNA vorkommenden dNTPs. Jeder Reaktionsansatz enthielt zusätzlich ein jeweils unterschiedliches 2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat (ddNTP), welches ebenfalls von der Polymerase als Substrat erkannt wird und in den wachsenden DNA-Strang eingebaut wird. Der Einbau der ddNTPs führt zum Kettenabbruch, da die für die Kettenverlängerung benötigte 3'-Hydroxyl-Gruppe fehlt. Wenn die Reaktionsbedingungen so gewählt worden sind, daß statistisch nur ein ddNTP an einer beliebigen Stelle in jedes DNA-Molekül eingebaut wird, erhält man eine Population von unvollständig synthetisierten DNA-Molekülen. Diese Moleküle weisen alle ein durch das Oligonukleotid definiertes 5'-Ende auf.

**Reaktionsansätze:**

- 2,5 µl Sequencingpuffer
- 1,0 µl markierter Primer (2pmol/ml)
- x µl dsDNA (400 ng DNA < 8 kb)
- 1,0 µl Reader<sup>TM</sup>-Taq DNA-Polymerase
- ad 17 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert, gemischt und kurz zentrifugiert. Je 4 µl des Enzym/Primer/Template-Gemisches wurden in vorbereitet 0,5 ml Eppendorf-PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Die PCR-Reaktionsgefäße enthielten 2 µl des entsprechenden Terminationsmixes. Der Ansatz wurde mit 10 µl Mineralöl überschichtet und die PCR im Thermocycler durchgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden erst nach dem Erreichen von 95 °C in den Thermoblock gestellt.

Nach der PCR wurden die Reaktionsansätze mit 3,0 µl Stoppmix versetzt und für 3 min bei 95 °C thermisch durchmischt und hitzedenaturiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung nach Größe durch Elektrophorese in einem 6 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Gel und automatischer Detektion der Banden mittels LI-COR 4000.

**PAGE:**

- 35 ml Gen Page Plus 6% denaturing DNA sequencing gel (Ambresco, Ohio USA)
- 350 µl 10 % [w/v] Ammoniumpersulfat-Lsg.
- 35 µl TEMED

Als Laufpuffer diene 1x TBE. Die Auftrennung erfolgte bei einer Geltemperatur von 50 °C.

**10x TBE (Laufpuffer):**

- 25 mM EDTA
- 45 mM Borsäure
- 1,34 MTris  
(pH 8,3 - 8,7 von 1 x TBE bei 50 °C!)

**3.4.13 Methoden der Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR-Technik (Saiki et al., 1988; Mullis und Faloona, 1987) ist eine enzymatische Methode für die *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Die Spezifität der Amplifikation basiert auf zwei Oligonukleotiden, die das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren und an den komplementären Strängen binden. Die Oligonukleotide sind in entgegengesetzter Richtung orientiert, so daß die DNA-Region zwischen ihnen synthetisiert

werden kann. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Oligonukleotide und DNA-Synthese wird eine exponentielle Vermehrung des jeweiligen DNA-Bereiches erreicht. Der Einsatz der hitzestabilen DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976) ermöglichte die Automatisierung der PCR.

#### 3.4.14 PCR-Technik mit Plasmid-DNA

Sehr häufig tritt das Problem auf, daß in der zu amplifizierenden Plasmid-DNA keine geeigneten Restriktionsschnittstellen vorhanden sind, um ein benötigtes Fragment klonieren zu können. Diese Schwierigkeit kann umgangen werden, indem das gewünschte DNA-Fragment mit der PCR amplifiziert wird.

##### PCR-Reaktionsansatz:

- < 100 ng dsDNA
- 5 µl 10 x *Taq*-Polymerase-Puffer
- 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> ( 50 mM)
- 1 µl Oligonukleotide 1 (50 pmol)
- 1 µl Oligonukleotide 2 (50 pmol)
- 1 µl dNTP-Mix (je 10,0 mM)
- 0,5 µL *Taq*-Polymerase
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>

Die Ansätze wurden mit 60 µl sterilem Mineralöl überschichtet. Die Amplifikationsreaktion wurde in einem PCR-Thermocycler der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt.

Bei Verwendung der PCR-Technik mit vereinfachtem „hot-start“ wurden die Ansätze erst beim Erreichen von 94 °C in den Thermoblock des Thermocyclers gestellt und für 2 min bei dieser Temperatur gehalten. Danach folgte das Programm. Nach den programmierten Zyklen kühlte der Thermocycler die Proben auf 25 °C ab.

### 3.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Es wurde ein käuflicher HIV-1-Antigen-ELISA (Innotest HIV Antigen mAb; Innogenetics GmbH, Heiden) zum Nachweis des HIV-1 p24 Antigens im Zellkulturüberstand verwendet. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. In die mit humanen polyklonalen Antikörpern gegen HIV beschichteten Reaktionskammern der Mikrotiterplatte wurden 100 µl der Reaktionslösung 1 pipettiert, danach erfolgte die Zugabe von 100 µl des zu untersuchenden Zellkulturüberstandes. Die Platte wurde mittels Klebefolie versiegelt, zur besseren Durchmischung für 1 min mit 200 Upm maschinell geschüttelt und danach für 1 h bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich die Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Reaktionslösung 1 enthält monoklonale biotinylierte murine anti-p24 Antikörper. Durch die humanen Antikörper werden virale Antigene an die Platte gebunden. Die murinen anti-p24 Antikörper binden an das virale Kapsidprotein (p24). Durch fünfmaliges Waschen mit jeweils 300 µl Waschlösung wurden ungebundene Moleküle entfernt. Durch die Biotinylierung der anti-p24 Antikörper kann der Antigen-Antikörper-Komplex Streptavidin binden. In diesem ELISA sind die Streptavidinmoleküle Peroxidase-gekoppelt (Reaktionslösung 2). 200 µl der Reaktionslösung 2 werden für 30 min bei 37 °C in den Plattenvertiefungen inkubiert. Durch fünfmaliges Waschen mit jeweils 300 µl Waschlösung wurden ungebundene Streptavidin-Moleküle entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurde 200 µl Substratlösung in die Reaktionskammer pipettiert. Die bei Raumtemperatur ablaufende Färbereaktion wurde nach 5 min durch Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Färbung der einzelnen Ansätze wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers (MR 5000, Dynatech Laboratories, Denkendorf) als optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

---

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Interface-Peptide und die Wirkung auf HIV-1

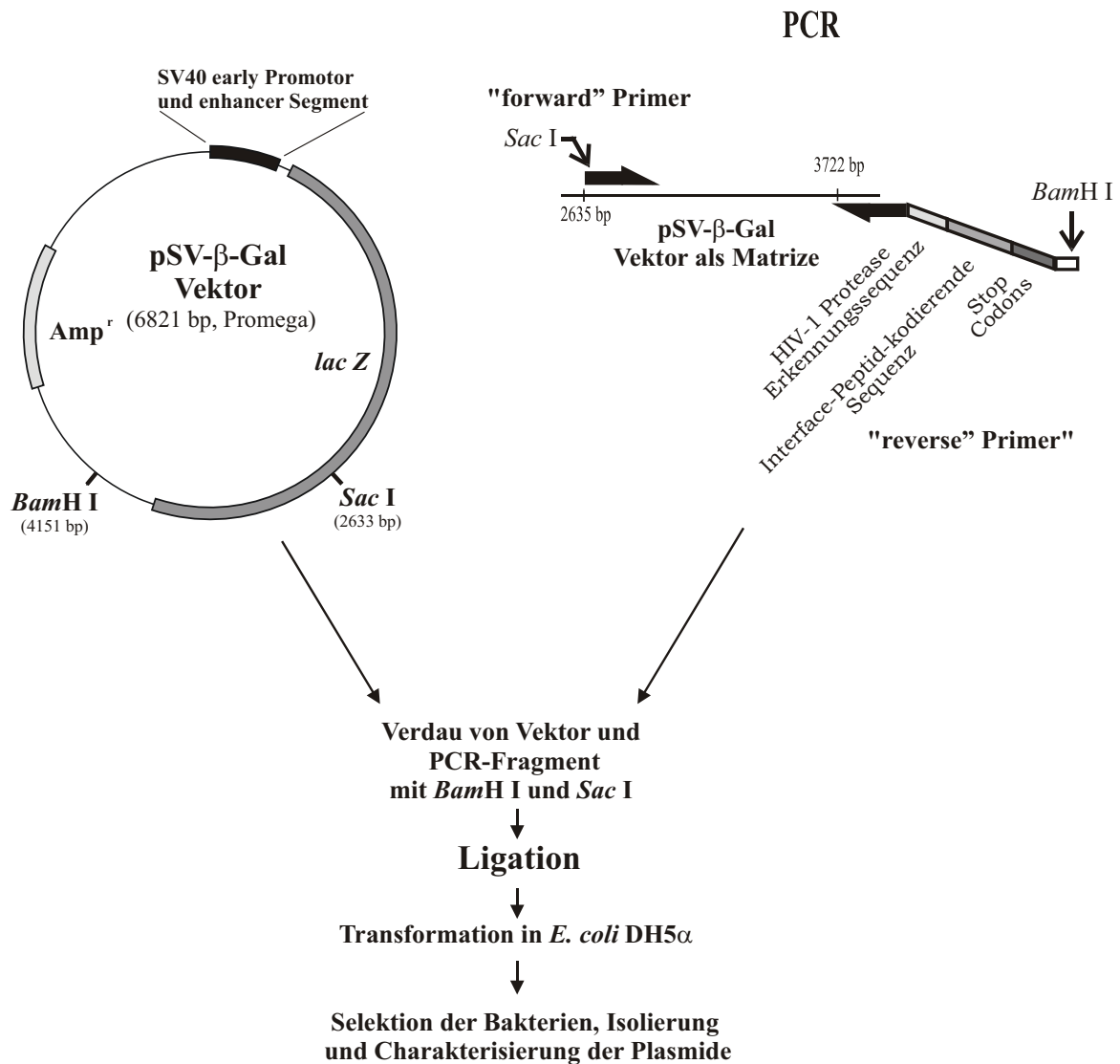
Arbeiten am Deutschen Primatenzentrum zeigten, dass die intrazelluläre Expression von Interface-Peptiden einen antiviralen Effekt in HIV-1 produzierenden eukaryotischen Zelllinien bewirkte. In einem prokaryotischen Nachweissystem, in dem rekombinante HIV-1 Protease und Interface-Peptide koexprimiert wurden, konnte eine direkte inhibitorische Wirkung gegen rekombinante HIV-1 Protease nachgewiesen werden (Ast et al., 1998; Lieder, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die inhibitorische Wirkung intrazellulär exprimierter Interface-Peptide gegen HIV-1 weiter untersucht werden. Dazu wurde die Wirkung der Interface-Peptide in der CD4<sup>-</sup> Zelllinie COS-7 und der CD4<sup>+</sup> Zelllinie LC-5 untersucht. In der CD4<sup>-</sup> COS-7 Zelllinie kommt es nach der Transfektion des proviralen HIV-1 Klon pNL4-3 zur Bildung reifer, infektiöser Viren im Zellkulturüberstand. Die Viren können sich aber aufgrund des fehlenden CD4-Rezeptors nicht an COS-7 Zellen heften und diese infizieren. Durch die Kotransfektion von COS-7 Zellen mit dem molekularen HIV-1 Klon pNL4-3 und Interface-Peptid exprimierenden Vektoren kann untersucht werden, ob die Interface-Peptide einen inhibierenden Effekt auf die Ausbildung reifer, infektiöser Viren haben. Die Verwendung der CD4<sup>+</sup> LC-5 Zelllinie ermöglicht die Gewinnung experimenteller Daten für die Inhibitoren mit Zellen, an denen sich das Virus anheften kann und die durch neugebildete Viren infiziert werden können. Untersuchungen mit LC-5 sind eher vergleichbar mit den *in vivo* Bedingungen, in denen sich HIV-1 an den CD4-Rezeptor von Zellen anheftet und es durch Interaktion mit weiteren zellulären Rezeptoren zur Infektion der Zelle kommt. Für die Untersuchungen wurden die Zellen mit dem molekularen HIV-1 Klon pNL4-3 und verschiedenen Interface-Peptid exprimierenden Vektoren kotransfiziert. Der antivirale Effekt wurde mittels p24-ELISA, Western-Blot Analysen und in Infektionsstudien untersucht.

#### 4.1.1 Verwendete Interface-Peptid exprimierende Vektoren

Für die intrazelluläre Expression der Peptide wurde der Vektor pSV-β-Gal verwendet. Mit Hilfe der PCR-Technik wurden die kodierenden Bereiche der verschiedenen Peptide

hergestellt. Der "forward"-Primer führte eine *Sac* I-Schnittstelle in das PCR-Produkt ein. Der "reverse"-Primer kodierte für eine HIV-1 Proteaseerkennungssequenz, die Sequenz für das jeweilige Peptid und eine *Bam*H I-Schnittstelle. Das Plasmid pSV- $\beta$ -Gal diente als Matrize. Das entstandene PCR-Produkt und das pSV- $\beta$ -Gal Plasmid wurden mit *Sac* I und *Bam*H I verdaut, ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert (Abb. 3).



**Abb. 3 Schematische Darstellung der Herstellung der peptidkodierenden Vektoren**

Amp<sup>R</sup>: Ampicillinresistenz-Gen; SV40: Simian Virus 40.

Die Expression der Peptide erfolgte als Fusionsprotein mit  $\beta$ -Galaktosidase. Zwischen die kodierende Sequenz von  $\beta$ -Gal und des jeweiligen Interface-Peptides wurde ein kodierender Bereich für eine Erkennungssequenz der HIV-1 Protease kloniert. Über diese Proteaseerkenntnissequenz der HIV-1 Protease am C-Terminus der  $\beta$ -Galaktosidase sind die Interface-Peptide fusioniert (Abb. 4).



**Abb. 4 Schematische Darstellung der exprimierten  $\beta$ -Gal-Fusionsproteine mit Interface-Peptid**

PR: Protease; PI: Interface-Peptid

Die Fusion an  $\beta$ -Galaktosidase ermöglichte den Nachweis einer erfolgreichen Transfektion der pSV- $\beta$ -Gal-Vektorkonstrukte durch X-Gal-Färbung der Zellen. Die HIV-1-Proteaseerkenntnissequenz (-D-R-Q-G-T-V-S-P-N-I-P-Q-I-T-) zwischen  $\beta$ -Galaktosidase und Interface-Peptid sollte die Freisetzung des Peptides durch die proteolytische Aktivität der HIV-1 Protease ermöglichen. Die verwendete HIV-Proteaseerkenntnissequenz wurde durch ein Programm zur Vorhersage von Prozessierungsstellen der HIV-1 Protease aus der Arbeitsgruppe von Dr. Schramm (MPI, Martinsried) berechnet. Die Prozessierung dieser Erkennungssequenz durch die virale Protease von HIV-1 wurde durch erkenntnissequenz-enthaltende Fusionsproteine nachgewiesen (Lieder, 1998). Durch die Prozessierungsstelle kann das Interface-Peptid durch die virale Protease abgespalten werden, wenn sie noch nicht durch das fusionierte Peptid gehemmt worden ist.

In der Tab. 8 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der für die Kotransfektionsexperimente verwendeten Interface-Peptid-exprimierenden Vektoren zusammengefasst.

**Tab. 8 Kodierende Abschnitte der Interface-Peptid-exprimierenden Vektoren**

<b>Plasmid</b>	<b>peptidkodierende Nukleotidsequenz</b>	<b>Peptidsequenz</b>
pSV- $\beta$ -Gal-PI 5	ACG ATC ACC TAC AAA TTG	T I T Y K L
pSV- $\beta$ -Gal-PI 7	ACG GTT TCA TAT GAA TTA	T V S Y E L
pSV- $\beta$ -Gal-PI 12	ACG GTT ACA TAC AAG TTC	T V T Y K F
pSV- $\beta$ -Gal-PI 17	ACT GTA ACA TAT GAC TTC	T V T Y D F
pSV- $\beta$ -Gal-PI 24	TAC GAA ATT AGT TAC GAC CTC	Y E I S Y D L
pSV- $\beta$ -Gal-PI 25	TAC GAA TTT AGT TAC GAC CTC	Y E F S Y D L
pSV- $\beta$ -Gal-PI 26	ACA GTA AGT TAC GAC CTC	T V S Y D L
pSV- $\beta$ -Gal-PI 27	ACA GTA ACA TAC GAA CTG	T V T Y E L

Bei den untersuchten Interface-Peptiden handelt es sich um Hexa- und Hepta-Peptide. Die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Peptide richtet sich zum Teil nach publizierten Daten (Schramm et al., 1996). Auf Grund dieser Daten und persönlicher Mitteilungen von Dr. Schramm wurden Sequenzmotive wie -Y E L-, -Y D L- oder Peptidsequenzen wie -T V S Y E L- ausgewählt und die Sequenzen und Motive teilweise durch Aminosäureaustausche verändert.

#### **4.1.2 Inhibitorische Wirkung intrazellulär exprimierter Interface-Peptide in COS-7 Zellen**

Das COS-7 Zellsystem eignet sich gut zur Untersuchung antiviraler Effekte gegen neu entstehende HI-Viren, da es in den Zellen nur zur Virusbildung kommt. Für die Infektion von Zellen durch HIV-1 sind entsprechende Rezeptoren auf der Zelloberfläche notwendig. Fehlen diese, kommt es nicht zur Virusanheftung und damit auch nicht zu weiteren Schritten wie der Infektion neuer Zellen. *In vivo* infiziert das Virus CD4<sup>+</sup> Zellen wie z.B. Lymphozyten und Makrophagen. In der verwendeten CD4<sup>-</sup> COS-7 Zelllinie kann es nach der Transfektion des molekularen HIV-1 Klons pNL4-3 zwar zur Virusbildung kommen, die Viren können aber keine COS-7 Zellen infizieren. Antivirale Effekte sollten im COS-7 System über die



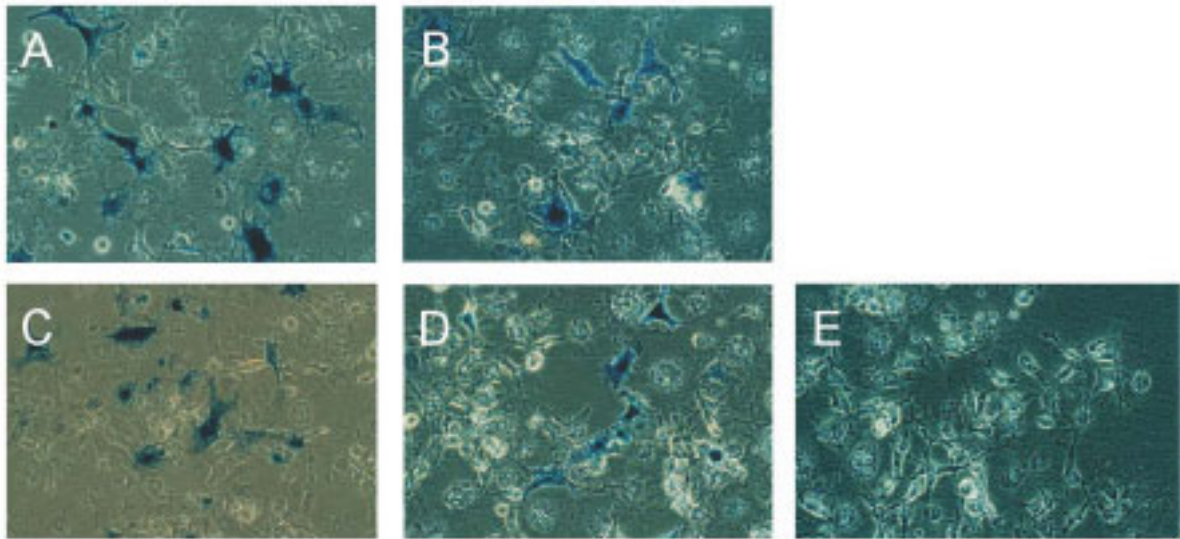
neuentstehende Menge an p24, dem viralen Kapsidprotein (CA) von HIV-1, nachgewiesen werden.

Die CD4<sup>-</sup> COS-7 Zellen wurden mit jeweils einem der pSV- $\beta$ -Gal-PI Vektoren und dem molekularen HIV-1 Klon pNL4-3 kotransfiziert. Die kotransfizierten Zellen wurden dann für die Dauer von drei Tagen kultiviert. Diese Zeitspanne wurde gewählt, da vorhergehende Untersuchungen gezeigt hatten, dass bis zum dritten Tag nach Transfektion eine Zunahme viralen Antigens (p24) zu messen war und danach keine weitere Zunahme von p24 im Überstand stattfand (Lieder, 1998). 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion wurden jeweils 120  $\mu$ l Zellkulturüberstand aus den verschiedenen Ansätzen entnommen und bei -20°C gelagert. Nach Beendigung des Transfektionsversuches wurde über den p24-Gehalt die Menge der neugebildeten HI-Virionen im Überstand transfizierter Zellen nachgewiesen.

#### **4.1.2.1 X-Gal Färbung zur Überprüfung der Kotransfektion**

Als Kontrolle, ob der kotransfizierte pSV-Vektor von den Zellen aufgenommen und das jeweilige Fusionsprotein exprimiert wurde, wurde am 3. Tag eine X-Gal-Färbung der Zellen durchgeführt.

Dazu wurden nach Abnahme der entsprechenden Proben für die p24-ELISA am dritten Tag nach Transfektion, die kotransfizierten Zellen mit PBS gewaschen, fixiert und eine X-Gal Färbung durchgeführt. Die Abb. 5 zeigt Aufnahmen kotransfizierter COS-7 Zellen nach der Farbreaktion.



**Abb. 5 X-Gal-Färbung von COS-7 Zellen zum Nachweis der  $\beta$ -Gal-Fusionsprotein Expression**

Aufnahmen transfizierter COS-7 Zellen nach der Farbreaktion mit X-Gal. A: pSV- $\beta$ -Gal + pNL4-3; B: pSV- $\beta$ -Gal-PI 12 + pNL4-3; C: pSV- $\beta$ -Gal-PI 7 + pNL4-3; D: pSV- $\beta$ -Gal-PI 26 + pNL4-3; E: ohne pSV- $\beta$ -Gal.

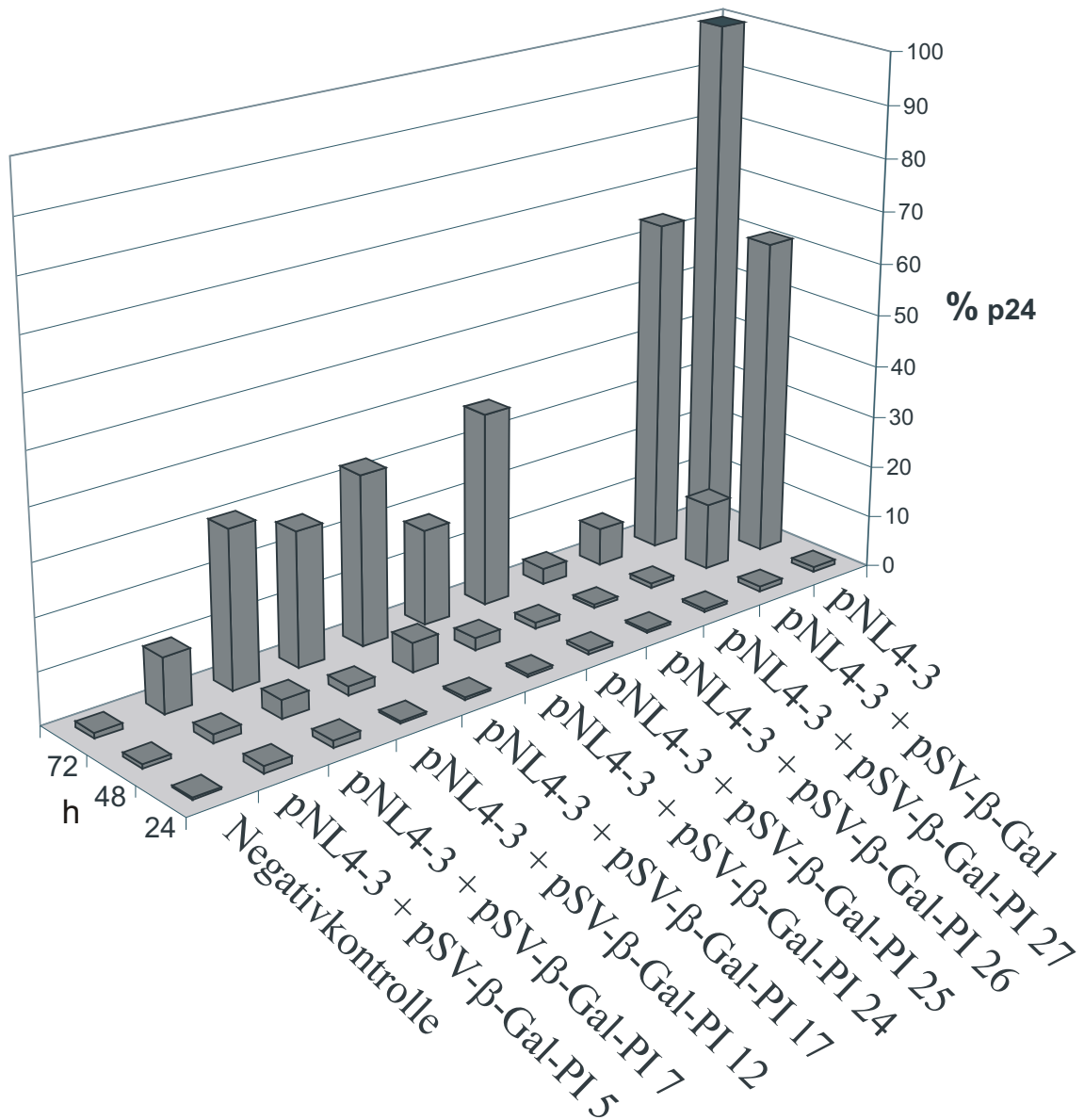
Im lichtmikroskopischen Hellfeld wurden  $\beta$ -Gal exprimierende Zellen durch ihre blaue Färbung detektiert. Die Aufnahme A) in der Abb. 5 zeigt COS-7 Zellen, die mit pSV- $\beta$ -Gal Vektor transfiziert wurden. In den Aufnahmen B), C) und D) sind kotransfizierte COS-7 Zellen dargestellt die  $\beta$ -Gal-Fusionsproteine exprimierten. Zum Vergleich zeigt das Bild E) nur mit H<sub>2</sub>O behandelte COS-7 Zellen als Kontrolle.

Durch den Nachweis X-Gal gefärbter Zellen konnte die Expression der  $\beta$ -Gal-Proteine und damit die erfolgreiche Transfektion der Expressionsvektoren nachgewiesen werden. Zwischen den Ansätzen mit Zellen, die mit pSV- $\beta$ -Gal oder pSV- $\beta$ -Gal-PI transfiziert wurden, gab es keinen Unterschied in der Expressionstärke.

#### 4.1.2.2 Antivirale Effekt der Interface-Peptide in COS-7 Zellen

Die nach den Kotransfektionen ermittelten ELISA-Werte sind in Abb. 6 graphisch dargestellt. In der Abbildung wurde nicht der gemessene p24-Wert in OD (optischer Dichte) des jeweiligen Zellkulturüberstands angegeben, sondern das prozentuale Verhältnis von p24 in den kotransfizierten Ansätzen im Vergleich zur Positivkontrolle, in der COS-7 Zellen mit

pNL4-3 transfiziert wurden. Dieser Bezug ermöglicht einen direkten Vergleich der Ergebnisse verschiedener Transfektionsversuche und die Mittelwertbildung mit den verschiedenen p24-Werten des jeweiligen Interface-Peptids. In der Graphik der Abb. 6 sind die Mittelwerte als Säulen dargestellt.



**Abb. 6 Prozentualer Gehalt an p24 im Zellkulturüberstand transfizierter COS-7 Zellen**

COS-7 Zellen wurden mit 0,1 µg pNL4-3 und 5 µg pSV-β-Gal-PI transfiziert. 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion wurden Proben für den p24-ELISA aus den Kulturüberständen entnommen. Mittelwert gebildet aus n=3.

24 h nach Transfektion zeigten sich keine Unterschiede im p24-Gehalt der verschiedenen Ansätze. 48 h nach Transfektion wurde im Zellkulturüberstand von Zellen, die mit dem molekularen HIV-1 Klon pNL4-3 transfiziert wurden ein deutlicher Anstieg auf 60 % p24 gemessen. Bei den Kotransfektionsansätzen konnte hingegen 48 h nach Transfektion nur ein geringer Anstieg des p24-Gehalts nachgewiesen werden. Für Transfektionen mit pNL4-3 und pSV- $\beta$ -Gal Vektor zeigte sich ein Anstieg des prozentualen p24-Gehaltes auf 10 %. Bei Kotransfektionsansätzen mit pNL4-3 und pSV- $\beta$ -Gal-PI 7 bzw. pSV- $\beta$ -Gal-PI 17 stieg der Gehalt an p24 auf ca. 5 %. Für alle anderen Kotransfektionsansätze wurden p24-Werte von unter 5 % ermittelt.

72 h nach Transfektion zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen. Der Gehalt an p24 im Zellkulturüberstand von COS-7 Zellen, die mit dem pSV- $\beta$ -Gal Vektor und pNL4-3 Plasmid kotransfiziert wurden, betrug 62 % des p24 Gehalts der Positivkontrolle. Allein die Verwendung des Expressionsvektors pSV- $\beta$ -Gal bewirkte demnach bei Kotransfektionen mit pNL4-3 eine Reduktion des p24-Gehalts. Eine wesentlich stärkere Reduktion des p24-Gehalts wurde hingegen in Transfektionsansätzen mit den Interface-Peptiden ermittelt. Im Zellkulturüberstand mit pNL4-3 und pSV- $\beta$ -Gal-PI 5 kotransfizierter COS-7 Zellen wurden 72 h nach Transfektion p24 Werte ermittelt, die unter 10 % der Kontrolle lagen. Transfektionen von pNL4-3 und pSV- $\beta$ -Gal-PI 26 bzw. pSV- $\beta$ -Gal-PI 27 zeigten ebenfalls in der graphischen Auswertung nach 72 h einen p24-Gehalt von unter 10 % im Vergleich zur Positivkontrolle. Die Transfektion mit pSV- $\beta$ -Gal-PI 24 und pNL4-3 ergab einen p24-Gehalt von unter 20 % und Kotransfektionen von pSV- $\beta$ -Gal-PI 7 bzw. pSV- $\beta$ -Gal-PI 12 und pNL4-3 wiesen einen Gehalt von unter 30 % p24 im Vergleich zur Positivkontrolle auf. Einen prozentualen p24-Gehalt im Zellkulturüberstand um die 30 % wurde in COS-7 Zellen gemessen, die mit pSV- $\beta$ -Gal-PI 17 und pNL4-3 transfiziert wurden. Einen p24-Wert um die 35 % wurde für COS-7 Zellen nachgewiesen, die mit pNL4-3 und pSV- $\beta$ -Gal-PI 25 kotransfiziert wurden.

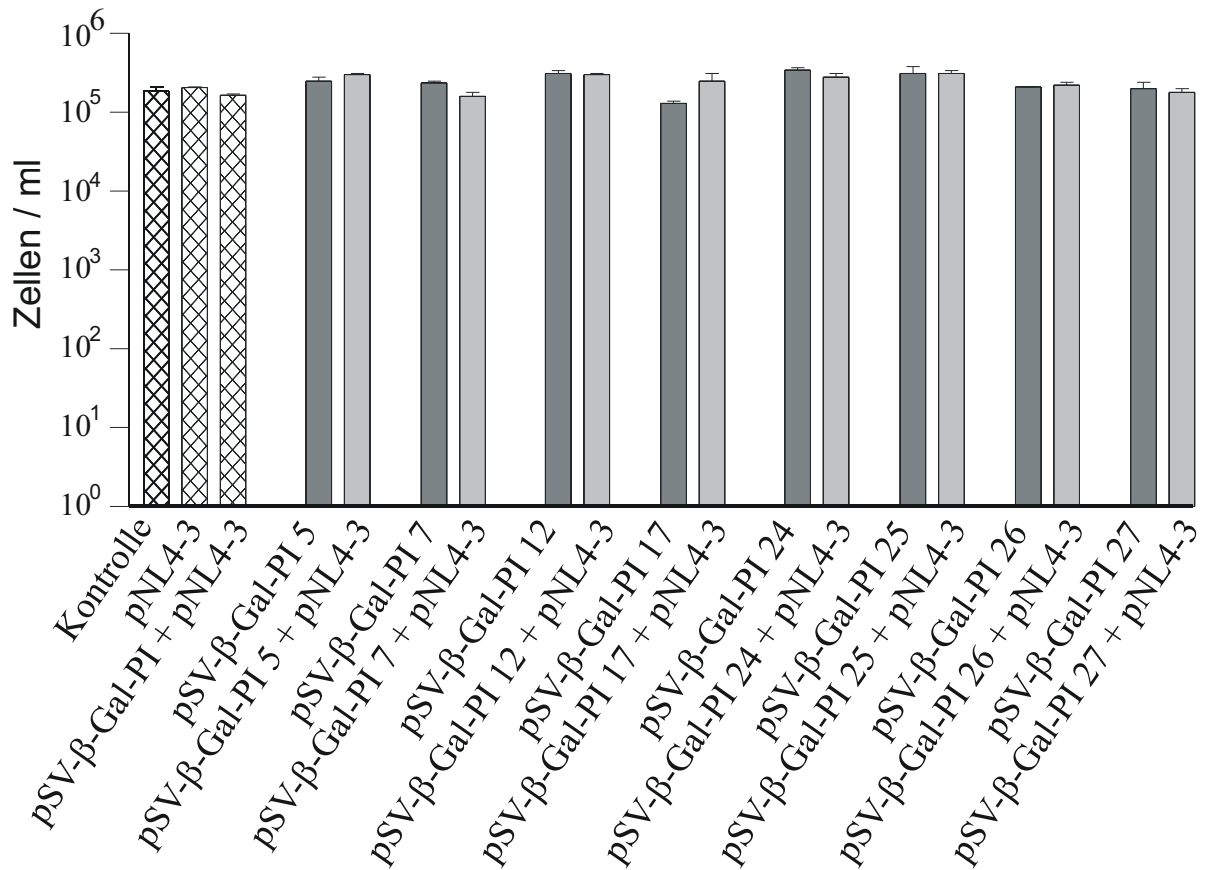
In Kotransfektionsansätzen mit Interface-Peptid-exprimierenden Vektoren lagen die p24-Werte bei 5 % - 35 % des p24-Gehaltes der Positivkontrolle. Somit bewirkte die Expression der Interface-Peptide in HIV-1 produzierenden COS-7 Zellen einen antiviralen Effekt gegen HIV-1. Die Transfektionsexperimente zeigten auch, dass allein die Verwendung des Kontrollplasmids pSV- $\beta$ -Gal zusammen mit pNL4-3 in kotransfizierten COS-7 Zellen zu

einem geringeren Anstieg des p24-Gehalts im Zellkulturüberstand führte. Diese Reduktion des p24-Gehalts ist offensichtlich auf das Vorhandensein von zwei Expressionsplasmiden in den kotransfizierten Zellen zurückzuführen. Da durch die Kotransfektion sowohl die viralen Proteine des pNL4-3 Vektors als auch das  $\beta$ -Gal-Protein des pSV- $\beta$ -Gal Plasmids exprimiert werden, kommt es möglicherweise durch die Aufteilung der Syntheseleistung der Zellen auf zwei Expressionsvektoren zu einer Verringerung der Produktion viraler Proteine. Trotz dieses unspezifischen Effekts ist ein signifikanter Inhibitionseffekt auf die Expression der Interface-Peptide zurückzuführen.

#### **4.1.2.3      Untersuchung der Lebendzellzahl nach Kotransfektion**

Die Kotransfektionsexperimente mit COS-7 Zellen hatten gezeigt, dass die Expression der Interface-Peptide einen antiviralen Effekt auf HIV-1 hatten. Um auszuschließen, dass die Verringerung an p24 im Zellkulturüberstand transfizierter COS-7 Zellen auf einer zytotoxischen Wirkung durch die intrazelluläre Expression der Interface-Peptide beruhte, wurde die Lebendzellzahl 72 h nach Transfektion bestimmt (Abb. 7).

72 h nach Transfektion betrug die Zellzahl in den Ansätzen, die nur mit dem Transfektionsagens behandelt wurden  $3 \times 10^5$  Zellen / ml. Die mit dem molekularen HIV-1 Klon transfizierten COS-7 Zellen erreichten am Versuchsende ebenfalls Werte von ca.  $3 \times 10^5$  Zellen / ml. Die Lebendzellzahlen der Transfektionsansätze mit pSV- $\beta$ -Gal-PI Vektoren, bzw. mit pSV- $\beta$ -Gal und pNL4-3 wiesen gleichfalls Werte um  $3 \times 10^5$  Zellen / ml auf. Somit kam es durch die Verwendung der verschiedenen Vektoren zu keiner nachweisbaren Abnahme der Zellzahl während des Versuchsablaufs. Ein zytotoxischer Effekt der exprimierten Peptide konnte als Grund für den verringerten p24-Gehalt im Überstand damit ausgeschlossen werden.



**Abb. 7 Lebendzellzahl transfizierter COS-7 Zellen am dritten Tag nach der Transfektion**

Die Beschriftung unter den Säulen gibt an, womit die COS-7 Zellen transfiziert wurden. Eingesetzte DNA-Mengen: pNL4-3 0,1 µg; pSV-β-Gal 5 µg; pSV-β-Gal-PI 5 µg. Die Lebendzellzahl wurde nach dem Ablösen der Zellen mittels Zellschaber durch Anfärbung mit Trypanblau ermittelt.

#### 4.1.3 Wirksamkeit der Interface-Peptide gegen HIV-1 in CD4<sup>+</sup> LC-5 Zellen

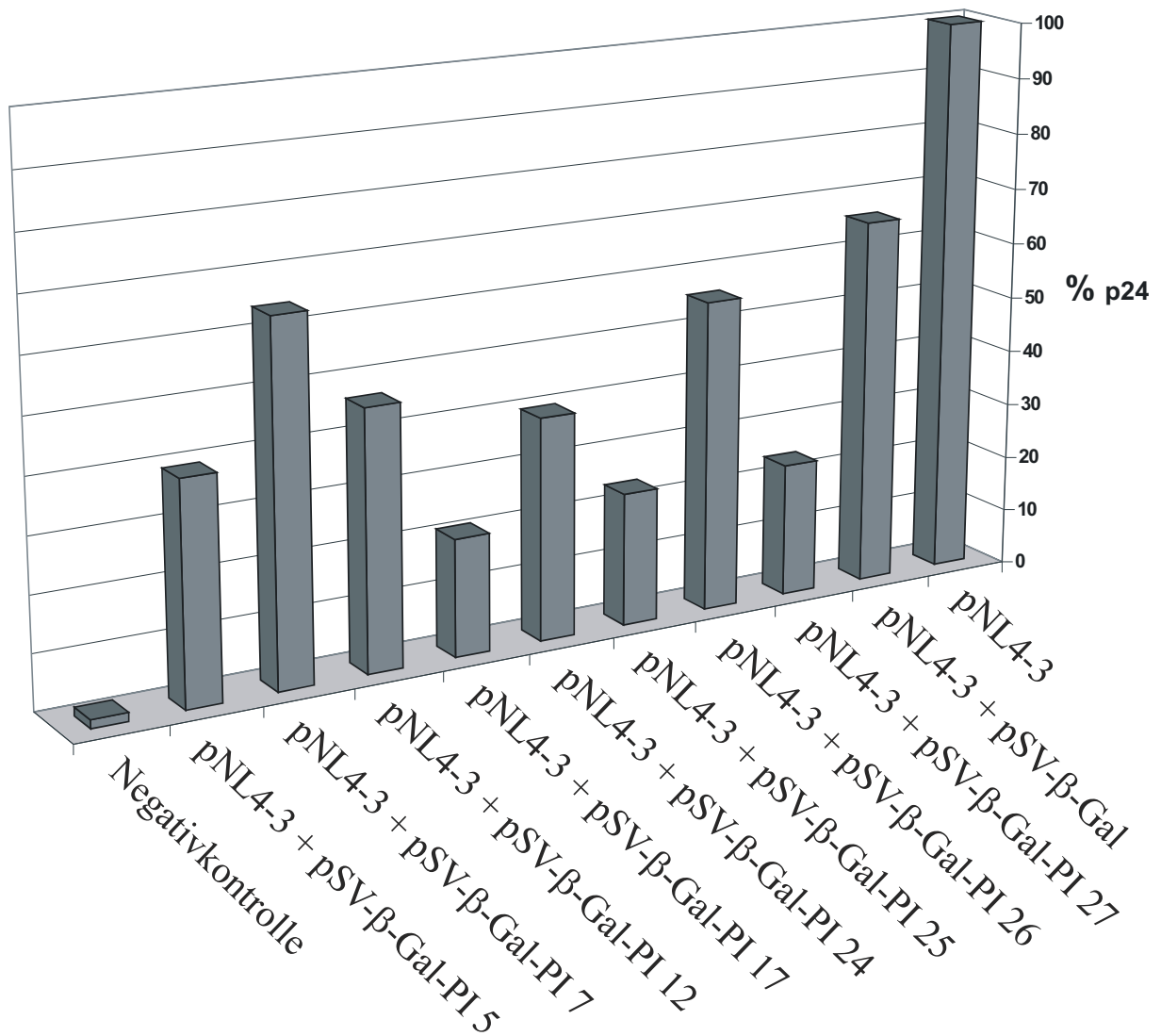
Für die Infektion von Zellen durch HIV-1 sind entsprechende Rezeptoren auf der Zelloberfläche notwendig. Fehlen diese, kommt es nicht zur Virusanheftung und damit auch nicht zur Infektion neuer Zellen. *In vivo* infiziert das Virus CD4<sup>+</sup> Zellen wie z.B. Lymphozyten und Makrophagen. Nach dem Nachweis eines inhibitorischen Effekts gegen HIV-1 in CD4 COS-7 Zellen sollte der antivirale Effekt der Interface-Peptide in einer CD4<sup>+</sup>, HIV-1 suszeptiblen Zelllinie untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurde die humane CD4<sup>+</sup> Zelllinie LC-5 verwendet. Die Verwendung dieser Zelllinie ist eine Annäherung an die *in vivo* Verhältnisse. Durch Inhibitoren der viralen Protease wird die Bildung reifer, infektiöser Viren verhindert. Untersuchungen mit Zelllinien, die durch neuentstehende

---

HI-Viren infiziert werden können, bieten daher die Möglichkeit genau diesen wichtigen Punkt zu untersuchen.

#### **4.1.3.1 Antiviraler Effekt von Interface-Peptiden in LC-5 Zellen**

Die LC-5 Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll wie die COS-7 Zellen transfiziert. Die Abb. 8 zeigt den prozentualen p24-Gehalt der verschiedenen Ansätze 72 h nach Transfektion. Die Kotransfektion von pSV- $\beta$ -Gal und pNL4-3 Plasmid führte zu einem p24-Gehalt im Zellkulturüberstand der kotransfizierten LC-5 Zellen von 65 %. Diese Reduktion des p24-Gehalts entsprach dem Ergebnis der Kotransfektionsansätze mit COS-7 Zellen (Abb. 5). LC-5 Zellen, die mit pSV- $\beta$ -Gal-PI 7 und pNL4-3 transfiziert wurden, wiesen im Überstand einen p24-Gehalt um die 60 % auf, vergleichbar dem Wert der Kontrolle mit pSV- $\beta$ -Gal. Somit hatte die Expression des Interface-Peptides PI 7 keinen signifikanten inhibitorischen Effekt auf den p24-Gehalt und PI 7 zeigte keinen antiviralen Effekt gegen HIV-1 im LC-5 System. Kotransfektionen mit pSV- $\beta$ -Gal-PI 26 und pNL4-3 ergaben 72 h nach Transfektion einen p24-Gehalt von 55 %. Kotransfektionen von LC-5 mit pSV- $\beta$ -Gal-PI 12 und pNL4-3 erreichten nach 72 h einen p24-Gehalt von 45 %. Kotransfektionen mit pSV- $\beta$ -Gal-PI 5 bzw. pSV- $\beta$ -Gal-PI 24 und pNL4-3 wiesen in der graphischen Auswertung einen p24-Gehalt von weniger als 40 % auf. Der p24-Gehalt im Überstand mit pSV- $\beta$ -Gal-PI 25 bzw. pSV- $\beta$ -Gal-PI 27 und pNL4-3 kotransfizierter LC-5 Zellen betrug nach 72 h um die 20 %. Einen Wert von unter 20 % p24 im Zellkulturüberstand bewirkte die Expression von PI 17 in kotransfizierten LC-5 Zellen.



**Abb. 8 Prozentualer p24-Gehalt im Zellkulturüberstand kotransfizierter LC-5 Zellen**

Prozentualer p24-Gehalt im Zellkulturüberstand mit 0,1 µg pNL4-3 und 5 µg pSV-β-Gal-PI kotransfizierter LC-5 Zellen 72h nach der Transfektion. Mittelwert gebildet aus n=3.

In den Untersuchungen mit den CD4<sup>+</sup>, HIV-1 suszeptiblen LC-5 Zellen zeigten die Interface-Peptide PI 17, PI 25 und PI 27 einen deutlichen antiviralen Effekt gegen HIV. Die Expression der Interface-Peptide PI 5, PI 12 und PI 24 bewirkte im Vergleich dazu einen schwächeren antiviralen Effekt. Für die Peptide PI 7 und PI 26 konnte nach Kotransfektionen mit pNL4-3 in LC-5 Zellen kein inhibitorischer Einfluß auf HIV-1 festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu wurde in HIV-1 produzierenden COS-7 Zellen für alle Peptide ein antiviraler Effekt, bei gleichen Mengen transfizierter DNA, nachgewiesen. In der CD4<sup>+</sup>-HIV-1 suszeptiblen LC-5 Zelllinie kann das HI-Virus Zellen infizieren, es kann replizieren. So können nach der Transfektion neu gebildete HI-Viren LC-5 Zellen infizieren, die bei der Transfektion keine Vektorkonstrukte aufgenommen haben. Somit kann die Anzahl



der Zellen ansteigen, die Viren bilden, aber keine Interface-Peptide exprimieren, und im folgenden die Virusmenge zunehmen. Die Potenz des durch das jeweilige Interface-Peptid bewirkten antiviralen Effekts wird so sichtbar. In den CD4-Rezeptor negativen COS-7 Zellen kann es nicht zu einer Infektion von Zellen durch das Virus kommen. Reife infektiöse Viren im Zellkulturüberstand führen nicht zur Neuinfektion von COS-7 Zellen. Auffallend war das es keine offensichtliche Korrelation zwischen den Ergebnissen aus den COS-7 und den LC-5 Zellen gab. Expressionsvektoren, die in COS Zellen einen starken inhibierenden Effekt aufwiesen waren in LC-5 gar nicht oder nur schwach wirksam. Das auffälligste Ergebnis wurde in dieser Beziehung mit PI 26 erzielt, dass in COS-7 Zellen stark und in LC-5 Zellen nur schwach wirksam war. Dies legt die Vermutung nahe, dass unterschiedliche Inhibitionsmechanismen den gewonnen Resultaten zu Grunde liegen.

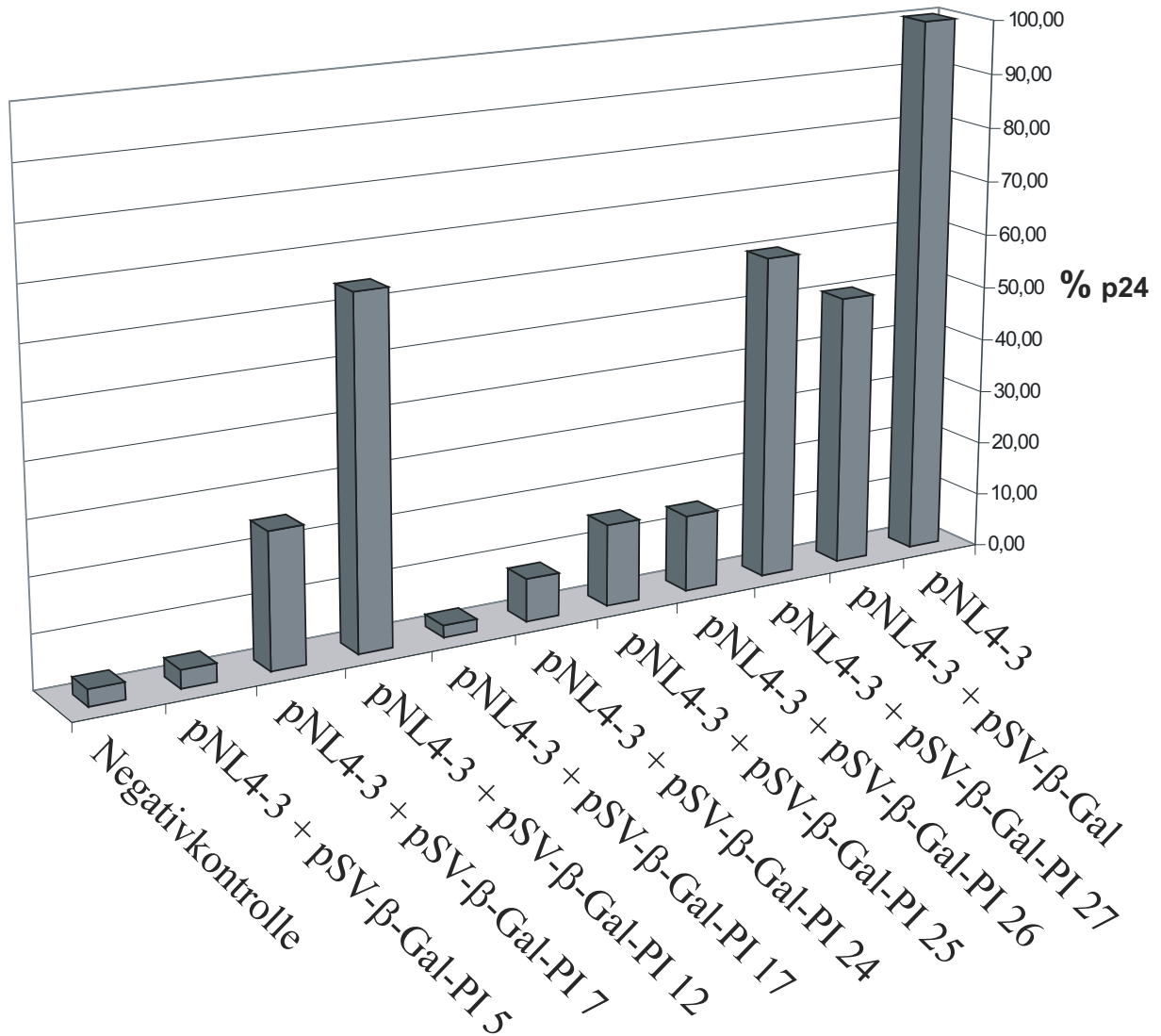
#### **4.1.4 Einfluss der proviralen DNA-Konzentration auf den antiviralen Effekt der Interface-Peptide in COS-7 Zellen**

Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt in der Menge an infektiösen Viren, die im COS-7 und im LC-5 System vorhanden waren. Im Gegensatz zu COS-7 kann das Virus in LC-5 Zellen neue Zellen infizieren und es kommt in der Folge zu einem Anstieg virusproduzierender Zellen. Damit spielt die neuentstehende Virusmenge in LC-5 Zellen eine größere Rolle als in COS-7 Zellen. Die Menge neu entstehender Viren kann in COS-7 Zellen z.T. durch die Applikation höherer DNA-Konzentrationen bei der Transfektion nachgestellt werden.

Die Interface-Peptide zeigten nach Transfektion von COS-7 Zellen (Abb. 6) mit 0,1 µg pNL4-3 DNA und 5 µg pSV-β-Gal-PI des jeweiligen Interface-Peptid-Vektors einen antiviralen Effekt. In Transfektionsversuchen mit LC-5 Zellen und gleichen DNA-Mengen (Abb. 8) zeigten alle bis auf 2 Interface-Peptide eine inhibitorische Wirkung gegen HIV-1. Im Gegensatz zu COS-7 kann das Virus in LC-5 Zellen neue Zellen infizieren, dadurch kann es zu einem Anstieg virusproduzierender Zellen kommen.

In COS-7 Zellen, wo es nicht zu einer Neuinfektion von Zellen durch HI-Viren kommen kann, sollte deshalb untersucht werden, welche Auswirkung ein Anstieg der proviralen DNA auf den Interface-Peptid vermittelten antiviralen Effekt hat. Dafür wurde die transfizierte

provirale Virus-DNA-Menge um den Faktor 10 erhöht (1  $\mu\text{g}$  pNL4-3 DNA) und der p24-Gehalt transfizierter COS-7 Zellen am dritten Tag nach Transfektion gemessen (Abb. 9).



**Abb. 9 Prozentualer p24-Gehalt kotransfizierter COS-7 Zellen nach 72 h**

p24-Gehalt im Zellkulturüberstand mit 1  $\mu\text{g}$  pNL4-3 und 5  $\mu\text{g}$  pSV-β-Gal-PI kotransfizierter COS-7 Zellen 72 h nach der Transfektion. Mittelwerte gebildet aus n=3.

In der graphischen Auswertung zeigte sich, dass nicht für alle intrazellulär exprimierten Peptide eine inhibitorische Wirkung gegen HIV-1 nachgewiesen werden konnte. Bei den Kotransfektionsansätzen mit 1  $\mu\text{g}$  pNL4-3 DNA und 5  $\mu\text{g}$  pSV-β-Gal wurde ein p24-Gehalt im Zellkulturüberstand der transfizierten COS-7 Zellen von ca. 50 %, im Vergleich zur Positivkontrolle bestimmt. Diese Reduktion des p24-Gehalts ist vergleichbar mit den

---

ermittelten Werten in den Kotransfektionen von COS-7 und LC-5 mit jeweils 0,1 µg pNL4-3 und 5 µg pSV-β-Gal.

Der p24-Gehalt im Überstand mit pNL4-3 und pSV-β-Gal-PI 12 bzw. pSV-β-Gal-PI 27 kotransfizierter COS-7 Zellen lag bei ca. 60 %. Somit bewirkt die Expression der Interface-Peptide PI 12 und PI 27 bei Kotransfektion mit 1 µg pNL4-3 in COS-7 Zellen keinen inhibitorischen Effekt. Im Gegensatz hierzu zeigten die anderen Interface-Peptide deutlich niedrigere Werte beim p24-Gehalt im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Die Kotransfektionsansätze mit molekularem HIV-1 Klon pNL 4-3 und pSV-β-Gal-PI 5 bzw. pSV-β-Gal-PI 17 wiesen nur einen p24 Gehalt um 5 % auf. Durch die Expression von PI 24 wurde ein p24-Gehalt unter 10 % im Vergleich zum Kontrollansatz mit pNL4-3 erreicht. Kotransfektionen mit pNL4-3 und pSV-β-Gal-PI 25 bzw. pSV-β-Gal-PI 26 zeigten einen prozentualen Gehalt an p24 von unter 15 % verglichen mit der Positivkontrolle. Kotransfektionsansätze mit pSV-β-Gal-PI 7 erreichten einen p24-Wert im Zellkulturüberstand kotransfizierter COS-7 Zellen von unter 25 %.

Die COS-7 Transfektionsexperimente mit 5 µg pSV-β-Gal-PI und der erhöhten Menge pNL4-3 (1 µg) zeigten, dass die Expression der Interface-Peptide PI 12 und PI 27 keinen antiviralen Effekt hatte. Die Expression der übrigen Interface-Peptide hingegen bewirkte einen antiviralen Effekt gegen HIV-1, im Gegensatz zu den Transfektionsansätzen mit 0,1 µg pNL4-3 und 5 µg pSV-β-Gal-PI, wo für alle Interface-Peptide ein antiviraler Effekt nachgewiesen wurde. Nicht alle exprimierten Interface-Peptide bewirkten einen antiviralen Effekt gegen HIV-1 in COS-7 Zellen mit ansteigender Proviruslast. Die Ergebnisse der Kotransfektionsversuche mit CD4<sup>+</sup> LC-5 Zellen zeigten ebenfalls, dass nicht alle Interface-Peptide eine antivirale Wirkung hatten. Bei den LC-5 Versuchen waren es jedoch nicht, wie bei den COS-7 Versuchen mit erhöhter Proviruslast die Interface-Peptide PI 12 und PI 27, sondern die Interface-Peptide PI 7 und PI 26. Mit beiden Ansätzen konnte eine stärkere Unterscheidung der antiviralen Potenz der verschiedenen Interface-Peptide nachgewiesen werden.

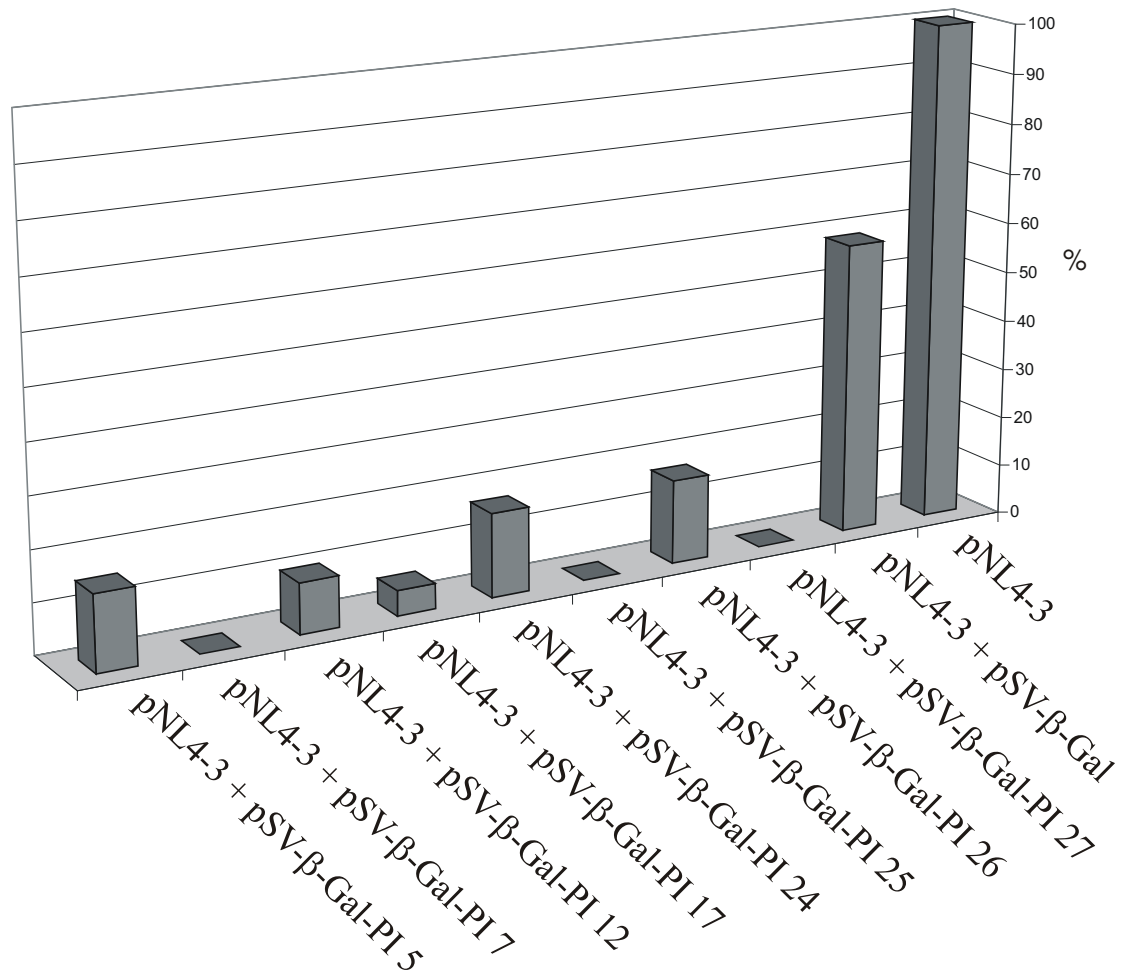
#### 4.1.5 Infektiösität von Virionen aus dem Überstand kotransfiziert LC-5 Zellen

Die in COS-7 und LC-5 Zellen erzielten Ergebnisse zeigten, dass einige der verwendeten Expressionsplasmide eine Inhibition der HIV-Replikation bewirkten. Aus vorausgegangenen Untersuchungen war bekannt, dass einige der Interface-Peptide rekombinante HIV-1 Protease *in vitro* inhibieren und damit vermutlich die Bildung infektiöser Viren. Der Nachweis geringerer p24 Mengen in den Zellkulturüberständen kotransfizierter COS-7 und LC-5 Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle könnte demnach auf eine Hemmung der Protease deuten. Im Infektionstest sollte deshalb untersucht werden, ob die geringere p24-Konzentration mit einer geringeren Infektiösität der virusenthaltenden Zellkulturüberstände korreliert.

Durch Infektionsstudien mit der Zelllinie MT-2 sollte die Infektiösität der Viren im Überstand kotransfizierter LC-5 Zellen untersucht werden. Dieser Test ermöglicht es auch, eine quantitative Aussage hinsichtlich der Menge an infektiösen Virus in einer gegebenen virushaltigen Lösung zu machen. Hierfür wird die Riesenzellbildung in MT-2 Zellen als Nachweis für eine Virusreplikation beobachtet. Der MT-2 Test ist ein etabliertes Nachweisverfahren für Synzytien-induzierende HI-Viren. Durch Verdünnungen der Überstände (Titration), kann man mit Hilfe dieses Tests Aussagen erhalten über die Infektiösität und den Gehalt der Viren im Vergleich zu einer Kontrolle (Harada et al., 1984).

Im vorliegenden Experiment wurden deshalb die Zellkulturüberstände aus den Kotransfektionsversuchen verdünnt und die verschiedenen Verdünnungsstufen in Infektionsversuchen mit MT-2 Zellen eingesetzt. Im zeitlichen Verlauf der Infektion von MT-2 Zellen wurden 5 Tage nach Zugabe der Überstände beginnende Riesenzellbildung nachgewiesen. Ab dem 8. Tag nach Infektion kam es zu keiner weiteren Zunahme der Riesenzellbildung. In Abb. 10 wurden die Daten für den 8. Tag nach Infektion der MT-2 Zellen mit Zellkulturüberständen von kotransfizierten LC-5 Zellen (72 h nach Transfektion) zusammengefasst. Graphisch dargestellt wurden die Ergebnisse der Verdünnungsstufe 1/6. Dies war die höchste Verdünnung, mit der noch Virusreplikation in den verschiedenen Ansätzen nachgewiesen werden konnte. Mit dieser Verdünnungsstufe konnte eine Aussage über den Virusgehalt in den Zellkulturüberständen gemacht werden. Die Prozentangaben beziehen sich, analog der Darstellung der p24-ELISA-Werte auf das prozentuale Verhältnis der Riesenzellbildung (%) zur Positivkontrolle.

Die Überstände aus den Kotretransfektion von LC-5 Zellen mit pNL4-3 und pSV- $\beta$ -Gal bewirkten 1/6 verdünnt eine Riesenzellbildung von ca. 55 % im Vergleich zur Positivkontrolle.



**Abb. 10 Riesenzellbildung in MT-2 Kulturen nach Infektion mit Überständen kotransfizierter LC-5 Zellen**

Die Abbildung zeigt die Verhältnisse in Prozent (%) der MT-2 Riesenzellbildung am 8. Tag nach Infektion der MT-2 Zellen mit Überständen kotransfizierter LC-5 Zellen. Dargestellt sind die Werte für die Verdünnungsstufe 1/6. Die LC-5 Zellen wurden jeweils mit 0,1  $\mu$ g pNL4-3 und 5  $\mu$ g des jeweiligen pSV-  $\beta$ -Gal-PI Vektors transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Überstände für die Infektionsversuche verwendet. Mittelwert gebildet aus n=3.

Riesenzellbildung war bei MT-2 Zellen, die mit Überständen aus den Transfektionsansätzen mit pNL4-3 und pSV-  $\beta$ -Gal-PI 7 bzw. pSV-  $\beta$ -Gal-PI 25 oder pSV-  $\beta$ -Gal-PI 27 infiziert wurden waren bei der Verdünnungsstufe 1/6 kaum nachweisbar. Für Überstände mit pNL4-3 und pSV-  $\beta$ -Gal-PI 17 zeigte sich in den MT-2 Zellkulturen eine Riesenzellbildung von 5 %. Bei den Infektionsansätzen mit Überständen aus Transfektionen mit pNL4-3 und

pSV-  $\beta$ -Gal-PI 12 lag der prozentuale Anteil unter 10 % Riesenzellen. Die Überstände aus Transfektionsansätzen von LC-5 Zellen mit pNL4-3 und pSV-  $\beta$ -Gal-PI 5 bzw. pSV-  $\beta$ -Gal-PI 24 oder pSV-  $\beta$ -Gal-PI 26 bewirkten bei MT-2 Zellen eine Riesenzellbildung um 15 %.

Trotz des beobachteten inhibierenden Effekts auf den LC-5 Zellen, war in allen Überständen infektiöses Virus nachzuweisen. Allerdings waren die Viruskonzentrationen in den einzelnen Ansätzen, ausgehend von dem MT-2 Test, sehr unterschiedlich. Nach Expression der Interface-Peptide PI 17, PI 25 und PI 27 waren im LC-5 Test die niedrigsten p24-Gehalte zu messen gewesen (Abb. 8). Dementsprechend wurde in den Infektionsversuchen auf MT-2 Zellen mit Überständen aus diesen Kotransfektionsansätzen die geringste Riesenzellbildung beobachtet (Abb. 10). Eine entsprechende Korrelation wurde gleichfalls beobachtet bei den Ansätzen mit PI 5, PI 12 und PI 24. Mit den Interface-Peptiden PI 7 und PI 26 mit denen in LC-5 Zellen keine inhibitorischen Effekte nachgewiesen wurden, war ebenfalls eine gegenüber der Kontrolle niedrigere Infektiösität zu beobachten. Das deutet darauf hin, dass PI 7 und PI 26 einen anderen inhibierenden Einfluß auf HIV-1 hatten.

#### **4.1.6 Analyse des p24/p55 Verhältnisses in Viruspartikeln**

Durch Kotransfektionsexperimente mit COS-7 und LC-5 Zellen konnten antivirale Effekte für einige intrazellulär exprimierte Interface-Peptide erreicht werden. Durch Infektionsstudien mit MT-2 Zellen wurde gezeigt, dass die Menge an reifen infektiösen Viren in den Ansätzen mit Interface-Peptid-Expression deutlich geringer war als bei den Kontrollen. Dies könnte durch die Hemmung der viralen Protease bedingt sein. Wenn die HIV-1 Protease gehemmt wäre, sollten im Überstand kotransfizierter Zellen mehr unreife als reife, infektiöse HI-Viren vorhanden sein. Die Untersuchung, ob im Zellkulturüberstand weniger reife Viren vorhanden waren, erfolgte mit der Analyse des p24/p55 Bandenmusters im Western-Blot. Die Reifung der Viren bedingt eine Prozessierung des Vorläuferproteins Gag (p55) in die Strukturproteine. Dadurch kommt es zur Abnahme von p55 und zum Anstieg des Gehalts von MA, CA (p24) und NC.

COS-7 Zellen wurden mit jeweils 0,1  $\mu$ g pNL4-3 und 5  $\mu$ g pSV- $\beta$ -Gal-PI Vektor kotransfiziert. Der p24-Gehalt der verschiedenen Transfektionsansätze wurde 72 h nach

Transfektion mittels p24-ELISA bestimmt. Die Virionen wurden durch Ultrazentrifugation aus dem Überstand angereichert. Dafür wurden die Überstände erst für 10 min bei 1200x g zentrifugiert. Aus den Überständen dieser Zentrifugation wurden über Nacht bei 4 °C mittels Ultrazentrifugation die Viren durch ein 20 %iges Saccharosekissen pelletiert. Das Viruspellet wurde in PBS suspendiert und mit gleichem Volumen reduzierendem Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend in einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Anschließend wurden die viralen Proteine p24 und p55 mittels eines humanen HIV-1 spezifischen Antiserums im Immunoblot nachgewiesen.

#### **4.1.6.1 Analyse der Virionen aus dem Zellkulturüberstand transfizierter COS-7 Zellen**

In allen Präparationen wurden Banden für p24 detektiert. Das virale Vorläuferprotein p55 konnte nicht in allen Ansätzen nachgewiesen werden (Abb. 11).

In der Spur mit pelletierten Viren aus der COS-7 Zelltransfektion mit pNL4-3 zeigte die p24 Bande ein stärkeres Signal als die p55 Bande. Die schwache p55 Bande weist auf eine Prozessierung des Vorläuferproteins p55 (Gag) durch die virale Protease hin. Das Viruspellet aus dem Kontrollansatz von COS-7 mit pSV- $\beta$ -Gal und pNL4-3 zeigte im Western-Blot nur einen geringen Unterschied zwischen der Bandenintensität von p24 und p55. Kotransfektionen mit pNL4-3 und pSV- $\beta$ -Gal-PI des jeweiligen peptidexprimierenden Vektors ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den p24 und p55 Banden. Bei den Transfektionsansätzen mit pSV- $\beta$ -Gal-PI 5, 7, 12 und 17 konnte wie bei den Ansätzen mit pSV- $\beta$ -Gal und pNL4-3 allein auch p55 nachgewiesen werden. Bei den Ansätzen mit pSV- $\beta$ -Gal-PI 24, 25, 26 und 27 konnte die p55 Bande nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 11 Western-Blot mit Viren aus Überständen transfizierter COS-7 Zellen**

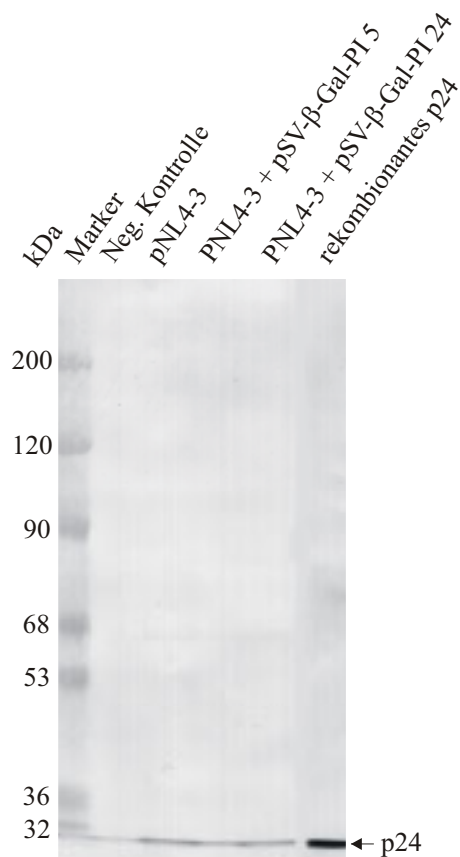
Western-Blot mit humanem Antiserum zum Nachweis viraler HIV-1 Proteine aus dem Überstand transfizierter COS-7 Zellen (0,1 µg pNL4-3; 5 µg pSV-β-Gal-PI); 0,1 µg rek. p24 Protein.

Der Nachweis einer schwachen p55 Bande bzw. das Fehlen der p55 Bande bei einigen Ansätzen zeigt, dass es nicht zu einer Verhinderung der Prozessierung des viralen Vorläuferproteins p55 gekommen ist. Die Western-Blot Untersuchungen der verschiedenen Viruspräparationen aus den Zellkulturüberständen kotransfizierter COS-7 Zellen wiesen keinen p24/p55 Shift nach. In den Zellkulturüberständen befanden sich demnach, reife infektiöse Viren. Nimmt man die p24 Bande als Marker für das Vorhandensein reifer Viren, dann zeigte sich in den Viruspräparationen aus kotransfizierten COS-7 Zellen ein geringerer Gehalt an Viren als bei der Kontrolle (nur mit pNL4-3 transfiziert).



#### 4.1.6.2 Analyse der Virionen aus dem Zellkulturüberstand transfizierter LC-5 Zellen

Die p24/p55 Bandenintensitäten von HI-Viren in ausgewählten Überständen kotransfizierter LC-5 Zellen wurden ebenfalls verglichen. Hierzu wurden Viruspräparationen von LC-5 Zellen, die mit pNL4-3 und pSV- $\beta$ -Gal-PI 5 kotransfiziert wurden (im COS-7 Versuch wurde p55 Bande nachgewiesen) und pNL4-3 und pSV- $\beta$ -Gal-PI 24 (im COS-7 Versuch konnte keine p55 Bande nachgewiesen werden) untersucht. Im Western-Blot wurde nur die p24 Bande in den Spuren nachgewiesen, es wurde kein p55 detektiert (Abb. 12).



**Abb. 12 Western-Blot mit Überständen kotransfizierter LC-5 Zellen**

Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum zum Nachweis viraler HIV-1 Proteine aus dem Überstand transfizierter LC-5 Zellen. Spuren: Marker; Negativkontrolle; 0,1  $\mu$ g pNL4-3; 0,1  $\mu$ g pNL4-3 und 5  $\mu$ g pSV- $\beta$ -Gal-PI 5, 0,1  $\mu$ g pNL4-3 und 5  $\mu$ g pSV- $\beta$ -Gal-PI 24.

Auch in diesen Präparationen waren reife Viren wie bei den COS-7 Viruspräparationen vorhanden. Die Abwesenheit der p55 Bande zeigt, dass keine signifikante Anzahl unreifer, nichtprozessierter Viren in den Überständen vorhanden war.

Der Nachweisprozessierter Virusproteine (p24) und das Nichtvorhandensein einer stärkeren p55 Bande im Vergleich zur Viruskontrolle zeigt, dass in untersuchten Viruspräparationen aus den Zellkulturüberständen kotransfizierter COS-7 und LC-5 Zellen keine Anzeichen einer Hemmung der viralen Proteine nachweisbar waren. Durch Western-Blot Untersuchungen wurde aber bestätigt, dass der Gehalt an reifen Viren in den Kotransfektionsansätzen geringer war als in der Viruskontrollen (nur pNL4-3).

Antivirale Effekte intrazellulärexprimierter Peptide in HIV-1 produzierenden Zelllinien konnten durch die Bestimmung des p24-Gehalts im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Durch die Infektionsstudien mit MT-2 Zellen konnte gezeigt werden, dass sich in den Zellkulturüberständen mit geringeren p24-Gehalten weniger infektiöse Viren als in den Kontrollansätzen befanden. Es konnten jedoch in Western-Blot Experimenten keine Ansammlung unreifer, nicht-infektiöser HI-Viren in diesen Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Für die HI-Viren in den untersuchten Zellkulturüberständen konnte keine Verschiebung des p24/p55 Gehalts aufgezeigt werden, durch die auf eine Hemmung der viralen Protease durch Interface-Peptide in den ausbuddenden Viruspartikeln geschlossen werden könnte. Die experimentellen Daten deuten darauf hin, dass der antivirale Effekt durch die Interface-Peptide schon vor dem Ausknospen der Viruspartikel stattfinden könnte und einen Einfluß auf die Freisetzung von Viren hat.

## 4.2 Untersuchungen zur Verpackung intrazellulär exprimierter nicht-viraler Proteine

Der Frage nach der gezielten Verpackung intrazellulär exprimierter Proteine in neu entstehende HI-Viruspartikel zur Einschleusung von Interface-Peptiden, wurde im zweiten Teil der Arbeit nachgegangen. Zur Untersuchung der Verpackung nicht-viraler Proteine wurde das Gag-Protein von HIV-1 benutzt. Dieses Polyprotein hat alle Eigenschaften, die notwendig sind für eine Verpackung. Es wird posttranslational myristiliert und zur Zytoplasmamembran transportiert, dort bindet es an die Membran (Jacobs et al., 1989; Morikawa et al., 2000). Die Gag-Proteine sind die notwendigen Bausteine für die virale Assemblierung und das Ausknospen aus der Zelle (Ono et al., 2000a). Dieser Prozess sollte für das "drug-targeting" ausgenutzt werden.

Für die Untersuchung zum Transport nicht-viraler Proteine an die Zytoplasmamembran wurde das Reporterprotein EGFP (enhanced green fluorescent protein) verwendet. EGFP ermöglichte die Detektion sowohl durch Fluoreszenzmikroskopie der Zellen als auch durch Western-Blot Analysen verschiedener Zellfraktionen mit EGFP-Antikörper.

Für die Untersuchung der Verpackung nicht-viraler Proteine wurden deshalb zwei EGF-Fusionsproteine Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP und Myr<sup>+</sup>-EGFP kloniert und dann intrazellulär exprimiert. Durch Western-Blot Analysen von Zellfraktionen transfizierter LC-5 Zellen und Virionen aus dem Zellkulturüberstand wurde die Lokalisation der Fusionsproteine in den Zellen und die Verpackung in neuentstehende Viruspartikel untersucht.

### 4.2.1 Herstellung der Expressionsplasmide

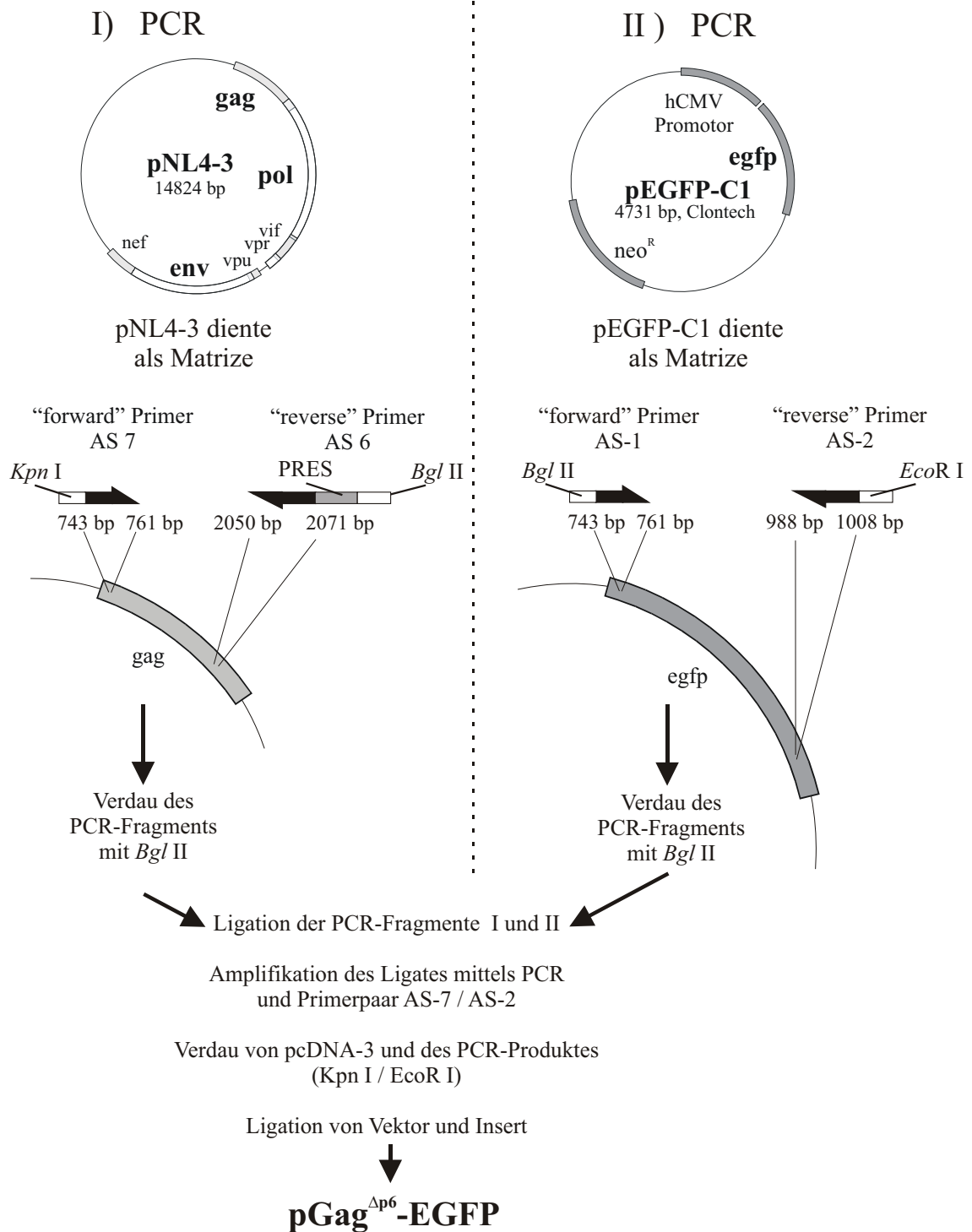
Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation und der Verpackung der EGF-Fusionsproteine in HI-Virionen wurden verschiedene Vektorkonstrukte hergestellt, wobei der Vektor pcDNA-3 als „background“ diente.

Da frühere Untersuchungen gezeigt hatten, dass die Expression von *gag* zur Bildung von viralen Partikeln führt, wurde eine Deletionsmutante hergestellt, von der bekannt ist, dass die Bildung von Partikeln unterdrückt wird (Huang et al., 1995). In dieser Mutante

---

(Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP) wurde das C-terminale Ende des *gag*-Gens, das für das Protein p6 kodiert, deletiert. Dies sollte sicherstellen, dass die Fusionsproteine nicht als "virus like particles" ausbuddeln und damit nicht mehr für eine Verpackung in neu entstehende Viruspartikel zur Verfügung stehen. Zwischen Gag<sup>Δp6</sup> und EGFP enthält das Fusionsprotein eine Prozessierungsstelle mit der Aminosäuresequenz -A R V L A E A M- für die virale Protease von HIV-1.

Für die Herstellung des pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP Plasmids wurde mittels PCR aus dem molekularen HIV-1 Klon pNL4-3 die kodierende Sequenz des *gag* ohne p6 mit dem Primerpaar AS-7 / AS-6 amplifiziert (Abb. 13). Die Primer führten zur Klonierung benötigte Restriktionsendonukleaseschnittstellen und die kodierende Region für die Prozessierungssequenz der HIV-1 Protease ein. Die kodierende Region von EGFP wurde durch PCR mit dem Primerpaar AS-1 / AS-2 aus dem EGFP Expressionsplasmid pEGFP-C1 amplifiziert. Beide PCR-Amplifikate wurden mit *Bgl* II verdaut und anschließend ligiert. Das Ligationsprodukt wurde im Anschluß mittels PCR mit dem Primerpaar AS-7 / AS-2 amplifiziert. Das PCR-Produkt und der Vektor pcDNA-3 wurden mit *Kpn* I / *Eco*R I verdaut und das Fragment in den Vektor ligiert (Abb. 13).



**Abb. 13** Klonierungsschritte zur Herstellung des Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Expressionsplasmids

Angaben des Basenpaares kennzeichnen den Bindungsbereich der Primer; hCMV: humanes Cytomegalovirus; neo<sup>R</sup>: Neomycin-Resistenz; EGFP: enhanced green fluorescent protein; gag: group specific antigen; PRES: HIV-1 Proteaseerkennungssequenz zur Prozessierung.

Das N-terminale Matrixprotein im Gag-Polyprotein hat einen wesentlichen Anteil am Transport des Polyproteins zur Zytoplasmamembran und der Bindung an die Membran. Das

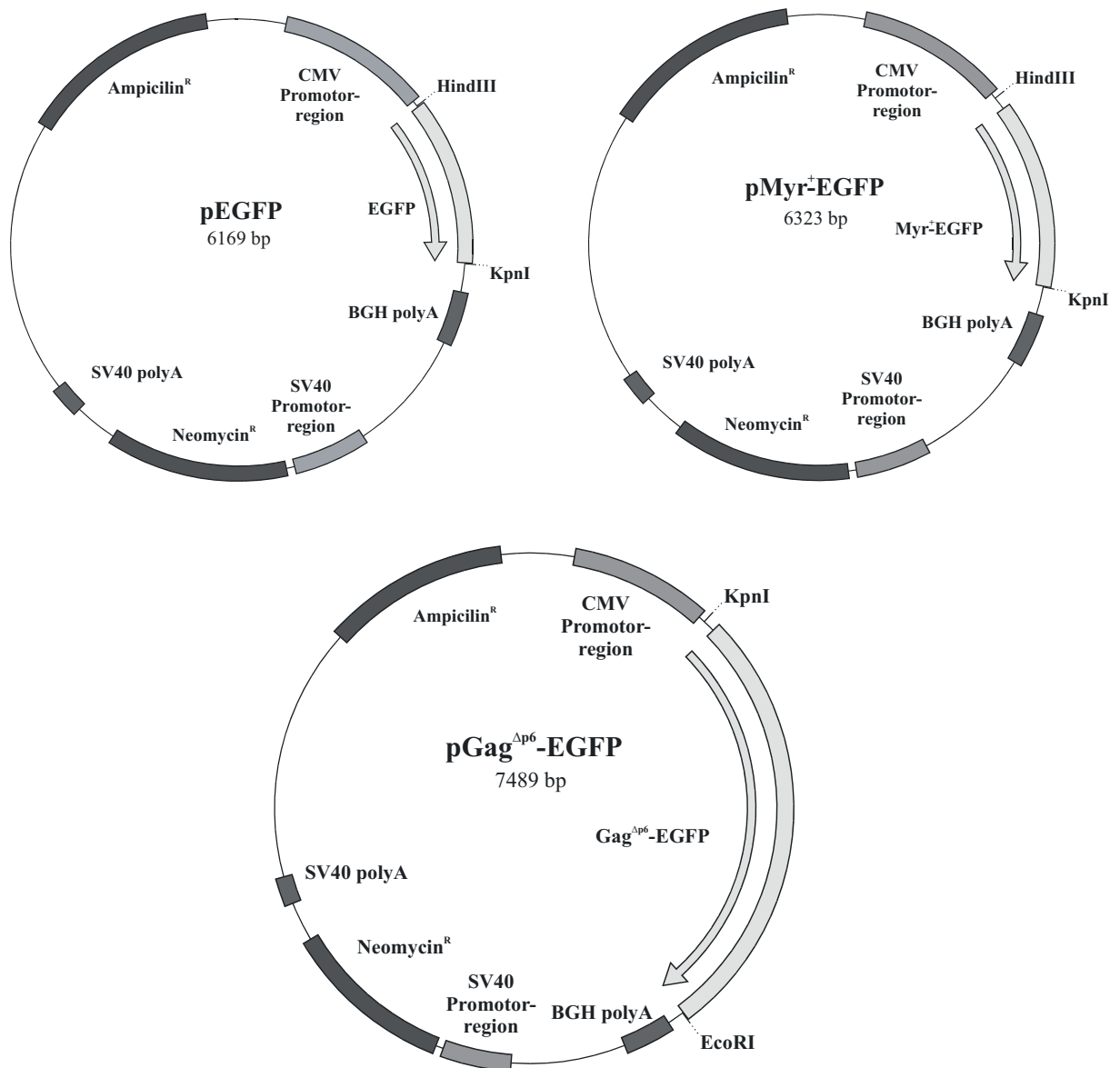
---

Matrixprotein enthält die Myristilierungsstelle und eine basische Region, die wichtig ist für die Anlagerung von Gag an der Zytoplasmamembran (Pal et al., 1990; Ono et al., 2000b). Aus diesem Grund wurden parallel zu Gag<sup>Δp6</sup> auch die Sequenz der ersten 31 Aminosäurereste des Matrixproteins untersucht (in dieser Arbeit kurz als Myr<sup>+</sup> bezeichnet), ob sie zum Transport des Fusionsproteins an die Zytoplasmamembran und für die Verpackung in Viruspartikel eingesetzt werden kann.

Für die Amplifikation der kodierenden Region von Myr<sup>+</sup> wurde, wie bei der Herstellung von pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP, der Vektor pNL4-3 als Matrize verwendet. Durch die PCR mit dem Primerpaar OA44 /OA45 wurde der kodierende Bereich für die ersten 31 Aminosäuren des MA-Proteins amplifiziert und die zur Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen eingefügt. Die kodierende Region für EGFP wurde wie für pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP amplifiziert, der Primer AS-1(*Hinf*I) führt bei dieser Reaktion eine Restriktionsschnittstelle für *Hinf*I ein. Beide PCR-Fragmente wurden *Hinf*I verdaut und anschließend ligiert. Das Ligationsprodukt wurde mit dem Primerpaar OA44 / AS-2 amplifiziert. Das PCR-Produkt und der pcDNA-3 Vektor wurden anschließend mit *Hind* III / *Eco*R I verdaut und ligiert.

Als Kontrollvektor wurde ein pEGFP Expressionsplasmid hergestellt. Mittels PCR mit dem Primerpaar GFP I / AS-2 wurde aus dem Vektor pEGFP-C1 die kodierende Region für EGFP mit den zur Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen amplifiziert. Das PCR-Produkt und der Vektor pcDNA3 wurden mit *Hind* III / *Eco*R I verdaut und ligiert.

In der Abb. 14 sind die verwendeten Expressionsplasmide mit ihren kodierenden Eigenschaften zusammengefasst.

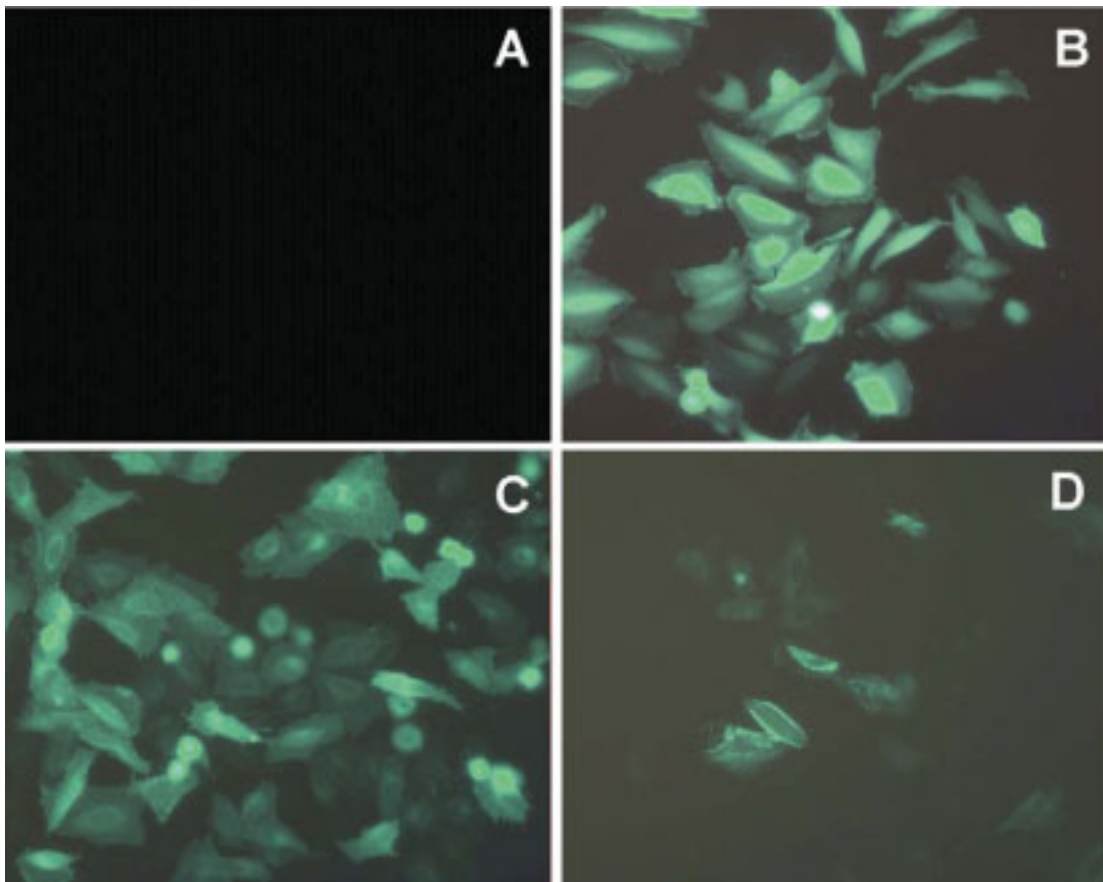


**Abb. 14** Vektorkarten der verwendeten Plasmide

Die Proteine wurden durch den pcDNA3-Vektor exprimiert. Gag<sup>Ap6</sup>: Gag ohne C-terminales Protein p6; Myr<sup>+</sup>: N-terminal die ersten 31 Aminosäuren des Matrix-Proteins (MA) mit Myristilierungssignal und basischer Domäne; EGFP: enhanced green fluorescent protein; BGH polyA: bovine growth hormon polyA; SV40 polyA: Simian virus 40 polyA.

#### 4.2.2 Untersuchung zur Expression der EGF-Proteine

Nach der Sequenzierung der Expressionsvektoren wurde zuerst deren Funktion überprüft. Hierzu wurden LC-5 Zellen mit 1 µg des jeweiligen Vektors transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie auf die Expression der EGF-Proteine untersucht (Abb. 15).



**Abb. 15 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transfizierter LC-5 Zellen**

24 h nach Transfektion; A: Negativkontrolle (untransfizierte LC-5 Zellen); LC-5 Zellen transfiziert mit B: 1 µg pEGFP; C: 1 µg pMyr<sup>+</sup>-EGFP; D: 1 µg pCDNA-Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass LC-5 Zellen nach Transfektion mit den Vektorkonstrukten EGF-Proteine exprimierten. Die Anzahl der Zellen, die nach Transfektion mit pEGFP, pMyr<sup>+</sup>-EGFP und pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP EGF-Proteine exprimierten, war in den Ansätzen annähernd gleich. Auffallend war jedoch, dass die Fluoreszenzstärke in LC-5 Zellen, die mit pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP transfiziert wurden, bei vielen Zellen sehr schwach war. Nur ein geringer Teil der Zellen wies eine Fluoreszenzstärke auf (Abb. 15 D), die vergleichbar war mit der in Myr<sup>+</sup>-EGFP bzw. EGFP exprimierender Zellen beobachteten Fluoreszenzstärke (Abb. 15 B/C).

Weitere Unterschiede wurden in der intrazellulären Lokalisation der einzelnen Proteine beobachtet. Während Zellen, die EGFP exprimierten, ein gleichmäßiges Leuchten über den Gesamtkörper aufwiesen, wurde die Fluoreszenz der Fusionsproteine Myr<sup>+</sup>-EGFP und

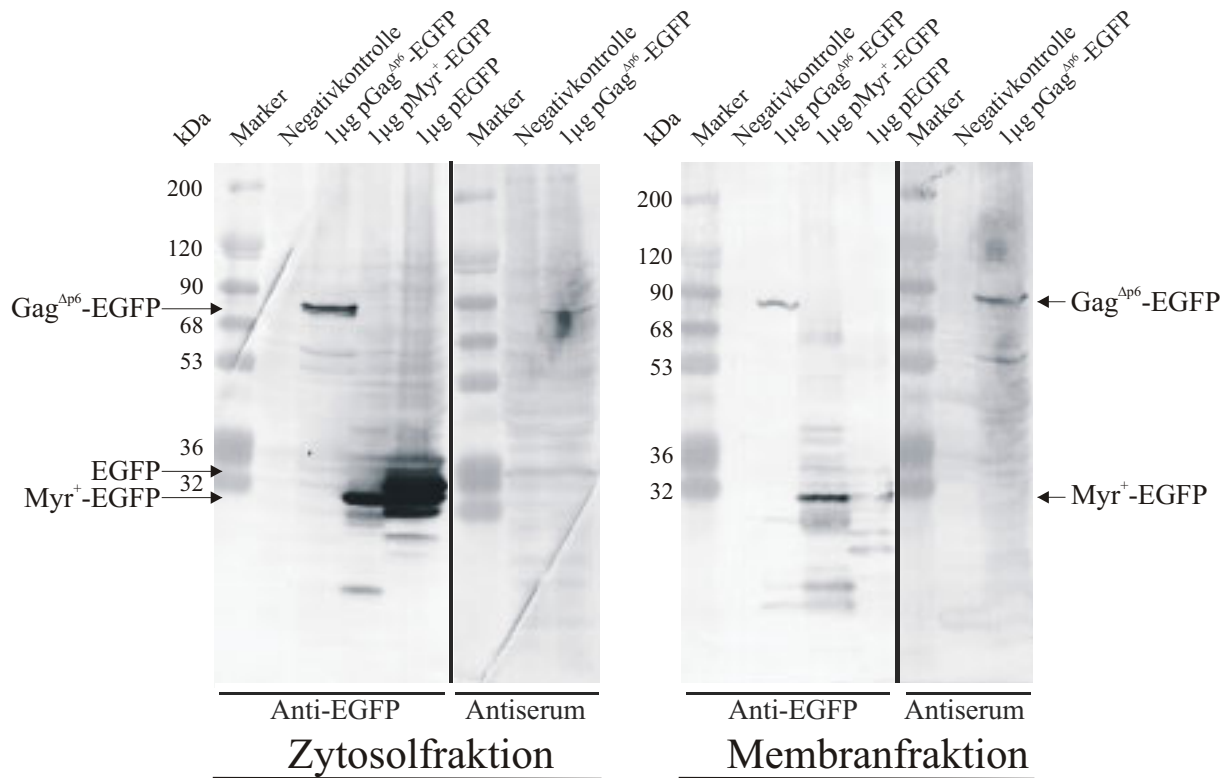


Gag<sup>Ap6</sup>-EGFP eher an zellulären Membranen nachgewiesen. Myr<sup>+</sup>-EGFP exprimierende Zellen wiesen deutliche Konzentrationen von Fluoreszenzsignalen an der Zytoplasmamembran aber auch an der Kernmembran auf. In den Gag<sup>Ap6</sup>-EGFP exprimierenden Zellen war das Fusionsprotein fast ausschließlich im Bereich der Zytoplasmamembran lokalisiert.

Die Fusion von EGFP mit den viralen leader-Sequenzen Gag<sup>Ap6</sup> bzw. Myr<sup>+</sup> bewirkt eine Konzentrierung der Proteine an den Zellmembranen, wohingegen EGFP allein über die gesamte Zelle verteilt vorlag.

#### **4.2.2.1 Expressionsnachweis der verschiedenen EGF-Proteine mittels Western-Blot**

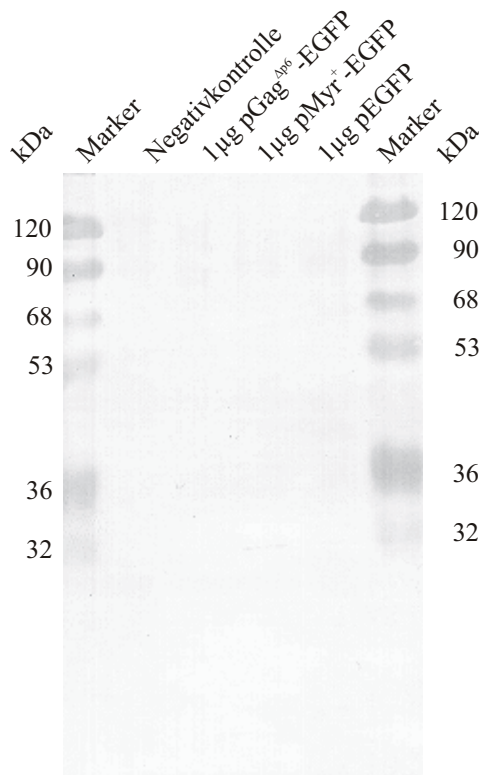
Der Nachweis der EGF-Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie hatte gezeigt, dass die Zellen erfolgreich transfiziert und die Proteine in den Zellen exprimiert wurden. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigten Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen EGF-Proteine innerhalb der Zelle. Zur weiteren Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der EGF-Proteine wurden LC-5 Zellen, die mit dem entsprechenden Vektor transfiziert worden waren, 24 h nach Transfektion mit PBS gewaschen und anschließend mittels LSEB lysiert. Das Lysat wurde in Membran- und Zytosolfraktion getrennt, und beide Fraktionen sowie der Zellkulturüberstand wurden mittels Western-Blot mit anti-EGFP Antikörper und humanem HIV-1 spezifischen Antiserum untersucht.



**Abb. 16 Western-Blot zum Nachweis der Expression der EGF-Proteine in LC-5 Zellen**

LC-5 Zellen wurden mit 1  $\mu\text{g}$  des entsprechenden Plasmids transfiziert und 24 h nach der Transfektion wurden Membran- und Zytosolfraktion präpariert und mittels Western-Blot mit anti-EGFP Antikörper bzw. humanem HIV-1 spezifischen Antiserum untersucht.

Im Western-Blot (Abb. 16) konnte in den Spuren mit Proteinen aus Transfektionsansätzen mit 1  $\mu\text{g}$  pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP in der Membran- und Zytosolfraktion eine Proteinbande im Bereich zwischen den 68 kDa und 90 kDa Markerproteinen nachgewiesen werden. Das rechnerische Molekulargewicht von Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP liegt bei ca. 80 kDa [Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP = Gag (55 kDa) - p6 (6 kDa) + Erkennungssequenz + EGFP (27 kDa)]. Aufgrund der Laufhöhe der Bande und der Detektion des Proteins durch den EGFP-Antikörper und das humane HIV-1 spezifische Antiserum (Abb. 16) handelt es sich um Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP. In den Spuren mit Proteinen aus Zytosolfractionen von pMyr<sup>+</sup>-EGFP und pEGFP Transfektionen wurden mit dem EGFP-Antikörper starke Proteinbanden auf Höhe des 32 kDa Markerproteins nachgewiesen. Diese Laufhöhe liegt im Bereich des entsprechenden Molekulargewichts von Myr<sup>+</sup>-EGFP und EGFP. Der Nachweis der Myr<sup>+</sup>-EGFP und EGFP Proteine im Western-Blot mit EGFP-Antikörper ergab die in der Abb. 16 gezeigten typischen Bandenmuster.



#### Abb. 17 Western-Blot mit Zellkulturüberständen transfizierter LC-5 Zellen

Western-Blot mit EGFP-Antikörpern. LC-5 Zellen wurden mit 1 µg des jeweiligen Vektors transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Proteine aus den Zellkulturüberständen der transfizierten Zellen durch Ultrazentrifugation über ein 20 % Saccharosekissen pelletiert und im Western-Blot nachgewiesen.

Im Western-Blot mit Proteinen aus dem Zellkulturüberstand transfizierter LC-5 Zellen konnten 24 h nach Transfektion keine EGF-Proteine im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 17). Es kam nicht zum Ausbuddeln von Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Partikeln in den Zellkulturüberstand.

Die Western-Blot Analysen bestätigten das fluoreszenzmikroskopische Bild transfizierter LC-5 Zellen. Danach wiesen die verschiedenen intrazellulär exprimierten Proteine eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation auf. Während für EGFP in der Zytosolfraction starke Banden nachgewiesen wurden, war dieses Protein in der Membranfraction nur gering vertreten. Myr<sup>+</sup>-EGFP konnte sowohl in der Zytosol- als auch in der Membranfraction nachgewiesen werden, wobei die Bande der Membranfraction schwächer ausgeprägt war. Für Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP wurden die schwächsten Bandensignale nachgewiesen. Wie bei Myr<sup>+</sup>-EGFP war auch bei Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP die Bande in der Membranfraction schwächer als in der Zytosolfraction. Die fluoreszenzmikroskopisch sichtbare geringere Fluoreszenz von

---

Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP im Vergleich zu Myr<sup>+</sup>-EGFP und EGFP wurde durch den Nachweis schwacher Proteinbanden durch die Western-Blot Analysen bestätigt. 24 h nach Transfektion konnten in den Zellkulturüberständen keine EGF-Proteine nachgewiesen werden.

#### **4.2.3 Nachweis der Lokalisation von EGF-Proteinen in kotransfizierten LC-5 Zellen und Viruspartikeln**

Nachdem die Expression der verwendeten Konstrukte durch Fluoreszenzmikroskopie und Western-Blot Untersuchungen nachgewiesen war, sollte untersucht werden, ob eine Verpackung der verschiedenen EGF-Proteine in HI-Viruspartikel stattfand. Hierzu wurden CD4<sup>+</sup> LC-5 Zellen mit 1 µg der verschiedenen Expressionsvektoren und verschiedenen Mengen des molekularen HIV-Klons pNL4-3 kotransfiziert. Durch Western-Blot Analysen der Zytoplasma- und Membranfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen sollte die Lokalisation der EGF-Proteine intrazellulär nachgewiesen werden. Mit Western-Blot Analysen von Viruspartikeln aus dem Zellkulturüberstand sollte analysiert werden, ob EGF-Proteine in Viruspartikel verpackt wurden. Zum Nachweis der EGF-Proteine wurden Western-Blot Untersuchungen mit EGFP-Antikörper durchgeführt. Western-Blot Untersuchungen mit einem humanen HIV-1 spezifischen Antiserum wurden zum Nachweis viraler Proteine und des Gag<sup>Δp6</sup>-EGF-Fusionsproteins durchgeführt.

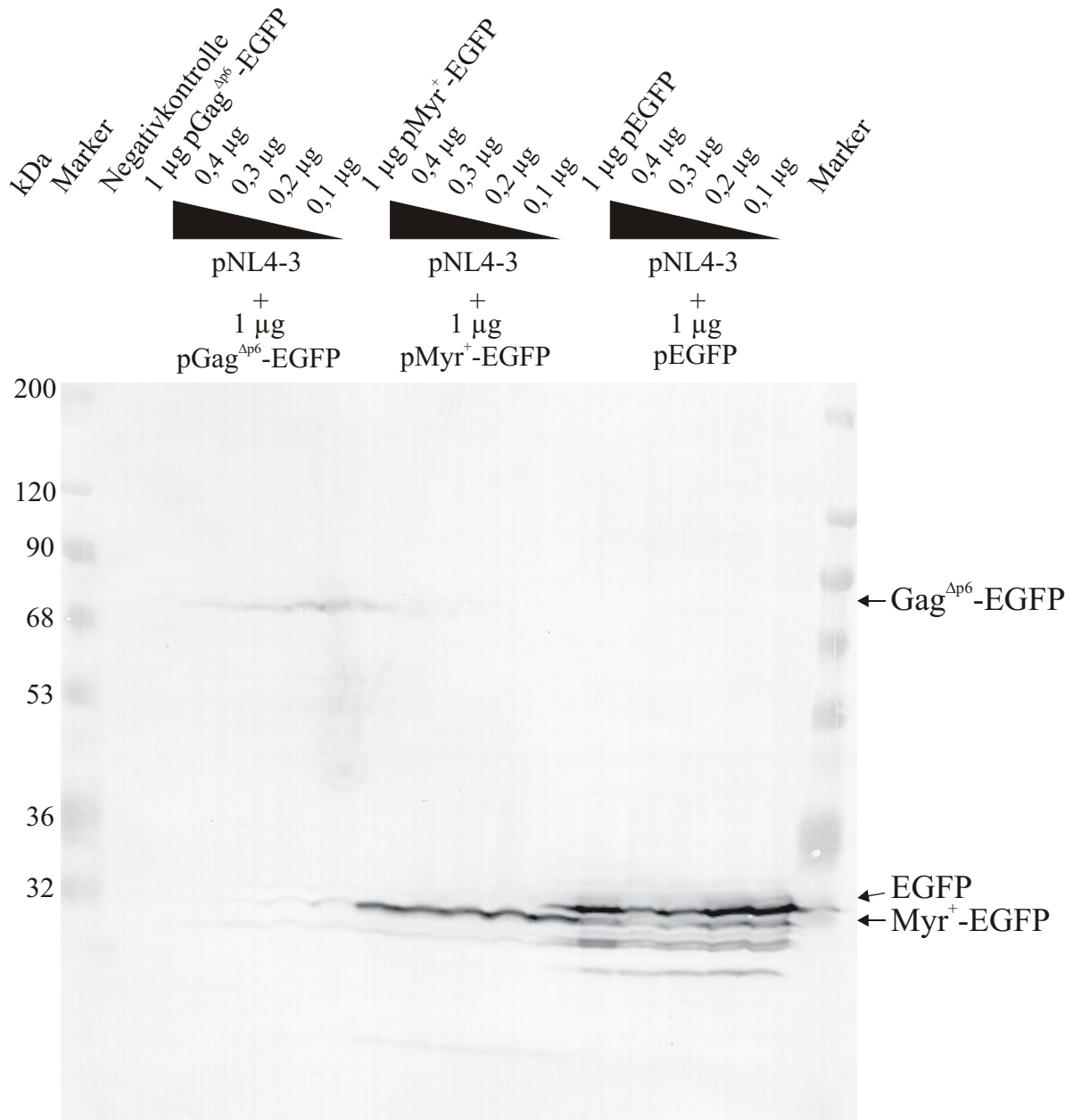
LC-5 Zellen wurden jeweils mit 1 µg Plasmid-DNA der verschiedenen Vektoren und 0,1 µg, 0,2 µg, 0,3 µg bzw. 0,4 µg pNL4-3 kotransfiziert. Es wurden 0,1 µg pNL4-3 Plasmid transfiziert, vergleichbar den Ansätzen zur antiviralen Wirkung von intrazellulärexprimierten Interface-Peptiden. Die bis 0,4 µg ansteigenden pNL4-3 DNA-Mengen wurden eingesetzt, um einen evtl. Verpackungseffekt mit der Zunahme der Virusbildung erkennen zu können. 48 h nach der Transfektion wurden die kotransfizierten Zellen lysiert. Das Zelllysate wurde in Zytosol- und Membranfraktion getrennt und im Western-Blot mit EGFP-Antikörper und humanem HIV-1 spezifischen Antiserum analysiert. Die Viruspartikel aus dem Zellkulturüberstand wurden durch Ultrazentrifugation über ein 20 % Saccharosekissen pelletiert und ebenfalls durch Western-Blot Analysen untersucht.

#### 4.2.3.1 Lokalisation von EGF-Proteinen in der Zytosolfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen

Die Western-Blot Untersuchungen der Zytosolfractionen kotransfizierter LC-5 Zellen mit anti-EGFP Antikörpern zeigten Unterschiede in der nachgewiesenen Menge an EGFP und EGF-Fusionsproteinen in den verschiedenen Transfektionsansätzen (Abb. 18). In der Spur mit Proteinen aus der Transfektion mit 1 µg pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP ohne Kotransfektion von pNL4-3 fand sich nur ein schwaches Bandensignal für Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP. In den Kotransfektionsansätzen mit 1 µg pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP und verschiedenen Mengen an molekularem HIV-1 Klon pNL4-3 nahm die Menge an Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP in der Zytosolfraktion mit Verringerung der transfizierten Menge an pNL4-3 zu.

Die Proteinbanden der Kotransfektionsexperimente mit pNL4-3 und pMyr<sup>+</sup>-EGFP liefen im Bereich des 32 kDa Markerproteins. Es zeigte sich kein Unterschied in der Bandenintensität von Myr<sup>+</sup>-EGFP in den verschiedenen Ansätzen. Die Kontrolle mit pMyr<sup>+</sup>-EGFP und die pMyr<sup>+</sup>-EGFP Kotransfektionsansätze wiesen im Western-Blot ein gleiches Banden- und Intensitätsmuster auf. Neben einer 32 kDa Bande wurden noch weitere schwächere Banden, die auf einen Abbau des Proteins deuten, unterhalb des 32 kDa Markerproteins durch den EGFP-Antikörper erkannt.

In den Spuren mit Proben aus Transfektionsansätzen mit pEGFP und pNL4-3 wurden ebenfalls Proteinbanden im Bereich des 32 kDa Markerproteins nachgewiesen. In der Zytosolfraktion mit 1 µg pEGFP transfizierter LC-5 Zellen konnte im Western-Blot eine starke Bande bei 32 kDa nachgewiesen werden. Unterhalb dieser Bande wurden weitere schwächere Bande nachgewiesen. Bandenvergleiche zwischen Spuren mit Proben aus den pEGFP-Kotransfektionen und der pEGFP Kontrolle wiesen eine Zunahme der 32 kDa Bande bei den Kotransfektionen mit Abnahme der eingesetzten pNL4-3 Menge auf. Unterhalb von 32 kDa zeigten die Kotransfektionen ein vergleichbares Bandenmuster wie die Kontrolle mit pEGFP.



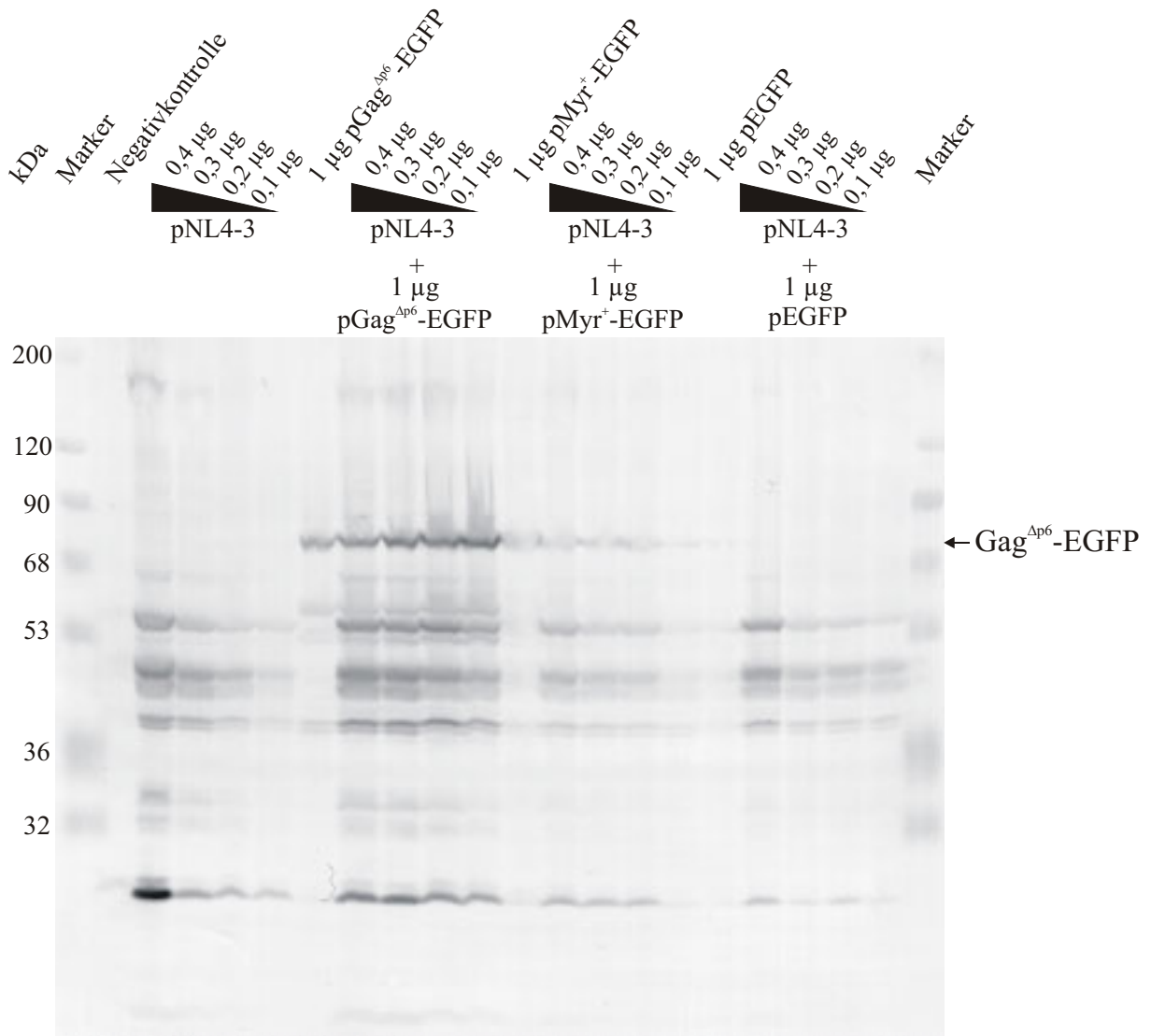
**Abb. 18 Anti-EGFP Western-Blot der Zytosolfraction kotransfizierter LC-5 Zellen**

Zytosolfractionen kotransfizierter LC-5 Zellen. Die für die Kotransfektionen eingesetzten Mengen an DNA stehen über der jeweiligen Spur des Western-Blots.

Das Laufverhalten von Myr<sup>+</sup>-EGFP und EGFP unterschied sich nur gering. Die Myr<sup>+</sup>-EGFP-Bande lief unterhalb der EGFP-Bande, worauf dieses abweichende Laufverhalten beruhte konnte nicht geklärt werden (s. Diskussion).

In der Abb. 19 ist der Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum der Zytosolfractionen abgebildet. Die Spuren mit Proben der Kontrolltransfektion von LC-5

Zellen mit pNL4-3 zeigten eine Abnahme der viralen Proteine mit Verringerung der eingesetzten DNA-Menge.



**Abb. 19 Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum der Zytosolfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen**

Zytosolfractionen kotransfizierter LC-5 Zellen. Die für die Kotransfektionen eingesetzten Mengen an DNA stehen über der jeweiligen Spur des Western-Blots.

In der Zytosolfraktion der Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Kontrolle wurde wie im Western-Blot mit EGFP-Antikörper ein Bandensignal für Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP detektiert. Proben der Kotransfektionen mit pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP und pNL4-3 zeigten eine schwache Zunahme der Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP-Bandenstärke je weniger pNL4-3 DNA transfiziert wurde. Ebenfalls mit Reduktion der pNL4-3 Menge

konnte eine schwache Abnahme der viralen Proteinbanden nachgewiesen werden. Diese Abnahme der viralen Proteine war jedoch schwächer als bei der pNL4-3 Kontrolle. In den Spuren mit Proben aus Kotransfektionen mit pMyr<sup>+</sup>-EGFP konnte nur die Abnahme viraler Proteine im Zytosol mit Verringerung der transfizierten pNL4-3 Menge nachgewiesen werden. Die virale *leader*-Sequenz von Myr<sup>+</sup>-EGFP wurde vom humanen HIV-1 spezifischen Antiserum nicht erkannt. Die Transfektionsansätze mit pEGFP zeigten für die Kontrolle mit EGFP allein keinen Nachweis durch das humane HIV-1 spezifische Antiserum. Die Kotransfektionsansätze wiesen eine Abnahme der viralen Proteine mit der Verringerung der transfizierten DNA-Menge auf.

Alle drei verschiedenen EGF-Proteine konnten in der Zytosolfraction nachgewiesen werden. Während im Western-Blot mit EGFP-Antikörper für die Ansätze mit pMyr<sup>+</sup>-EGFP und pEGFP starke Bandensignale detektiert werden konnten, waren Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Banden kaum nachweisbar. Die Western-Blot Untersuchungen bestätigen damit die Fluoreszenzaufnahmen, in denen mit pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP transfizierte LC-5 Zellen kaum Fluoreszenz im Zytosol zeigten. Für mit pEGFP und pMyr<sup>+</sup>-EGFP transfizierte LC-5 Zellen konnte hingegen Fluoreszenz im Zytosol beobachtet werden.

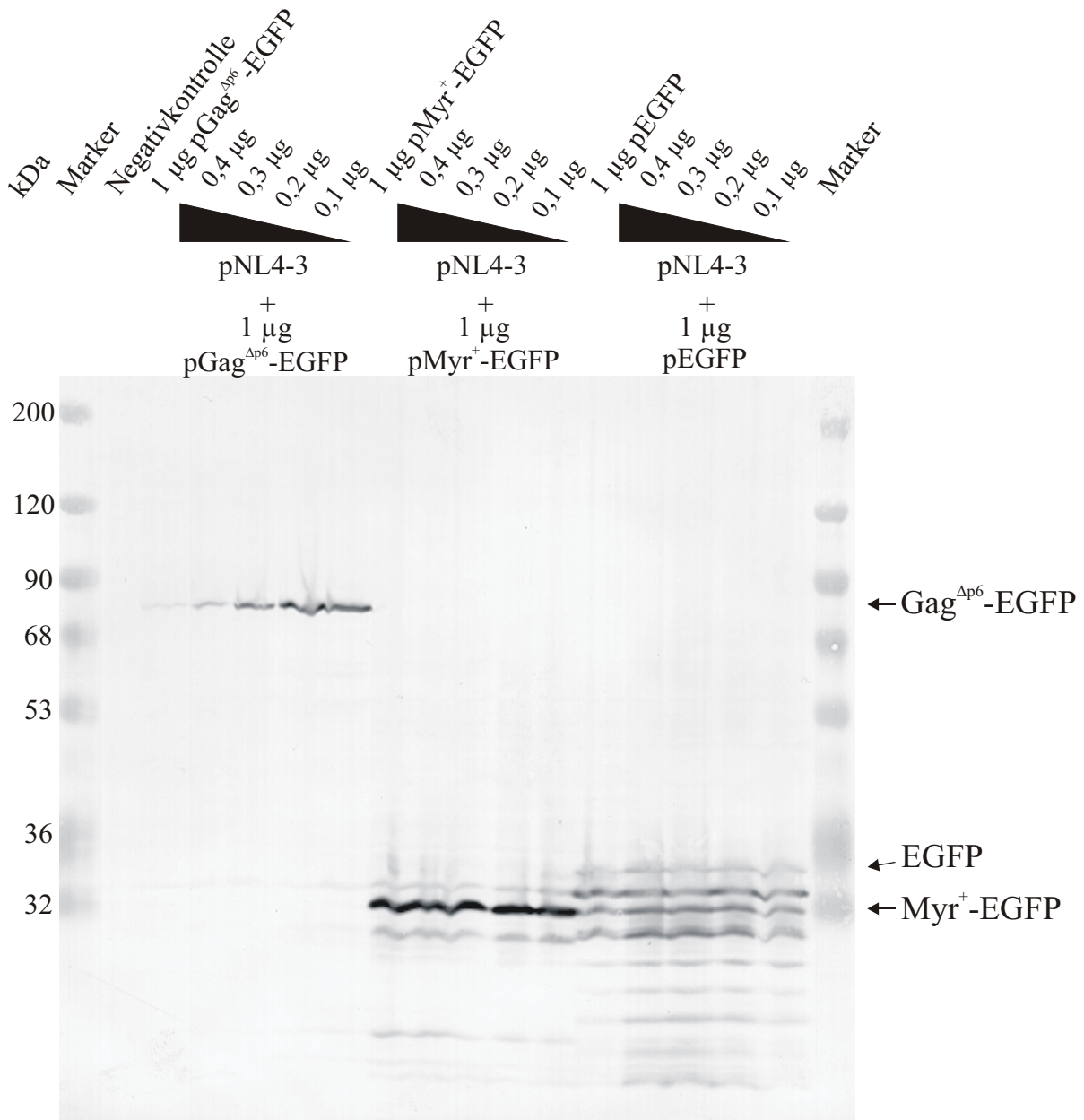
#### **4.2.6 Lokalisation von EGF-Proteinen in der Membranfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen**

Im Gegensatz zur Zytosolfraction, die überwiegend Nicht-Membranbestandteile enthält, finden sich in der Membranfraktion vorwiegend Membranbestandteile und Proteine, die mit Membranen interagieren. Die Western-Blot Analysen der verschiedenen Membranfraktionsproben dienten dem Nachweis, ob EGF-Proteine in den Membranfraktionen vorhanden waren.

Mit dem anti-EGFP Western-Blot wurde in den Spuren mit Proben von pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP transfizierten LC-5 Zellen Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP in der Membranfraktion nachgewiesen (Abb. 20). Für die Membranfraktion der Kontrolltransfektion mit pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP allein wurde nur eine schwache Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Bande nachgewiesen. Im Vergleich zur Kontrolle war die Expression



des Fusionsproteins Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP in den Kotransfektionsansätzen stärker. Die Bandenstärke nahm mit Verringerung der transfizierten pNL4-3 Menge zu.



**Abb. 20 Anti-EGFP Western-Blot der Membranfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen**

Membranfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen. Die für die Kotransfektionen eingesetzten Mengen an DNA stehen über der jeweiligen Spur des Western-Blots.

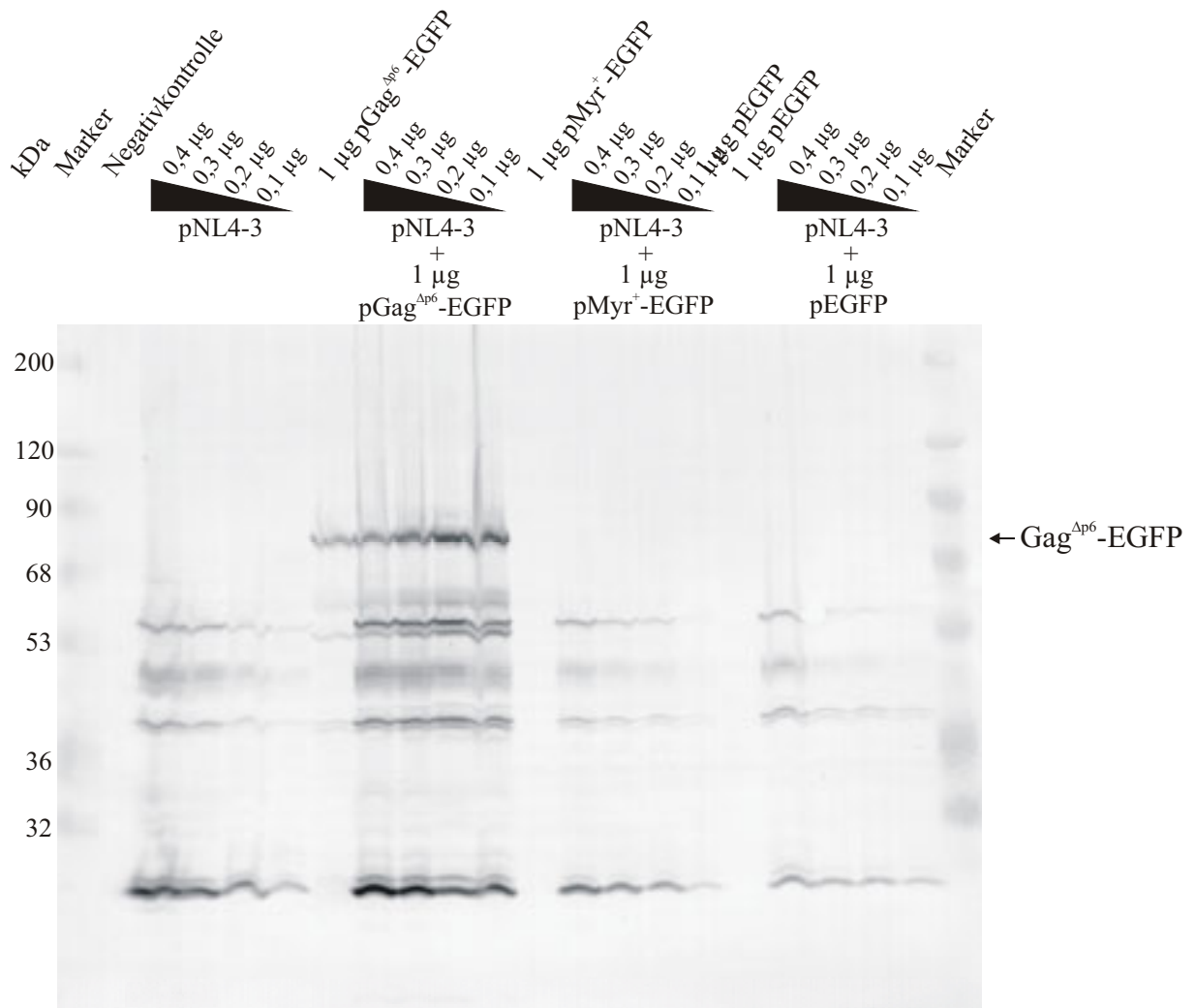
Durch den anti-EGFP-Antikörper wurden im Western-Blot starke Myr<sup>+</sup>-EGFP-Banden in der Membranfraktion nachgewiesen. Die stärksten Bandensignale liefen auf Höhe des 32 kDa-Markers. Die Kontroll- und Kotransfektionsansätze mit pMyr<sup>+</sup>-EGFP wiesen annähernd

gleiche Bandenintensitäten an Myr<sup>+</sup>-EGFP auf. Die transfizierte Menge pNL4-3 DNA hatte keinen Einfluss auf die Stärke der Proteinbanden.

Auch in den Membranfraktionen der EGFP-Transfektionen wurden EGF-Proteine nachgewiesen. Die Bandenintensität der EGFP-Kontrolle und der Kotransfektionen waren gleich. Durch die Transfektion verschiedener pNL4-3 Mengen zeigten sich keine Unterschiede in den Ansätzen.

Mittels Western-Blot konnte gezeigt werden, dass alle drei EGF-Proteine in der Membranfraktion vorhanden waren. Die stärksten Proteinbanden wiesen die Ansätze mit Myr<sup>+</sup>-EGFP und EGFP auf. Für die Ansätze mit Myr<sup>+</sup>-EGFP wurde eine starke Hauptbande um die 32 kDa und einige schwächere Banden detektiert. In den EGFP-Ansätzen wurden hingegen drei gleichstarke Banden im Bereich des 32 kDa Markers und kleinere schwächere Banden vom Antikörper erkannt. Im Gegensatz dazu wurde in den Membranfraktionen der Ansätze mit pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP nur eine Bande durch den EGFP-Antikörper nachgewiesen, d.h. es wurden keine nachweisbaren Prozessierungen oder Abbauprozesse des Fusionsproteins detektiert. Ebenfalls zeigte sich nur bei diesen Ansätzen eine Zunahme der Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Bande mit Verringerung der transfizierten pNL4-3 Menge.

In der Abb. 21 ist der Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum der Membranfraktionen dargestellt. Die Untersuchung der Kontrolle (nur pNL4-3) durch die Western-Blot Analyse mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum zeigte, dass die Menge viraler Proteine in der Membranfraktion mit der Verringerung der transfizierten proviralen HIV-1 DNA pNL4-3 abnahm.



**Abb. 21 Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum der Membranfraktionen kotransfizierter LC-5 Zellen**

Membranfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen. Die für die Kotransfektionen eingesetzten Mengen an DNA stehen über der jeweiligen Spur des Western-Blots.

In allen vier Spuren der pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP / pNL4-3 kotransfizierten Ansätze konnten virale Proteine nachgewiesen werden. Die Proben zeigten eine Abnahme von Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP in der Membranfraktion mit Zunahme der transfizierten DNA-Menge an pNL4-3 (Abb. 21). Die Intensität der p24 und Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Banden unterschied sich bei den Ansätzen. Die Ansätze mit 0,4 μg bzw. 0,3 μg pNL4-3 DNA und 1 μg pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP wiesen stärkere p24 Banden im Vergleich zu den Ansätzen mit 0,2 μg bzw. 0,1 μg pNL4-3 auf. Bei der Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Bande verhielt es sich genau umgekehrt, hier war die Intensität bei den Ansätzen mit 0,2 μg und 0,1 μg stärker. In den Membranfraktionen der Transfektionsansätze mit pMyr<sup>+</sup>-EGFP und pEGFP wurden nur virale Proteine durch das humane HIV-1 spezifische Antiserum erkannt. Wie auch schon beim Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum der

Zytosolfraction (Abb. 19), konnte Myr<sup>+</sup>-EGFP nicht durch das Serum nachgewiesen werden. Bei diesen Ansätzen zeigte sich, wie bei den Kontrolltransfektionen mit pNL4-3, eine Abnahme viraler Proteine mit der Verringerung der transfizierten pNL4-3 Menge.

Die Bandenintensität der Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP-Banden war im Western-Blot der Membranfraktion mit EGFP-Antikörper stärker als im Western-Blot der Zytosolfraction. Sowohl in der Zytosolfraction als auch in der Membranfraktion kam es zu einer Zunahme der Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP-Bandenstärke mit Verringerung der transfizierten Menge an pNL4-3. Jedoch zeigte die Bandenstärke von Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP in den Western-Blot Untersuchungen der Membranfraktion mit EGFP-Antikörper die stärkere Membranlokalisierung des Fusionsproteins.

Der Vergleich der Ergebnisse der Western-Blot Untersuchungen mit EGFP-Antikörper für die Ansätze mit pMyr<sup>+</sup>-EGFP zeigte ebenfalls, dass die Myr<sup>+</sup>-EGFP-Bandensignale in der Membranfraktion deutlich stärker waren, als die der Zytosolfraction. In Western-Blots mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum konnte Myr<sup>+</sup>-EGFP nicht nachgewiesen werden. In der Zytosol- und Membranfraktion zeigte sich nur die Abnahme viraler Proteine mit Verringerung der transfizierten proviralen HIV-1 DNA-Menge (pNL4-3).

Durch Western-Blot Analysen mit humanem HIV-1 spezifischen Serum konnte EGFP nicht nachgewiesen werden. Die Western-Blots zeigten aber wie bei den anderen Transfektionsansätzen eine Abnahme viraler Proteine mit Verringerung der transfizierten pNL4-3 Menge. Durch Western-Blot Untersuchungen mit EGFP-Antikörpern für die Transfektionsansätze mit pEGFP hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der EGF-Proteinbanden in Zytosol- und Membranfraktion aufgezeigt werden. Damit bestätigten die Ergebnisse der Western-Blot Analysen die Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 15). EGFP transfizierte Zellen wiesen ein gleichmäßiges Leuchten über die gesamte Zelle auf, wohingegen Myr<sup>+</sup>-EGFP in der Zelle und etwas stärker an zellulären Membranen fluoreszierte. Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP hingegen war stärker membranlokalisiert. Durch die Kotransfektion mit pNL4-3 kam es zur Steigerung der Expression von Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP im Vergleich zur Transfektion von pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP allein. Eine Steigerung der Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP-Expression oder höhere Stabilität des Fusionsproteins durch die Kotransfektion und Expression viraler Proteine durch den proviralen HIV-1 Klon pNL4-3 kann nicht ausgeschlossen werden.

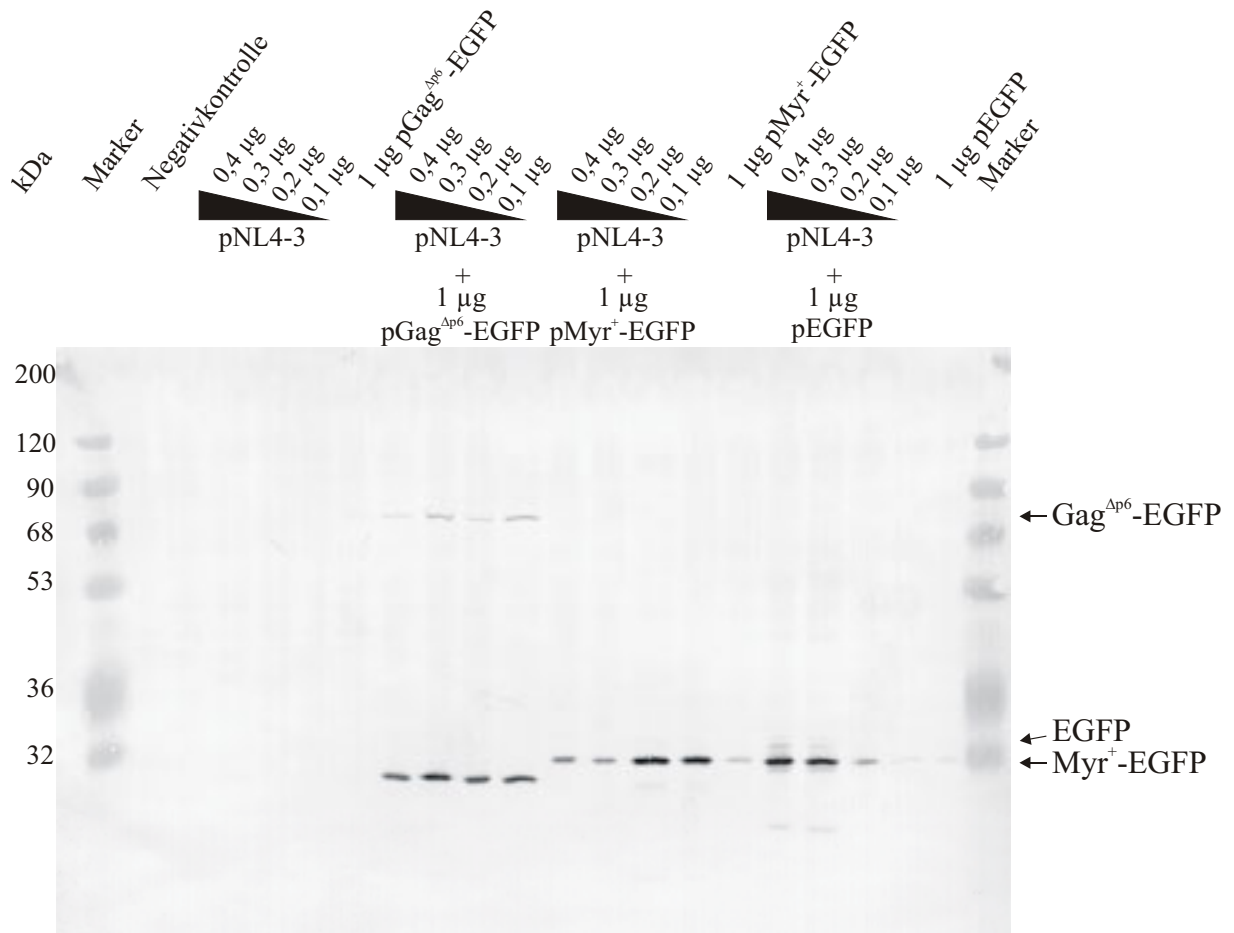
Durch die Fusion der viralen *leader*-Sequenzen Gag<sup>Δp6</sup> bzw. Myr<sup>+</sup> an EGFP, wiesen diese Fusionsproteine ein Lokalisationsmuster auf, das sich von EGFP innerhalb der Zelle unterscheidet. Sie sind stärker in der Membranfraktion vertreten, EGFP hingegen in beiden Fraktionen gleichstark.

#### 4.2.6 Viruspartikel aus dem Zellkulturüberstand

Die Western-Blot Untersuchungen der Viruspartikel aus dem Zellkulturüberstand der transfizierten LC-5 Zellen sollten zeigen, ob eine Aufnahme der exprimierten EGFP-Fusionsproteine in die Viruspartikel erfolgte.

Die Abb. 22 zeigt den Western-Blot mit anti-EGFP Antikörpern für die aus den Zellkulturüberständen durch ein 20 % Saccharosekissen zentrifugierten und pelletierten Virionen.

Die viralen Proteine der Transfektionsansätze mit pNL4-3 allein konnten mittels EGFP-Antikörper nicht im Western-Blot nachgewiesen werden. Der Kontrollansatz mit 1 µg pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP zeigte ebenfalls kein Signal. In den Spuren mit Pellets aus Zellkulturüberständen mit 1 µg pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP und verschiedenen Mengen an pNL4-3 konnte Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP nachgewiesen werden. Neben der Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Bande zeigten alle vier Ansätze noch eine Bande unterhalb der Laufhöhe des 32 kDa Markerproteins. Die Bandenstärke wies in allen Ansätzen die gleiche Intensität auf. Bei diesen durch anti-EGFP Antikörper nachgewiesenen Banden handelte es sich um ein Prozessierungsprodukt des Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Fusionsproteins. Die Laufhöhe dieser Proteinbande liegt auf der Höhe von EGFP. Aufgrund des Nachweises durch den anti-EGFP Antikörper und der Laufhöhe handelt es sich um vom Fusionsprotein abgespaltenes EGFP. Die Abspaltung von EGFP vom Fusionsprotein und die Laufhöhe unterhalb des 32 kDa Markerproteins zeigt eine Prozessierung des Fusionsproteins durch die virale Protease an.



**Abb. 22 Anti-EGFP Western-Blot**

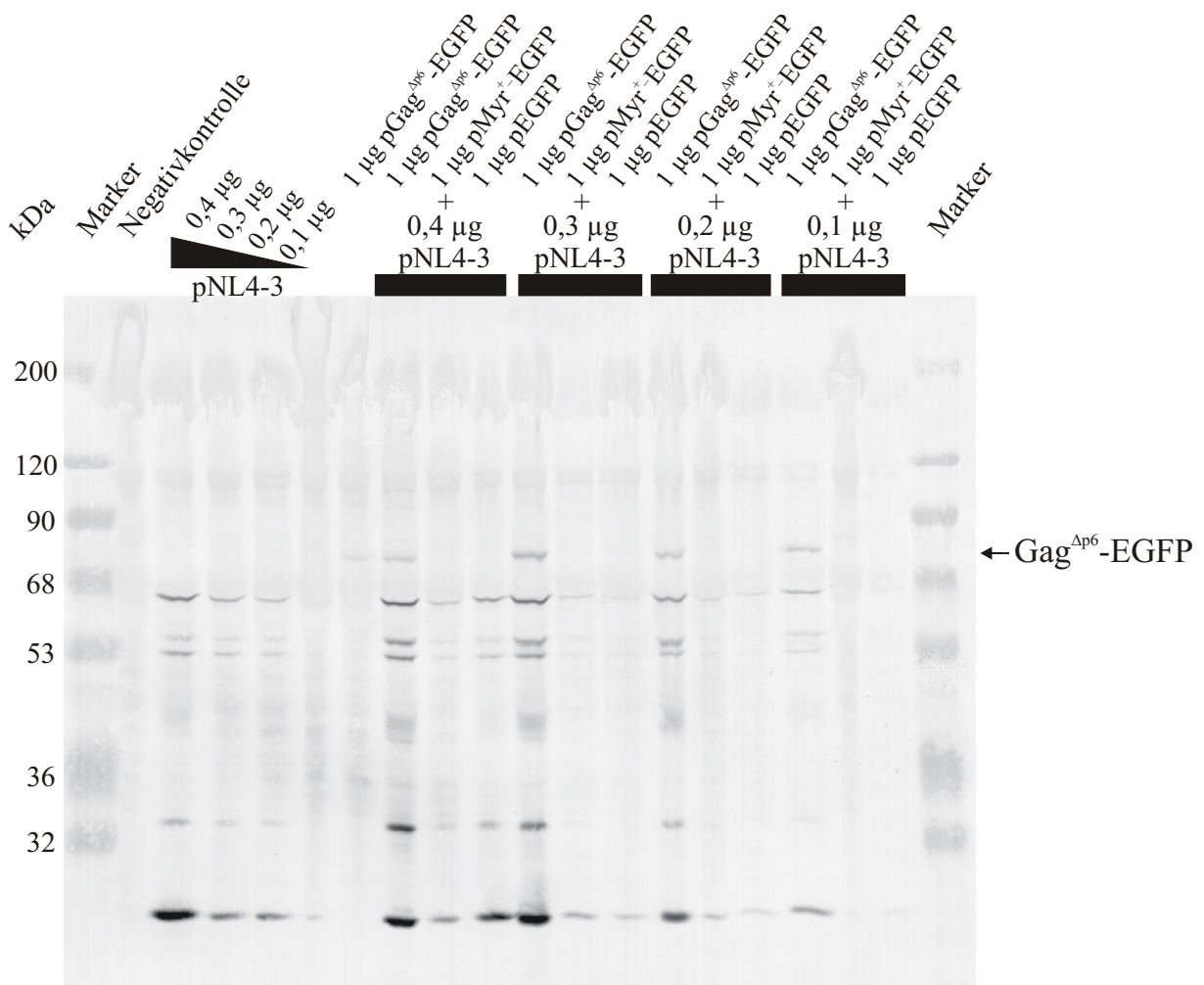
Western-Blot mit EGFP-Antikörper der Viruspräparation aus den Zellkulturüberständen transfizierter LC-5 Zellen.

Im Gegensatz zur pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP Kontrolle, in der kein Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP nachgewiesen werden konnte, zeigte sowohl die Kontrolltransfektion mit pMyr<sup>+</sup>-EGFP als auch die mit pEGFP, das schwache Vorhandensein der entsprechenden EGF-Proteine im Pellet des Zellkulturüberstands. Auch ohne Vorhandensein von HI-Virion gelangten beide Proteine in den Zellkulturüberstand. Im Gegensatz zur Kontrolle wurden in den Spuren mit Zellkulturüberstandpellets von pMyr<sup>+</sup>-EGFP / pNL4-3 kotransfizierten LC-5 Zellen jedoch deutlich stärkere Banden von Myr<sup>+</sup>-EGFP nachgewiesen. Dies deutet daraufhin, dass Myr<sup>+</sup>-EGFP auch in neuentstehende Viruspartikel verpackt wurde.

Die Bandenstärke von EGFP im Western-Blot mit EGFP-Antikörper nahm mit der Zunahme transfizierter pNL4-3 DNA deutlich zu. Die Verpackung könnte jedoch in diesem Fall einfach unspezifisch sein. Im Gegensatz zu Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP, das viel geringer exprimiert wird, benötigt EGFP erst eine hohe Anzahl von Viren im Zellkulturüberstand um ein vergleichbares

Bandensignal zu erreichen. Die Verpackung könnte also eine zufällig Aufnahme von EGFP in die Viruspartikel sein, da EGFP stark exprimiert in den Zellen vorliegt.

Der Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum zeigte bei den entstandenen Viruspartikeln der pNL4-3 Transfektionen einen Zusammenhang zwischen der Abnahme viraler Proteine im Überstand und der Verringerung der transfizierten pNL4-3 Menge (Abb. 23).



**Abb. 23 Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum**

Überstände kotransfizierter LC-5 Zellen. Die zur Transfektion eingesetzten DNA-Mengen stehen über der jeweiligen Spur.

Die Spur mit der Negativkontrolle zeigte keine Banden, die durch unspezifische Reaktionen zellulärer Proteine mit dem Antiserum hätten entstehen können. Die Spur mit dem Pellet der

Kontrolltransfektion von 1  $\mu\text{g}$  pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP zeigte nur ein schwaches Signal für Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP. Der Kotransfektionsansatz mit 1  $\mu\text{g}$  pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP und 0,4  $\mu\text{g}$  pNL4-3 zeigt im Western-Blot eine stärkere pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP Bande als die Kontrolle. Das Bandenmuster viraler Proteine entsprach dem des pNL4-3 Kontrollansatzes mit 0,4  $\mu\text{g}$  DNA. Die Intensität der Banden war beim pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP Kotransfektionsansatz jedoch stärker. Der Kotransfektionsansatz mit pMyr<sup>+</sup>-EGFP und 0,4  $\mu\text{g}$  pNL4-3 zeigte ebenfalls das virale Bandenmuster. Die Banden waren aber schwächer als die beim Ansatz mit pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP und pNL4-3. Der vergleichbare Kotransfektionsansatz mit pEGFP zeigte ebenfalls nur das virale Bandenmuster. Für den Ansatz 1  $\mu\text{g}$  pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP / 0,3  $\mu\text{g}$  pNL4-3 war die nachgewiesene Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Bande stärker als beim Ansatz mit 1  $\mu\text{g}$  pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP und 0,4  $\mu\text{g}$  pNL4-3. Die Kotransfektionsansätze mit 0,3  $\mu\text{g}$  pNL4-3 und jeweils 1  $\mu\text{g}$  pMyr<sup>+</sup>-EGFP bzw. pEGFP zeigten nur schwache virale Banden im Western-Blot. Der Ansatz mit 0,2  $\mu\text{g}$  proviraler HIV-1 DNA und 1  $\mu\text{g}$  pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP zeigte für die Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP und viralen Banden ein vergleichbares Muster zu den Ansätzen mit 0,4  $\mu\text{g}$  bzw. 0,3  $\mu\text{g}$  pNL4-3 DNA. Für die Ansätze mit 1  $\mu\text{g}$  pMyr<sup>+</sup>-EGFP bzw. pEGFP und 0,2  $\mu\text{g}$  pNL4-3 wurden nur noch schwache virale Banden nachgewiesen. In der letzten Transfektionsstaffel mit 1  $\mu\text{g}$  pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP, pMyr<sup>+</sup>-EGFP oder pEGFP und jeweils 0,1  $\mu\text{g}$  pNL4-3 wurden nur noch in der Spur mit pGag<sup>Δp6</sup>-EGFP virale Proteine vom Antiserum erkannt. Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP zeigte eine schwächere Bande als im Vergleich zu den Ansätzen mit 0,4; 0,3 bzw. 0,2  $\mu\text{g}$  pNL4-3.

Die Untersuchungen bestätigten frühere Untersuchungen, dass die Gag<sup>Δp6</sup>-Deletionsmutante die Partikelbildung fast verhindert, die aus der Zelle ausgeschleust werden. Die Versuche zeigten aber auch, dass Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP in die Viruspartikel verpackt wurde. Erst nach Kotransfektionen mit pNL4-3 konnte Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP im Überstand der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus war es zu einer Prozessierung des C-terminalen EGFP-Teils des Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP-Fusionsproteins gekommen. Da diese Prozessierung erst in den ausgeschleusten Partikeln beobachtet wurde und nicht in den zellulären Zytoplasma- oder Membranfraktionen zu finden war, ist sie auf die Aktivität der viralen Protease zurückzuführen. Die virale Protease wird erst im ausknospenden Viruspartikel aktiv (Kaplan et al., 1994). Aus diesem Grund ist die Prozessierung ebenfalls ein Hinweis auf eine Verpackung des Gag<sup>Δp6</sup>-EGF-Fusionsproteins. Die im Western-Blot nachgewiesenen Myr<sup>+</sup>-EGFP Banden hatten bei den Kotransfektionsansätzen mit 0,1  $\mu\text{g}$  bzw. 0,2  $\mu\text{g}$  pNL4-3 gleiche Intensitäten wie die nachgewiesenen Banden des prozessierten EGFPs vom Gag-



Fusionsprotein. Diese Bandenstärke könnte ebenfalls auf eine gezielte Verpackung deuten. Warum die Bandenstärke bei den Ansätzen mit 0,3 µg und 0,4 µg geringer ist, konnte nicht beantwortet werden. Die nachgewiesenen Banden für EGFP erreichten diese Bandenstärke erst mit ansteigender transfizierter pNL4-3 Menge, dies könnte auf eine unspezifische Aufnahme von EGF-Protein in neu entstehende Viruspartikel hindeuten.

Die Western-Blot Analysen mit EGFP-Antikörper und humanem HIV-1 spezifischen Antiserum der Zytosol- und Membranfraktion kotransfizierter LC-5 Zellen zeigten, dass die Fusion der viralen *leader*-Sequenzen Gag<sup>Δp6</sup> und Myr<sup>+</sup> an EGFP einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation dieser Fusionsproteine hatte. EGFP wurde in der Zytosol- und Membranfraktion mit gleichen Bandenstärken detektiert. Zwar konnten die Fusionsproteine Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP und Myr<sup>+</sup>-EGFP auch in der Zytosolfraction nachgewiesen werden, die Bandenstärken im Western-Blot mit den Membranfraktionen belegten jedoch eine stärkere Lokalisation in der Membranfraktion. Durch die Verwendung beider viraler *leader*-Sequenzen (Myr<sup>+</sup> und Gag<sup>Δp6</sup>) wurden die intrazellulär exprimierten nicht-viralen Proteine an zelluläre Membranen transportiert. Dies wurde auch durch Fluoreszenzaufnahmen bestätigt. Durch Western-Blot Untersuchungen von Viruspräparationen aus dem Zellkulturüberstand kotransfizierter Zellen, konnte gezeigt werden, dass Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Moleküle in Viruspartikel verpackt werden. Durch die Prozessierung des Fusionsproteins und der Abspaltung von EGFP, kann die Funktionalität der Proteaseerkennungsstelle zwischen Gag<sup>Δp6</sup> und EGFP angenommen werden. Myr<sup>+</sup>-EGFP und EGFP wurden ebenfalls in den Viruspräparationen nachgewiesen. Die Bandenstärke von Myr<sup>+</sup>-EGFP schon bei geringer Kotransfektion von pNL4-3 (0,1 µg und 0,2 µg) deutete eher auf eine Verpackung der Fusionsproteine hin, wohingegen die Zunahme der Bandenstärke von EGFP mit der Zunahme der Bildung von Viruspartikeln erfolgt. Aus diesem Grund könnte die Aufnahme von EGFP wahrscheinlich eher zufällig erfolgen.

---

## 5. Diskussion

Die zur Zeit verwendeten Therapien gegen HIV-1 richten sich gegen die viruseigenen, spezifischen Enzyme Reverse Transkriptase (RT) und Protease. Durch die Kombination verschiedener RT- und Proteaseinhibitoren (HAART) ist es seit Mitte der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts möglich den Gehalt an freien HI-Viren im Plasma zu senken (Collier et al., 1996). Die Verringerung des Gehalts an freien Viren, teilweise sogar unter die Nachweisgrenze, gab Anlass zur Hoffnung auf eine vollständige Hemmung der Virusreplikation im Körper HIV-Infizierter. Immunologische Daten zeigten bei Patienten mit HAART einen Anstieg der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation, was auf ein verbessertes Immunsystem in den Patienten hindeutet (Li et al., 1998). Der Nachweis *von* resistenten Viren in HAART-Patienten zeigte jedoch, dass HIV trotz der anfänglich viel versprechenden Therapieerfolge weiterhin replizierte. In weiteren Untersuchungen wurde dann nachgewiesen, dass das Virus bestimmte „Rückzugsgebiete“ im Körper hat, wie z.B. persistierende, latent infizierte ruhende CD4<sup>+</sup> Zellen. Aus diesen Zellen kann noch nach Jahren der HAAR-Therapie infektiöses Virus isoliert werden (Finzi et al., 1997)

Die weiterhin stattfindende schwache Virusreplikation, das Entstehen resistenter Viren und der Nachweis viraler Rückzugsgebiete im Körper HIV-1 Infizierter unter HAART zerstörte die Hoffnung, dass mit dieser Therapieform HIV vollständig aus den Körperzellen Infizierter eliminiert werden kann. Nebenwirkungen unter HAART sind ein weiteres häufig auftretendes Problem bei der Behandlung von AIDS Patienten. Oft bedingen die Nebenwirkungen einen Kompromiss zwischen optimalen Nutzen mit möglichst langer HIV-Suppression und der Toxizität der Substanzen. Innerhalb der ersten 9 Monate wechseln bis zu 70 % der Patienten ihre HAART wegen der Nebenwirkungen (Highleyman, 2000). Aufgrund der chronischen Infektion von Körperzellen mit HIV, bedingt eine HIV-Infektion eine lebenslange Therapie. Die aufgeführten Punkte, Resistenzbildung und Nebenwirkungen, bewirken eine Einschränkung der Therapiemöglichkeiten mit voranschreitender Therapiedauer, bis es keine Therapiemöglichkeit mehr gibt. Aus diesem Grund werden neue Inhibitoren und Therapieformen benötigt.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass es durch die Verwendung von Peptiden mit Aminosäuresequenzen, die sich von HIV-Proteinen ableiten, zu antiviralen

Effekten gegen HIV kommt. Ein erfolgversprechender Ansatz könnte z.B. die Verwendung von T-20 sein. T-20 ist ein Peptid aus 36 Aminosäureresten, das einer Region des viralen Glykoproteins gp41 entspricht. Es wirkt als "entry"-Inhibitor in der späten Phase der Infektion. Zur Zeit wird T-20 klinisch getestet (Kilby et al., 1998; Chen et al., 2002). Ein anderes Beispiel ist die Hemmung der viralen Protease von HIV-1 durch kurze Aminosäuresequenzen des viralen Vif-Proteins *in vitro* (Blumenzweig et al., 2002). Weitere Peptide von denen eine inhibitorische Wirkung bekannt ist sind aus der viralen Protease abgeleitet. So wurde die Inhibition der HIV-1 Protease durch Interface-Peptide von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt (Babe et al., 1992; Schramm et al., 1992, 1996). Der Begriff Interface-Peptid bezeichnet kurze Peptidsequenzen, die mit der Interface-Region der HIV-1 Protease interagieren, um so die Ausbildung eines enzymatisch aktiven Proteasomodimers zu verhindern. Die Möglichkeit, diese Peptide im Rahmen einer Gentherapie einsetzen zu können, eröffnet neue Behandlungsmöglichkeiten. Deshalb wurde in dieser Arbeit der antivirale Effekt intrazellulär exprimierter Interface-Peptide in eukaryotischen Zellen untersucht, die auch HIV exprimieren.

### 5.1 Interface-Peptide als antivirale Substanzen

Das große Problem der Therapie von AIDS-Patienten ist die Resistenzbildung der HI-Viren gegen verwendete RT- und Proteaseinhibitoren. Die Auswertung der Sequenzdaten von Viren mit Mutationen im proteasekodierenden Bereich zeigt die Variabilität des viralen Enzyms. In diesen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der Austausch einer Aminosäure ausreicht, um eine Resistenzbildung zu bewirken (El-Farrash et al., 1994; Lin et al., 1995). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass Mutationen, die zur Resistenz führen, keine signifikante Auswirkung auf die katalytische Funktion des viralen Enzyms haben. Im Gegensatz dazu sind für die N- und C-terminalen Aminosäuresequenzen der Proteasemonomere (Aminosäureposition 1-4, 96-99), die die Interface-Region bilden, bisher noch keine HIV-Mutanten bekannt (Datenbankabfrage 2002, Shafer et al., 2000). Dies könnte Interface-Peptide in klinischen Anwendungen zu Proteaseinhibitoren machen, die über einen langen Zeitraum wirksam bleiben. Voraussetzung dafür wäre, dass sich die Interface-Region *in vivo* unter dem Selektionsdruck der Interface-Peptide als nicht variabel zeigt in Bezug auf Aminosäureaustausche, ohne ihre Funktion zu verlieren. Da Interface-Peptide nicht das aktive Zentrum, sondern die Interface-Region inhibieren, könnten sie ebenfalls gegen Viren

eingesetzt werden, die gegen Proteaseinhibitoren des aktiven Zentrums bereits resistent sind. Die in dieser Arbeit untersuchten Interface-Peptide basieren auf Computer-Modelling Daten (Schramm et al., 1996).

## 5.2 Antivirale Effekte der Interface-Peptide gegen HIV-1 in COS-7 Zellen

Antivirale Effekte wurden zunächst durch Kotransfektion des proviralen HIV-1 Klon pNL4-3 mit den jeweiligen pSV- $\beta$ -Gal-PI in COS-7 Zellen nachgewiesen. Der stärkste inhibitorische Effekt wurde durch die Expression des Peptids PI 26 erzielt. Dass PI 26 eine inhibitorische Wirkung auf die virale Protease bewirkte war aus vorhergehenden Versuchen bekannt (Lieder, 1998). In diesen Versuchen wurde in einem prokaryotischen Wachstumstest die Expression rekombinanter HIV-1 Protease und Interface-Peptide durch IPTG-Stimulation in *E. coli* bewirkt. Die Expression der rekombinanten HIV-1 Protease allein wirkt zytotoxisch auf die Bakterien, es kommt nur zu einem geringen Bakterienwachstum der Kultur (Ast et al., 1998). Durch Koexpression von Interface-Peptiden kam es zur Hemmung der viralen Protease in *E. coli*. Die inhibitorische Aktivität des Peptids PI 26 wurde darüber hinaus in einem *in vitro* Assay bestätigt. Dazu wurde die Peptidsequenz synthetisiert und in einem biochemischen Test zusammen mit rekombinanter gereinigter HIV-1 Protease die Enzymaktivität mit einem fluorochromen Substrat bestimmt. Durch diese biochemischen Enzymtests wurde für die Peptidsequenz -T V S Y D L- von PI 26 ein  $IC_{50}$  von 0,7  $\mu$ M gemessen (persönliche Mitteilung Dr. Ast).

Das Interface-Peptid PI 7 wies im Transfektionsversuch mit 0,1  $\mu$ g pNL4-3 einen schwächeren antiviralen Effekt als PI 26 auf. Mit der synthetisierten Peptidsequenz -T V S Y E L- von PI 7 wurden ebenfalls Enzymtests mit gereinigter Protease durchgeführt. Dabei wurde für PI 7 ein  $IC_{50}$  von 1,3  $\mu$ M bestimmt (Dr. Ast, unveröffentlichte Daten). Offensichtlich hatte der Austausch einer Aminosäure, bei der es sich zudem um einen homologen Aminosäureaustausch handelt, einen Abfall der inhibitorischen Wirkung zur Folge.

Die Wirkung der weiteren getesteten Interface-Peptide PI 5, PI 12, PI 17, PI 24, PI 25 und PI 27, lag in COS-7 Zellen ebenfalls im Bereich des antiviralen Effekts der Interface-Peptide PI 7 und PI 26. Die Peptide PI 5 und PI 27 hatten eine Wirkung, die ähnlich stark war wie die von Peptid PI 26. Der antivirale Effekt der Peptide PI 12, PI 17, PI 24 und PI 25 war hingegen etwas schwächer und lag im Bereich des antiviralen Effekts von Peptid PI 7.

Es war überraschend, dass alle Interface-Peptide (PI) einen antiviralen Effekt bewirkten. In früheren Untersuchungen am DPZ wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Interface-Peptide in einem prokaryotischen Wachstumsversuch (Ast et al., 1998; Lieder, 1998) getestet. Es zeigte sich, dass für die Peptide PI 12 und PI 17 kein inhibitorischer Effekt gegen die rekombinante Protease von HIV-1 nachgewiesen werden konnte. Die Peptidsequenz von PI 12 -T V T Y K F- wurde synthetisiert und in biochemischen Versuchen mit rekombinanter Protease getestet. Es konnte keine Inhibition der Protease durch das Peptid bis zu einer Konzentration von 28,3  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden (Ast, unveröffentlichte Daten). Die Expression der Peptide PI 12 und PI 17 bewirkte jedoch im COS-7 Zellkultursystem einen antiviralen Effekt. Die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Interface-Peptide in den Untersuchungen legen nahe, dass unterschiedliche Mechanismen zu den beobachteten antiviralen Effekten führen. PI 12 und PI 17 hemmen zwar nicht die rekombinante HIV-1 Protease, aber sie bewirkten einen antiviralen Effekt gegen HIV-1 in COS-7 Zellen. Für die Peptide PI 7 und PI 26 konnte ebenfalls ein antiviraler Effekt in COS-7 nachgewiesen werden, beide Peptide hemmen aber auch die rekombinante HIV-1 Protease. Die Inhibition von HIV-1 durch diese zwei Peptide könnte wohl auf einer Hemmung der viralen Protease beruhen, wohingegen PI 12 und PI 17 einen anderen Weg der Inhibition beschreiten.

### 5.3 Kotransfektionsexperimente mit der CD4<sup>+</sup> LC-5 Zelllinie

Um näher an den *in vivo* Bedingungen zu sein, wurden die Transfektionsversuche ebenfalls mit LC-5 Zellen durchgeführt. LC-5 Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den CD4-Rezeptor und sind HIV-1 suszeptibel, d.h. sie können infiziert werden, im Gegensatz zu COS-7 Zellen. Die reifen, infektiösen Viren können neue LC-5 Zellen infizieren, welche noch nicht mit HIV infiziert, bzw. mit dem molekularen Klon transfiziert worden sind. Durch die Neuinfektion der Zellen, die nicht transfiziert wurden, entsteht ein Multiplikationseffekt, der schnell zum Anstieg des Virusgehalts im Zellkulturüberstand führt.

Überraschend konnte in den Versuchen mit CD4<sup>+</sup> LC-5 Zellen kein antiviraler Effekt für das PI 7 nachgewiesen werden, das in *in vitro* Tests, im *E. coli* Test und auch im COS-7 Test die virale rekombinante HIV-1 Protease bzw. die Entstehung reifer Viren inhibierte. Aus dem gleichen Grund war es deshalb ebenfalls überraschend, dass das Interface-Peptide PI 26 ebenfalls kaum einen antiviralen Effekt bewirkt, während alle weiteren getesteten Peptide

einen hemmenden Einfluss auf HIV-1 im LC-5 System ausübten. Dieser antivirale Effekt war im Vergleich zu den Kotransfektionen von COS-7 Zellen mit den gleichen DNA-Mengen (0,1 µg pNL4-3/5 µg pSV-β-Gal-PI) jedoch schwächer. Dieser Unterschied könnte aber durch den Multiplikationseffekt durch Neuinfektion von LC-5 Zellen begründet sein. Auch durch die Ergebnisse der LC-5 Versuche zeigen sich Hinweise auf unterschiedliche Mechanismen der Inhibition. Gerade die Peptide mit guter inhibitorischer Wirkung gegen rekombinante HIV-1 Protease bewirken keinen antiviralen Effekt, der durch den p24-ELISA nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu hemmen hier wieder Peptide wie PI 12 und PI 17.

#### **5.4 Kotransfektion von COS-7 Zellen mit erhöhter pNL4-3 Menge**

Die Transfektionsversuche mit 0,1 µg pNL4-3 und 5 µg pSV-β-Gal-PI in COS-7 und LC-5 Zellen zeigten antivirale Effekte für die verwendeten Interface-Peptide. Der antivirale Effekt im LC-5 System war jedoch schwächer. In weiteren Experimenten wurden die COS-7 Zellen mit einer 10-fach höheren Menge des proviralen HIV-1 Klons pNL4-3 bei gleichbleibender Inhibitormenge transfiziert. Diese Experimente wurden durchgeführt, um die höhere Virusmenge, die in den LC-5 Zellen aufgrund des Multiplikationseffekts entsteht, zumindest ansatzweise in den COS-7 Zellen nachstellen zu können.

Im COS-7 System, mit 1 µg pNL4-3 und 5 µg pSV-β-Gal-PI, bewirkten die Interface-Peptide PI 7 und PI 26, wie schon in COS-7 Versuchen mit nur 0,1 µg pNL4-3, einen antiviralen Effekt. Im Gegensatz zum LC-5 Zellkultursystem wo Peptid PI 7 keinen und PI 26 nur einen schwachen Effekt gegen HIV-1 hatte, zeigen beide mit erhöhter Proviruslast im COS-7 System einen antiviralen Effekt. Durch die Expression der Peptide PI 12 und PI 27 konnte dagegen nach Transfektion von 1 µg pNL4-3 in COS-7 Zellen kein antiviraler Effekt nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu hatten beide Peptide bei einer transfizierten pNL4-3 Menge von 0,1 µg antivirale Effekte in COS-7 und LC-5 Zellen bewirkt. Nach Steigerung der Menge an transfizierter pNL4-3 DNA, die eine höhere Virusbildung in COS-7 Zellen bewirkte, konnte für beide Peptide kein antiviraler Effekt mehr im p24-ELISA nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Expression der Interface-Peptide PI 5, PI 17, PI 24 und PI 25 bewirkte sowohl in COS-7 und LC-5 Zellen, die mit 0,1 µg pNL4-3 transfiziert wurden, als auch in mit 1 µg pNL4-3 transfizierten COS-7 Zellen eine inhibitorische Wirkung.

Das durch die p24-ELISA-Daten belegte, unterschiedliche Verhalten der Interface-Peptide gegen neu entstehende HI-Viren deutet auf eine unterschiedliche Potenz der Inhibitoren hin.

### 5.5 Auswirkung der Interface-Peptidsequenz auf den antiviralen Effekt

In der Tab. 9 sind die untersuchten Peptide mit ihrer Aminosäuresequenz zusammengefasst. Der Datenvergleich der verschiedenen Kotransfektionsversuche dieser Arbeit und die Einbeziehung von Ergebnissen vorausgegangener Untersuchungen (Ast et al., 1998 und unveröffentlichte Daten; Lieder, 1998) zeigen, dass die Peptide trotz teilweise nur geringer Sequenzunterschiede ein anderes inhibitorisches Verhalten aufweisen.

**Tab. 9 Antivirale Effekte gegen HIV-1 nach Kotransfektion in COS-7**

PI-Vektor	Peptidsequenz <sup>1</sup>
pSV-β-Gal-PI 5	T I T Y K L
pSV-β-Gal-PI 7	T V S Y E L
pSV-β-Gal-PI 12	T V T Y K F
pSV-β-Gal-PI 17	T V T Y D F
pSV-β-Gal-PI 24	Y E I S Y D L
pSV-β-Gal-PI 25	Y E F S Y D L
pSV-β-Gal-PI 26	T V S Y D L
pSV-β-Gal-PI 27	T V T Y E L

<sup>1</sup> Im Sequenzvergleich kennzeichnen blaue Buchstaben Übereinstimmungen mit der Sequenz von pSV-β-Gal-PI 7 und pSV-β-Gal-PI 26; rote Buchstaben Übereinstimmungen mit der Sequenz von pSV-β-Gal-PI 7 und grüne Buchstaben Übereinstimmungen mit der Sequenz von pSV-β-Gal-PI 26.

Die Sequenz der Interface-Peptide PI 26 und PI 7 unterscheidet sich nur in der vorletzten Aminosäureposition (Tab. 9). In biochemischen Untersuchungen gegen gereinigte rekombinante HIV-1 Protease bewirkt dieser Sequenzunterschied einen Faktor von 2 in der Wirksamkeit [IC<sub>50</sub>-Werte]. Die Aminosäuresequenzunterschiede bewirkten aber auch ein unterschiedliches Verhalten in den verschiedenen Zellkulturen. Die Interface-Peptide PI 7 und PI 26 hatten keinen bzw. nur einen geringen antiviralen Effekt in LC-5 Zellen, hatten aber bei den COS-7 Transfektionen mit 0,1 µg und 1 µg pNL4-3 DNA eine inhibierende Wirkung auf HIV-1. Im Gegensatz zum Interface-Peptid PI 27, welches in mit 0,1 µg transfizierten LC-5 und COS-7 Zellen einen deutlichen antiviralen Effekt bewirkte, jedoch keine inhibitorische

Wirkung in COS-7 Zellen mit 1 µg pNL4-3 zeigte. Die Abb. 24 verdeutlicht die geringen Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Interface-Peptide PI 7, PI 26 und PI 27.

<b>PI 26</b>	T	V	S	Y	D	L
	■	■	□	■	▽	■
<b>PI 7</b>	T	V	S	Y	E	L
	■	■	▽	■	□	■
<b>PI 27</b>	T	V	T	Y	E	L

**Abb. 24 Sequenzvergleich der Interface-Peptide**

Dunkelgrauer Kasten: gleiche Aminosäurereste an denselben Positionen aller Peptide.  
 Hellgrauer Kasten: gleiche Aminosäurereste an denselben Positionen zweier Peptide.  
 Pfeil: Aminosäureaustausch.

Obwohl sich PI 7 und PI 27 nur in einer Aminosäureposition unterscheiden, wirken beide Peptide unterschiedlich auf HIV-1. Im LC-5 Test konnte durch die Expression von PI 7 kein antiviraler Effekt erreicht werden, PI 27 zeigte jedoch einen antiviralen Effekt. Im COS-7 Kotransfektionsversuch mit 0,1 µg pNL4-3 hemmten beide Peptide HIV-1. Bei Kotransfektionsversuchen mit 1 µg pNL4-3 DNA wurde ein antiviraler Effekt für PI 7 nachgewiesen. Die Expression von PI 27 hatte keinen Effekt auf HIV-1. Diese Unterschiede zeigen, dass durch die Sequenzunterschiede teilweise nicht nur die Stärke des antiviralen Effekts beeinflusst wird, sondern manchmal auch die Art der Inhibition.

Die Auswirkung einzelner Aminosäureaustausche wird auch deutlich bei den Interface-Peptiden PI 12 und PI 17 (Abb. 25).

<b>PI 12</b>	T	V	T	Y	K	F
	■	■	■	■	▽	■
<b>PI 17</b>	T	V	T	Y	D	F

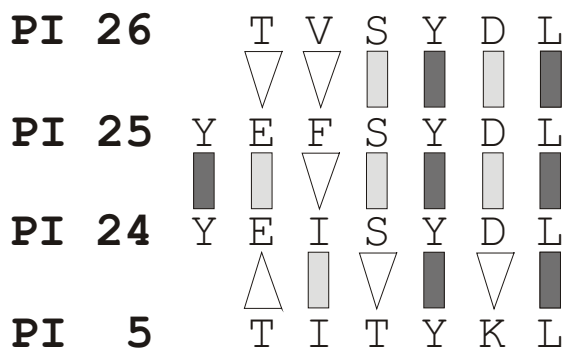
**Abb. 25 Sequenzvergleich von PI 12 und PI 17**

Dunkelgrauer Kasten: gleiche Aminosäurereste an denselben Positionen aller Peptide.  
 Hellgrauer Kasten: gleiche Aminosäurereste an denselben Positionen zweier Peptide.



Beide Peptide hatten in prokaryotischen Untersuchungen keinen inhibitorischen Einfluss auf die virale Protease. In Kotransfektionsversuchen mit eukaryotischen Zellen zeigten sie aber antivirale Effekte gegen HIV-1 im COS-7 und LC-5 System mit 0,1 µg pNL4-3, wobei PI 17 in LC-5 Zellen einen stärkeren antiviralen Effekt bewirkte. In mit 1 µg pNL4-3 kotransfizierten COS-7 Zellen bewirkte nur die Expression von PI 17 einen antiviralen Effekt, für PI 12 konnte keine inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden. Auch hier hat ein Aminosäureaustausch einen starken Einfluss auf die Wirksamkeit.

Die weiteren untersuchten Interface-Peptide PI 5, PI 24 und PI 25 hatten in vorausgegangenen Untersuchungen im prokaryotischen *E. coli* System die rekombinante virale Protease gehemmt (Lieder, 1998). Der in dieser Arbeit nachgewiesene antivirale Effekt durch die intrazelluläre Expression dieser Interface-Peptide in COS-7 war gleich den durch Expression von PI 7 und PI 26 erzielten Werten. Die Abb. 26 zeigt den Vergleich der Peptidsequenzen von PI 5, PI 24 und PI 25 mit der Sequenz des im biochemischen Test wirksamsten Peptids PI 26.



**Abb. 26 Sequenzvergleich verschiedener Interface-Peptide**

Dunkelgrauer Kasten: gleiche Aminosäurereste an denselben Positionen aller Peptide.  
 Hellgrauer Kasten: gleiche Aminosäurereste an denselben Positionen zweier Peptide.  
 Pfeil: Aminosäureaustausch.

C-terminal endet die Sequenz bei den Interface-Peptiden PI 26, PI 25 und PI 24 mit -S Y D L-, nur die N-Termini unterscheiden sich. Die Peptidsequenz von PI 5 endet C-terminal hingegen mit -T Y K L-. Das inhibitorische Verhalten dieser Peptide gegen HIV-1 in den Kotransfektionsansätzen ähnelt sich. Auffällig ist nur der geringe antivirale Effekt von PI 26 im LC-5 Testsystem. Einzelne Aminosäureaustausche in der kurzen Peptidsequenz haben einen entscheidenden Einfluss auf die Stärke und Art des antiviralen Effekts.

## 5.6 Untersuchung des antiviralen Effekts

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten für die Interface-Peptid PI 7 und PI 26 zusammen mit Ergebnissen der biochemischen und prokaryotischen Untersuchungen, deuten auf eine Hemmung der viralen Protease hin. Dementsprechend sollte die Prozessierung und damit verbunden die Reifung der Viren inhibiert sein. Dieses wurde durch Infektionsstudien mit MT-2 Zellen und Western-Blot Untersuchungen von Viren aus dem Überstand kotransfizierter COS-7 und LC-5 Zellen untersucht.

MT-2 Zellen können mit HIV-1 infiziert werden. Die Infektion und anschließende Replikation von HI-Viren, die Synzytien induzieren, bewirkt bei MT-2 Zellen einen zytopathischen Effekt. Es kommt im Verlauf der Infektion zur Verschmelzung von MT-2 Zellen und damit zu bläschenförmigen Gebilden, den sogenannten Riesenzellen. Die Riesenzellbildung kann als Maßstab für die Infektiosität und den Gehalt der Viren, die zur Infektion eingesetzt wurden, herangezogen werden (Harada et al., 1985). Nach Infektion von MT-2 Zellen mit virushaltigen Überständen können deshalb Aussagen über den Gehalt an infektiösen HI-Viren im Vergleich zu einer Positivkontrolle getroffen werden.

Die Untersuchungen zum Nachweis reifer, infektiöser Viren durch Infektion von MT-2 Zellen ergab einen geringen Gehalt infektiöser Viren im Überstand kotransfizierter Zellen. Die MT-2 Daten zeigten einen geringeren Gehalt an infektiösen Viren im Überstand kotransfizierter LC-5 Zellen als bei der Kontrolle (nur pNL4-3) an. Diese Aussage der Infektionsstudien bestätigt die p24-ELISA-Werte für die Interface-Peptide PI 5, PI 12, PI 17, PI 24, PI 25 und PI 27. Ebenfalls wurde für die Interface-Peptide PI 7 und PI 26 ein Effekt nachgewiesen. Das war sehr überraschend, da die Ergebnisse aus den p24-ELISA keine antivirale Wirkung angezeigt hatten. Möglicherweise deutet diese Diskrepanz auf die Freisetzung von unreifen Viren im LC-5 Zelltest hin, bewirkt durch die Expression der Peptide PI 7 und PI 26. Die biochemischen und prokaryotischen Tests zusammen mit den MT-2 Ergebnissen deuten daher für die Interface-Peptide PI 7 und PI 26 auf einen Mechanismus hin, der die Reifung von Viruspartikeln unterbindet. Beide Peptide hemmen die rekombinante HIV-1 Protease und die Überstände von Kotransfektionsversuchen in LC-5 Zellen enthalten nur wenig reife, infektiöse Viren. Die p24-Daten dieser Peptide aus den LC-5 Transfektionen zeigen dagegen keine Anzeichen eines antiviralen Effekts gegen HIV-1. Dies kann womöglich am verwendeten Nachweis des p24 mittels ELISA liegen. Es besteht die Möglichkeit, dass der

ELISA nicht nur prozessiertes p24 nachweist, sondern auch p24 welches im Gag-Vorläuferprotein unprozessiert vorliegt. Der Vorläufer ist wiederum Bestandteil unreifer HI-Viren. Dies bedeutet, dass der ELISA zwar eine Aussagekraft hat in bezug auf den Gehalt der Viren im Zellkulturüberstand, aber mittels ELISA keine Aussage über reife oder unreife Viren getroffen werden können. Durch den Nachweis von p24 und p55 im Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum wurde diese Fragestellung untersucht.

Im Gegensatz zum p24-ELISA kann im Western-Blot zwischen p24 und p55 unterschieden werden. Die Untersuchungen der verschiedenen Viruspräparationen zeigten keine Zunahme der p55-Bande, die auf einen hohen Anteil unreifer Viren schließen lässt. Die schwächeren p24-Bandensignale der Ansätze im Vergleich zur Viruskontrolle zeigen aber den geringeren Gehalt an reifen Viren im Zellkulturüberstand kotransfizierter Zellen an. Das Vorhandensein von weniger Viren in den Zellkulturüberständen von Kotransfektionsansätzen als bei der Positivkontrolle (nur pNL4-3) zeigten auch die gemessenen p24-Werte im ELISA an.

Die Bandenintensität von p24 und p55 der Viruspräparationen aus den Zellkulturüberständen kotransfizierter Zellen wies keine Unterschiede auf, die einen hohen Gehalt unreifer Viren belegen könnte. Der geringe Gehalt an Viren in den Überständen Interface-Peptid exprimierender Zellen könnte durch eine Behinderung der Viruspartikelbildung (virus assembling) oder Virusfreisetzung (virus release) durch die Peptide bedingt sein. Die enzymatisch aktive HIV-1 Protease ist notwendig für die effektive Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle (Kaplan et al., 1994).

## **5.7 Der antivirale Effekt der Interface-Peptide**

Die Auswertung der Daten der p24-ELISA, MT-2 Infektionsstudien und Western-Blot Analysen zeigen, dass es bei den verwendeten Interface-Peptiden nicht den "antiviralen" Effekt gibt. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass die intrazelluläre Expression der Peptide eine hemmende Wirkung auf sich neu bildende HI-Viren hat, der Mechanismus der Inhibition sich aber von Peptid zu Peptid unterscheidet. Bei den Peptiden PI 7 und PI 26 könnte dieser Effekt auf der Hemmung der viralen Protease beruhen.

## 5.8 Gezielte Verpackung nicht-viraler Proteine in HIV-1

Die Hemmung der viralen Enzyme Reverse Transkriptase und Protease bedingt das Vorhandensein der Inhibitoren an dem Ort, an dem das virale Enzym aktiv ist. Während die Reverse Transkriptase nach der Infektion durch HIV in der infizierten Zelle das RNA-Genom in ein ds-DNA Molekül umschreibt, wird die virale Protease erst in der späten Phase des viralen Replikationszyklus im unreifen Viruspartikel aktiv (Kaplan et al., 1994). Durch die intrazelluläre Expression von antiviralen Peptiden gegen die HIV-1 Protease könnten zwar infizierte Zellen Inhibitoren gegen die Protease exprimieren, die Aufnahme der Inhibitoren in neuentstehende Viruspartikel bleibt aber ungerichtet. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur gezielten Verpackung nicht-viraler Proteine in neu entstehende Viruspartikel gemacht.

Die Assemblierung der Gag- und Gag-Pol Proteine zum Viruspartikel, mit der Verpackung des RNA-Genoms findet an der Zytoplasmamembran statt (Huang et al., 1997). Die Viruspartikel knospen aus den Zellen aus und werden dabei von der Wirtszellmembran umhüllt, die die viralen Hüllproteine gp41 und gp120 enthält (Coffin, 1996). Erst mit den Prozessen der Assemblierung und des Ausbuddens kommt es zur autokatalytischen Prozessierung der viralen Proteasemonomere. Der Ausbildung des enzymatisch aktiven Proteasehomodimers folgt die Prozessierung der Vorläuferproteine Gag und Gag-Pol zu viralen Strukturproteinen und Enzymen (Kaplan et al., 1994). Erst nach Durchlaufen dieser Prozesse entstehen aus unreifen Viruspartikeln, reife infektiöse HI-Viren (Kaplan et al., 1993; Rose et al., 1995). Es handelt sich dabei um viruseigene Prozesse, die notwendig sind für die virale Replikation. Aus diesem Grund bieten sie einen Ansatzpunkte für antivirale Therapien.

Eine Verhinderung der Ausbildung reifer, infektiöser Viren durch die Hemmung der viralen Protease durch Proteaseinhibitoren gehört inzwischen zur klinischen Standardtherapie. Die Aufnahme der Proteaseinhibitoren erfolgt in der Regel oral. Nachteil dieser Applikationsform ist die geringe biologische Verfügbarkeit der Therapeutika. HIV-Patienten leiden oft unter Magen-Darm-Erkrankungen, die die Aufnahme der Inhibitoren verschlechtern (Schieferstein, 2002). Der Inhibitor und die zu hemmende Protease treffen nur zufällig aufeinander. Der Inhibitor muss aber im unreifen Viruspartikel vorliegen, um die Reifung verhindern zu können.

Die Verwendung von Interface-Peptiden zur Hemmung der Virusassemblierung und Prozessierung könnte neue Therapiemöglichkeiten für die Zukunft bieten. Peptide können intrazellulär exprimiert werden und sind für gentherapeutische Anwendungen prinzipiell geeignet. Damit könnten Probleme wie geringe Bioverfügbarkeit durch geringe Membrangängigkeit und Nebenwirkungen, die durch die orale Verabreichung und Aufnahme der Inhibitoren über den Magen-Darm-Trakt entstehen, überwunden werden.

Aber auch bei der im ersten Teil der Arbeit beschriebenen intrazellulären Expression antiviraler Peptide gegen die virale Protease kommen die rekombinant exprimierten Inhibitoren und das virale Enzym nur ungerichtet in Kontakt miteinander. Aus diesem Grund untersuchen verschiedene Arbeitsgruppen die gerichtete Aufnahme antiviraler Peptide in neuentstehende Viruspartikel. Ein Beispiel sind chimäre Vpr-Aminosäuresequenzen mit Interface-Peptiden, die zur gezielten Präsentation der antiviralen Peptide in Viruspartikel führen (Cartas et al., 2001).

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum Transport intrazellulär exprimierter nicht-viraler Proteine zur Zytoplasmamembran, dem Ort der Virusassemblierung und zur gezielten Verpackung in Viruspartikel durchgeführt. Als *leader*-Sequenz für eine Verpackung wurde das virale Gag-Protein gewählt. Gag wurde zum einen für die Untersuchungen verwendet, da es alle notwendigen Eigenschaften für eine Verpackung in Viruspartikel aufweist und zum anderen das Substrat der viralen Protease ist. Die schematische Zeichnung in der Abb. 27 zeigt die autokatalytische Prozessierung der viralen Protease aus Gag-Pol, sowie die Prozessierung von Gag-Pol und Gag Vorläuferproteinen (Abb. 27 A). Die Fusion nicht-viraler Sequenzen C-terminal an das Gag-Protein könnte die fusionierte Sequenz nicht nur in das Viruspartikel bringen, sondern auch in die unmittelbar Nähe der viralen Protease (Abb. 27 B).

A)

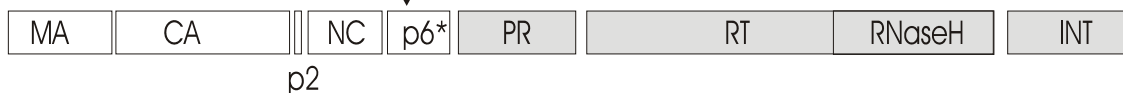
✘ a. P.: Autokatalytische Prozessierung der Proteasemonomere aus dem Vorläuferprotein in *trans*



Gag-Pol Vorläuferprotein ✘ a. P. ✘



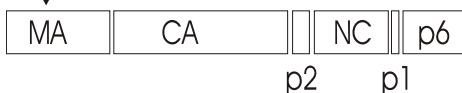
Prozessierung von Gag-Pol durch die Protease



Gag (p55)



Prozessierung von Gag durch die Protease



B)



Evtl. Inhibition der autokatalytischen Freisetzung der Proteasemonomere durch Interaktion von Peptidsequenzen der Gag-Fusionsproteine mit der Proteasesequenz im Gag-Pol Protein

**Abb. 27 Schema der Prozessierung von Gag und Gag-Pol mit der Modellvorstellung des Gag-Fusionsproteins**

MA: Matrixprotein; CA: Capsidprotein; NC: Nukleokapsidprotein; p6: Linkerprotein; p6\*: Transframeprotein; p2 und p1: kurze Spacerproteine; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; INT: Integrase.

Für eine spätere Kombination von viralen *leader*-Sequenzen mit Interface-Peptiden gegen die HIV-Protease könnte die Nähe zur Proteasemonomersequenz im Gag-Pol Rahmen evtl. die autokatalytische Prozessierung der viralen Protease verhindern.

Anstelle der antiviral wirksamen Interface-Peptide wurde EGFP für die Untersuchung der Verpackung benutzt. Neben dem Gag<sup>Δp6</sup>-EGF-Protein wurde noch ein Fusionsprotein verwendet (Myr<sup>+</sup>-EGFP), das als *leader*-Sequenz, nur die ersten 31 Aminosäuren des Matrix-Proteins (MA) enthält. Dieser Abschnitt des MA-Proteins, welches selbst N-terminaler Bestandteil des Gag-Vorläuferproteins ist, enthält das Signal für die posttranslationale Myristilierung und eine Domäne basischer Aminosäuren, die wichtig ist für die Anlagerung an die Zytoplasmamembran. Durch Myr<sup>+</sup>-EGFP sollte untersucht werden, ob dieser Bereich, der auch bei Gag und Gag-Pol-Proteinen für den Transport und die Anlagerung an die Zellmembran verantwortlich ist, ausreicht für eine Verpackung in Viruspartikel. Als Kontrolle diente EGFP. Die Proteine wurden durch Expressionsvektoren intrazellulär exprimiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren wurden erstmals 1999 am Deutschen Primatenzentrum kloniert (Strom, 1999). Die Verwendung dieser Expressionsplasmide war im LC-5 Zellsystem nicht zu friedensstellend. Das Gag-Fusionsprotein wurde nur sehr schwach exprimiert und im Western-Blot lief die Myr<sup>+</sup>-EGFP Bande unterhalb von EGFP. Aus diesen Gründen wurden die Vektoren im Rahmen dieser Arbeit noch einmal hergestellt. Das Laufverhalten von Myr<sup>+</sup>-EGFP zu EGFP war bei den neu hergestellten Vektoren wie bei den getesteten Expressionsplasmiden von Strom (1999), d.h. Myr<sup>+</sup>-EGFP lief unterhalb der EGFP-Bande. Durch eine erneute Sequenzierung der Klone konnte eine Verwechslung und ein Stopp-Codon im Leserahmen von Myr<sup>+</sup>-EGFP ausgeschlossen werden.

Durch Transfektion der Expressionsvektoren in LC-5 Zellen und die Untersuchung durch Fluoreszenzmikroskopie und Western-Blot mit EGFP-Antikörpern und humanem HIV-1 spezifischen Antiserum wurde eine unterschiedliche Lokalisation der verschiedenen EGF-Proteine in den Zellen nachgewiesen. Fluoreszenzaufnahmen EGFP exprimierender LC-5 Zellen zeigten eine Fluoreszenz von EGFP über die Zelle. Für Myr<sup>+</sup>-EGFP exprimierende Zellen wurde das EGF-Fusionsprotein zwar auch in der gesamten Zelle nachgewiesen aber im Gegensatz zu EGFP war es stärker membranassoziiert. Im Gegensatz dazu wiesen Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP exprimierende Zellen starke lokale Fluoreszenzsignale an der Zytoplasmamembran auf. Für Gag ist bekannt, dass sich Gag-Moleküle an der Zytoplasmamembran zu sogenannten "*rafts*" (Flößen) und "*barges*", raft-ähnlichen Membranmikrodomänen zusammenlagern (Lindwasser et al., 2001). Die Deletion von p6 des Gag-Polyproteins hat keine Auswirkung auf die Ausbildung von "*rafts*" an der Zytoplasmamembran (Lindwasser et al., 2001). Die starken lokalen Fluoreszenzsignale an den Zytoplasmamembranen Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP exprimierender LC-5 Zellen weisen auf solche

Zusammenlagerung hin. Für die ersten 31 Aminosäuren des MA-Proteins, mit der Aminosäure Glycin an Position 2, welche nach Entfernung der ersten Aminosäure posttranslational myristiliert wird und der basischen Aminosäuredomäne ist beschrieben, dass diese Sequenz für den Transport und die Bindung von Gag und Gag-Pol an die Zytoplasmamembran wichtig ist (Zhou et al., 1994). Das Myr<sup>+</sup>-EGFP lagerte sich aber nicht nur an der Zytoplasmamembran an, sondern z.B. auch an der Membran des Zellkerns. Der Transport an die verschiedensten zellulären Membranen kann an der Deletion des C-Terminus des MA-Proteins liegen. Für diesen Teil konnte gezeigt werden, dass er einen Einfluss auf die Transportrichtung von Gag hat (Ono et al., 2000a).

Die Fluoreszenzaufnahmen wiesen auch Unterschiede in den Expressionsstärken der verschiedenen EGF-Proteine nach. Diese Unterschiede in der Expression wurden durch die Western-Blot Untersuchungen mit EGFP-Antikörpern bestätigt. 24 h nach der Transfektion konnten Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP, Myr<sup>+</sup>-EGFP als auch EGFP in der Zytosolfraktion detektiert werden. Für EGFP wurden die stärksten Bandensignale detektiert, die Bandenstärken von Myr<sup>+</sup>-EGFP waren schwächer und das Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Bandensignal noch schwächer. In der Membranfraktion konnten nur schwache Banden an EGFP nachgewiesen werden, hier waren die Banden von Myr<sup>+</sup>-EGFP deutlich stärker und die Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP Bande war von der Stärke vergleichbar mit EGFP, obwohl Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP viel geringer exprimiert wurde.

Im Gegensatz zu den Fluoreszenzaufnahmen, wo Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP deutlich an der Zytoplasmamembran nachgewiesen wurde, wies der Western-Blot mit EGFP-Antikörper nur wenig EGFP mit den viralen *leader*-Sequenzen Gag<sup>Δp6</sup> nach. Dies lässt auf einen Transport an die Zytoplasmamembran schließen, wobei der Western-Blot zeigt, dass es noch nicht zu einer Interaktion mit der Membran kam. Im Zellkulturüberstand konnte 24 h nach Transfektion der verschiedenen Expressionsvektoren keine EGF-Proteine im Western-Blot nachgewiesen werden.

## 5.9 Einfluss der viralen *leader*-Sequenzen auf die Lokalisation von EGFP

Die zelluläre Lokalisation der verschiedenen EGF-Proteine wurde durch die Kotransfektion verschiedener Mengen des molekularen HIV-1 Klons pNL4-3 nicht verändert. Auch in Western-Blot Untersuchungen der Zytosolfractionen 48 h nach Kotransfektion von LC-5 Zellen wurden alle drei EGFP-Varianten nachgewiesen, die Bandenstärke nahm auch hier



wieder von EGFP über Myr<sup>+</sup>-EGFP nach Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP ab. Durch den Western-Blot mit humanem HIV-1 spezifischen Antiserum konnte gezeigt werden, dass mit Verringerung der Menge des transfizierten molekularen HIV-1 Klon pNL4-3, die Expression viraler Proteine in der Zytoplasmafraktion abnahm. Im Gegensatz dazu stieg die nachgewiesene Menge von Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP an. Der Nachweis, dass die transfizierte pNL4-3 Menge in Korrelation zur Virusproteinexpression stand, konnte auch für die Membranfraktion erbracht werden. Auch in der Membranfraktion stieg der Gehalt von Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP mit Verringerung der transfizierten Menge pNL4-3 an. Im Gegensatz zur Zytoplasmafraktion konnte hier für Myr<sup>+</sup>-EGFP und nicht für EGFP das stärkste Bandensignal detektiert werden. Auch für Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP war das Bandensignal stärker als in der Zytoplasmafraktion. Die Unterschiede in den verschiedenen Membranfraktionen zeigen deutlich eine Veränderung in der Lokalisation der EGF-Proteine mit viraler *leader*-Sequenz gegenüber EGFP auf. Während EGFP in der gesamten Zelle vorliegt, sind die Proteine mit viraler *leader*-Sequenz eher Membran-assoziiert. Ob diese Assoziation mit der Membranfraktion auch eine Aufnahme der EGF-Proteine in neuentstehende Viruspartikel bewirkt, wurde durch Western-Blot Untersuchung von Viruspräparationen mit EGFP-Antikörper und humanem HIV-1 spezifischen Antiserum nachgewiesen.

Im Gegensatz zur Kontrolle (Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP allein), für die kein EGF-Fusionsprotein im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnte, wurden sowohl in den Kontrollansätzen mit pMyr<sup>+</sup>-EGFP als auch pEGFP die entsprechenden EGF-Proteine nachgewiesen. Das Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP-Bandensignal in den Viruspräparationen der verschiedenen Kotransfektionsansätze war schwach. Statt dessen wurde ein starkes Bandensignal für ein Protein detektiert, dessen Laufhöhe im Bereich von EGFP lag, d.h. es kam zur Prozessierung des Gag<sup>Δp6</sup>-EGF-Fusionsproteins. Dies zeigt die Verpackung von Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP in neuentstehende Viruspartikel, in denen die virale Protease enzymatisch aktiv wird. Da in keiner der zellulären Fraktionen eine Prozessierung des Fusionsproteins nachgewiesen wurde, deutet der Nachweis auf eine Prozessierung durch die HIV-1 Protease hin.

Die in den Viruspräparation der Myr<sup>+</sup>-EGFP Kotransfektionsansätze nachgewiesenen stärkeren Bandensignal im Vergleich zur Kontrolle Myr<sup>+</sup>-EGFP lassen auch hier den Rückschluss auf eine Verpackung zu. Interessanter Weise ist das Bandensignal von Myr<sup>+</sup>-EGFP bei geringerer Virusbildung stärker als bei hoher Virusbildung. Die Bandensignale von EGFP belegen eine Aufnahme in die Viruspartikel. Mit Zunahme der Virusbildung steigt auch die Bandenstärke an. Aufgrund der starken Expression und gleich

mäßigen Verbreitung von EGFP in der gesamten Zelle, kann für EGFP eher von einer zufälligen Aufnahme und Verpackung in die Viruspartikel ausgegangen werden.

### 5.10 Virale *leader*-Sequenzen zur Verpackung nicht-viraler Proteine in HI-Virionen

Durch die Fusion von EGFP an die virale *leader*-Sequenzen Gag<sup>Δp6</sup> bzw. Myr<sup>+</sup> wiesen die Proteine eine andere intrazelluläre Lokalisation im Vergleich zum EGFP Kontrollprotein auf. Während für EGFP im Western-Blot starke Banden in den Zytosolfractionen transfizierter Zellen nachgewiesen wurden, zeigten sich für die Fusionsproteine stärkere Banden in den Membranfraktionen. Durch Fluoreszenzaufnahmen transfizierter LC-5 Zellen konnte gezeigt werden, dass sich EGFP mit viraler *leader*-Sequenz Gag<sup>Δp6</sup> bzw. Myr<sup>+</sup> an der Zytoplasmamembran anlagert. Diese experimentellen Daten belegen, dass durch die viralen *leader*-Sequenzen intrazellulär exprimierte nicht-virale Proteine zur Zytoplasmamembran dirigiert werden können, dem Ort der Virusassemblierung. Durch Western-Blot Untersuchungen mit Viruspartikeln aus dem Zellkulturüberstand kotransfizierter LC-5 Zellen konnten Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP, Myr<sup>+</sup>-EGFP und EGFP nachgewiesen werden. Das in Viruspartikel verpackt Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP wurde durch die virale Protease stark prozessiert. Es war deutlich mehr durch Prozessierung abgespaltenes EGFP nachweisbar als Fusionsprotein Gag<sup>Δp6</sup>-EGFP. Dies zeigt, dass durch die Fusion an die virale Gag-Sequenz, dass nicht-virale Protein in die unmittelbare Nähe der viralen Protease gelangt. Die Verwendung von Gag<sup>Δp6</sup> als virale *leader*-Sequenz zur Verpackung von intrazellulär exprimierten inhibitorischen Peptiden der HIV-Protease bietet sich aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung an.

### 5.11 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kotransfektionsexperimente zur Untersuchung des antiviralen Effekts intrazellulär exprimierter Interface-Peptide gegen HIV-1 und zur Verpackung nicht-viraler Proteinsequenzen in HI-Virionen haben gezeigt, dass es zur Hemmung von HIV-1 und zur Verpackung nicht-viraler Proteine in Viruspartikel kam.

Die verwendeten *in vitro* Systeme eignen sich zum Nachweis eines antiviralen Effekts intrazellulär exprimierter Peptide gegen HIV-1. Durch die Verwendung eines transienten Kofektionssystems können Wirkungen und Effekte der Interface-Peptide jedoch nur über einen kurzen Zeitraum beobachtet werden. Aus diesem Grund ist die Etablierung stabiltransfizierter Zelllinien geplant, die es ermöglichen die Peptide über einen längeren Zeitraum zu exprimieren. Die Verwendung stabiltransfizierter Zelllinien erlaubt die Durchführung von Langzeitstudien und Tests gegen die verschiedensten Virusisolate. Mit diesen geplanten Untersuchungen kann gezeigt werden ob Resistenzen gegen diesen Inhibitor vorhanden sind oder auftreten. Neben der Etablierung permanenter Zelllinien ist die Etablierung eines direkten Nachweisverfahrens für die Interface-Peptide geplant. Durch den direkten Nachweis der Interface-Peptide können die Wirkmechanismen gegen HIV-1 in folgenden Untersuchungen weiter charakterisiert werden.

Die Verpackung nicht-viraler Proteine in neu entstehende Viruspartikel konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Es ist geplant, nach der Etablierung eines Nachweissystems für die Peptide, Vektoren zur intrazellulären Expression von Interface-Peptiden mit viraler *leader*-Sequenz herzustellen. In weiteren Versuchen soll dann geklärt werden, zu welchen Effekten es gegen HIV-1 durch direkte Verpackung der Inhibitoren kommt.

## 6. Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war die Identifizierung von intrazellulär exprimierten Peptidsequenzen, die die Proteaseaktivität und damit verbunden die HIV-Replikation inhibieren, und die Etablierung eines Verfahrens, mit dem intrazellulär exprimierte Peptide gezielt in neu gebildete Viren eingeschleust werden können, um an den Ort zu gelangen, an der die Protease aktiv ist.

Gegen die zur Zeit verwendeten Proteaseinhibitoren des aktiven Zentrums kommt es schnell zur Ausbildung von Resistenzen. Die Beschreibung neuer Inhibitoren ist daher notwendig für die weitergehende Hemmung der HIV-1 Protease in der Therapie. Das Problem der untersuchten Peptide, die attraktive Alternativen zu bestehenden Inhibitoren sein können, ist deren geringe Bioverfügbarkeit. Diese kann in der Zukunft möglicherweise durch den Einsatz gentherapeutischer Methoden überwunden werden. Daher sollten peptidexprimierende Vektoren charakterisiert werden, deren Aktivität die Vermehrung von HIV-1 inhibiert. Im weiteren sollte ein Verfahren erarbeitet werden, mit dem solche intrazellulär exprimierten Peptide gezielt zu ihrem Wirkungsort, den unreifen neugebildeten Viren transportiert werden können.

Es wurden verschiedene Expressionsvektoren identifiziert, von denen ausgehend die Replikation von HIV-1 inhibiert wird. Die inhibierende Aktivität wurde in zwei verschiedenen *in vitro* Systemen untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der beobachteten Inhibition unterschiedliche Mechanismen zugrunde lagen. Bei einigen der untersuchten Peptide liegt der inhibierenden Wirkung mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Wechselwirkung mit der Protease zugrunde. Ob es sich dabei jedoch um Interaktionen mit der Interface Region handelt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Bei anderen Peptiden sind es mit hoher Wahrscheinlichkeit von der viralen Protease unabhängige Faktoren, die für die Inhibition verantwortlich sind. Die Aufklärung dieser Faktoren muss weiteren Arbeiten vorbehalten bleiben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein spezifischer Aspekt des Drug Delivery untersucht. Es wurde der Frage nachgegangen, wie ein Peptid nach intrazellulärer Expression an seinen Wirkungsort innerhalb des Virus gelangen kann. Es konnte gezeigt werden, dass unter Ausnutzung viraler Mechanismen Peptidsequenzen gezielt in neu entstehende Viruspartikel

eingeschleust werden können. Die Fusion der peptidexprimierenden Sequenz ermöglichte es, dass das Fusionsprotein integraler Teil des neu entstehenden Kapsids innerhalb des umhüllten Virus wurde. Die zusätzliche Insertion einer Schnittstelle für die virale Protease ist mit hoher Wahrscheinlichkeit dafür verantwortlich, dass das Fusionsprotein prozessiert und das Peptid freigesetzt wurde. Um diese Prozesse anschaulich und eindeutig zu dokumentieren, wurden die entsprechenden Versuche mit dem EGFP durchgeführt. Die Übertragung dieses Transportmechanismus auf die antiviral wirksamen, intrazellulär exprimierten Peptide war allerdings noch nicht möglich, da es zur Zeit keine Möglichkeit gab, die Einschleusung der Peptide in die Viren eindeutig nachzuweisen. Es sind deshalb Versuche geplant, entsprechende Nachweismethoden zu etablieren und die Aufnahme von Interface-Peptiden in sich neu bildende Viren in Zukunft zu untersuchen.

---

## 7. Literatur

- Ammann, A. J., D. Abrams, M. Conant, D. Chudwin, M. Cowan, P. Volberding, B. Lewis, and C. Casavant.** 1983. Acquired immune dysfunction in homosexual men: immunologic profiles. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **27**:315-325.
- Ast, O., K. D. Jentsch, H. J. Schramm, G. Hunsmann, W. Luke, and H. Petry.** 1998. A rapid and sensitive bacterial assay to determine the inhibitory effect of 'interface' peptides on HIV-1 protease co-expressed in *Escherichia coli*. *J.Virol.Methods* **71**:77-85.
- Ast O.** 1998. Entwicklung von Vektoren zur Gentherapie der HIV-Infektion. Dissertation, Universität Göttingen
- Babe, L. M., J. Rose, and C. S. Craik.** 1992. Synthetic "interface" peptides alter dimeric assembly of the HIV 1 and 2 proteases. *Protein Sci.* **1**:1244-1253.
- Baltimore, D.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**:1209-1211.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
- Berlyn M.K.B., Brooks Low K. and K. E. Rudd.** 1996. Linkage map of *Escherichia coli* K12. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. (Neidhardt F.C., Curtis III. R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Brooks Low K., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M. und Umbarger H.E.; Hrsg.), 1715-1902; ASM Press, Washington D.C.
- Birnbaum H.C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.*, **7**: 1513-1525.
- Blumenzweig, I., L. Baraz, A. Friedler, U. H. Danielson, C. Gilon, M. Steinitz, and M. Kotler.** 2002. HIV-1 Vif-derived peptide inhibits drug-resistant HIV proteases. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **292**:832-840.

- Borman, A. M., C. Quillent, P. Charneau, C. Dauguet, and F. Clavel.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J.Virol.* **69**:2058-2067.
- Cann, A. J. and J. Karn.** 1989. Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle. *AIDS* **3 Suppl 1**:S19-S34.
- Cartas, M., S. P. Singh, D. Serio, T. A. Rizvi, V. S. Kalyanaraman, C. S. Goldsmith, S. R. Zaki, I. T. Weber, and A. Srinivasan.** 2001. Intravirion display of a peptide corresponding to the dimer structure of protease attenuates HIV-1 replication. *DNA Cell Biol.* **20**:797-805.
- Centers for Disease Control (CDC).** 1982a. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - United States. *Morb. Mort. Weekly Rep.*, **31**: 507-514
- Centers for Disease Control (CDC).** 1982b. *Pneumocystis carinii* pneumonia among persons with hemophilia A. *Morb. Mort. Weekly Rep.*, **31**: 365-367
- Centers for Disease Control (CDC).** 1982c. Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. *Morb. Mort. Weekly Rep.*, **31**: 652-654
- Centers for Disease Control (CDC).** 1982d. CDC task force on Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *N. Engl. J. Med.*, **306**: 248-252
- Chen, B. K., R. T. Gandhi, and D. Baltimore.** 1996. CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef. *J.Virol.* **70**:6044-6053.
- Chen, R. Y., J. M. Kilby, and M. S. Saag.** 2002. Enfuvirtide. *Expert.Opin.Investig.Drugs* **11**:1837-1843.
- Chien, A., D. B. Edgar, and J. M. Trela.** 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J.Bacteriol.* **127**:1550-1557.
- Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**:691-695.

- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and .** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-346.
- Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and .** 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* **232**:697.
- Coffin J.M.** 1996. Kapitel 58: Retroviridae: the virus and their replication. *Fields Virology*, Third Edition, Lippincott-Raven Publishers: 1785
- Cohen, S. N., A. C. Chang, and L. Hsu.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69**:2110-2114.
- Collier, A. C., R. W. Coombs, D. A. Schoenfeld, R. L. Bassett, J. Timpone, A. Baruch, M. Jones, K. Facey, C. Whitacre, V. J. McAuliffe, H. M. Friedman, T. C. Merigan, R. C. Reichman, C. Hooper, and L. Corey.** 1996. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *N.Engl.J.Med.* **334**:1011-1017.
- Cullen, B. R.** 1992. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol.Rev.* **56**:375-394.
- Daar, E. S., X. L. Li, T. Moudgil, and D. D. Ho.** 1990. High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**:6574-6578.
- de Soultrait, V. R., A. Caumont, V. Parissi, N. Morellet, M. Ventura, C. Lenoir, S. Litvak, M. Fournier, and B. Roques.** 2002. A novel short peptide is a specific inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J.Mol.Biol.* **318**:45-58.
- Dufoort, G., A. M. Courouce, R. Ancelle-Park, and O. Bletry.** 1988. No clinical signs 14 years after HIV-2 transmission via blood transfusion. *Lancet* **2**:510.
- el Farrash, M. A., M. J. Kuroda, T. Kitazaki, T. Masuda, K. Kato, M. Hatanaka, and S. Harada.** 1994. Generation and characterization of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mutant resistant to an HIV-1 protease inhibitor. *J.Virol.* **68**:233-239.



- Espeseth, A. S., P. Felock, A. Wolfe, M. Witmer, J. Grobler, N. Anthony, M. Egbertson, J. Y. Melamed, S. Young, T. Hamill, J. L. Cole, and D. J. Hazuda.** 2000. HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:11244-11249.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**:872-877.
- Fenouillet, E. and I. M. Jones .** 1995. The glycosylation of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) is important for the efficient intracellular transport of the envelope precursor gp160. *J.Gen.Virol.* **76 ( Pt 6)**:1509-1514.
- Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R. E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D. Ho, D. D. Richman, and R. F. Siliciano.** 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **278**:1295-1300.
- Finzi, D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T. C. Quinn, R. E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R. F. Siliciano.** 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat.Med.* **5**:512-517.
- Fouchier, R. A. and M. H. Malim.** 1999. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Advances in Virus Research* **52**:275-299.
- Friedman-Kien, A. E.** 1981. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J.Am.Acad.Dermatol.* **5**:468-471.
- Fujiwara, T. and R. Craigie.** 1989. Integration of mini-retroviral DNA: a cell-free reaction for biochemical analysis of retroviral integration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**:3065-3069.
- Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, and J. Sodroski.** 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J.Virol.* **66**:3306-3315.

- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and .** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-503.
- Gelderblom H.R., Reupke H., Winkel T., Kunze R. and G. Pauli.** 1987. MHC-Antigens: constituents of the envelope of human and simian immunodeficiency viruses. *Z. Naturforsch.*, **42c**: 1328-1334
- Gelderblom, H. R.** 1991. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**:617-637.
- Gluzman, Y.** 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**:175-182.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N.Engl.J.Med.* **305**:1425-1431.
- Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**:5781-5785.
- Gowda, S. D., B. S. Stein, and E. G. Engleman.** 1989. 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.
- Greene, J. B., G. S. Sidhu, S. Lewin, J. F. Levine, H. Masur, M. S. Simberkoff, P. Nicholas, R. C. Good, S. B. Zolla-Pazner, A. A. Pollock, M. L. Tapper, and R. S. Holzman.** 1982. Mycobacterium avium-intracellulare: a cause of disseminated life-threatening infection in homosexuals and drug abusers. *Ann.Intern.Med.* **97**:539-546.
- Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**:662-669.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, S. K. Arya, M. Popovic, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal.** 1984. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature* **312**:166-169.

- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**:557-580.
- Harada, S., Y. Koyanagi, and N. Yamamoto.** 1985. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* **229**:563-566.
- Hartley, J. L. and T. J. Gregori.** 1981. Cloning multiple copies of a DNA segment. *Gene* **13**:347-353.
- Haseltine, W. A., J. Sodroski, and C. A. Rosen.** 1986. Control of gene expression and the replication and pathogenesis of retroviruses. *Important Adv.Oncol.* 159-172.
- Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman.** 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**:7311-7315.
- Highleyman L.** 2000. Adverse Effects associated with antiretroviral therapy. BETA, Spring. <http://hiv.net/link.php?id=8>
- Huang, M., J. M. Orenstein, M. A. Martin, and E. O. Freed.** 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J.Virol.* **69**:6810-6818.
- Huang, M., and M. A. Martin.** 1997. Incorporation of Pr160gag-pol into virus particles requires the presence of both the major homology region and adjacent c-terminal capsid sequences within the Gag-Pol polyprotein. *J.Virol.* **71**:4472-4478
- Ibelgaufth H.** 1993. *Gentechnologie von A bis Z.* VCH Verlagsgesellschaft, 471-472
- Jacobs, E., D. Gheysen, D. Thines, M. Francotte, and M. de Wilde.** 1989. The HIV-1 Gag precursor Pr55gag synthesized in yeast is myristoylated and targeted to the plasma membrane. *Gene* **79**:71-81.
- Jacobson, J. M., I. Lowy, C. V. Fletcher, T. J. O'Neill, D. N. Tran, T. J. Ketas, A. Trkola, M. E. Klotman, P. J. Maddon, W. C. Olson, and R. J. Israel.** 2000. Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV- infected adults. *J.Infect.Dis.* **182**:326-329.

- Kaplan, A. H. and R. Swanstrom** . 1991. Human immunodeficiency virus type 1 Gag proteins are processed in two cellular compartments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:4528-4532.
- Kaplan, A. H., J. A. Zack, M. Knigge, D. A. Paul, D. J. Kempf, D. W. Norbeck, and R. Swanstrom**. 1993. Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. *J.Virol.* **67**:4050-4055.
- Kaplan, A. H., M. Manchester, and R. Swanstrom**. 1994. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J.Virol.* **68**:6782-6786.
- Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag**. 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat.Med.* **4**:1302-1307.
- Kimura, T., M. Nishikawa, and A. Ohyama**. 1994. Intracellular membrane traffic of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: vpu liberates Golgi-targeted gp160 from CD4- dependent retention in the endoplasmic reticulum. *J.Biochem.(Tokyo)* **115**:1010-1020.
- Kliger, Y., S. G. Peisajovich, R. Blumenthal, and Y. Shai**. 2000. Membrane-induced conformational change during the activation of HIV-1 gp41. *J.Mol.Biol.* **301**:905-914.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, and L. S. Oshiro**. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**:840-842.
- Levy, J. A.** 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol.Rev.* **57**:183-289.

- Li, T. S., R. Tubiana, C. Katlama, V. Calvez, M. H. Ait, and B. Autran.** 1998. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* **351**:1682-1686.
- Lieder, K.** 1998. Untersuchungen zur Wirksamkeit intrazellulär exprimierter HIV-1-spezifischer Proteaseinhibitoren. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Lin, Y., X. Lin, L. Hong, S. Foundling, R. L. Heinrikson, S. Thaisrivongs, W. Leelamanit, D. Ratterman, M. Shah, B. M. Dunn, and .** 1995. Effect of point mutations on the kinetics and the inhibition of human immunodeficiency virus type 1 protease: relationship to drug resistance. *Biochemistry* **34**:1143-1152.
- Lindwasser, O. W. and M. D. Resh.** 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J.Virol.* **75**:7913-7924.
- Malim, M. H., S. Bohnlein, R. Fenrick, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**:8222-8226.
- Malim, M. H., R. Fenrick, D. W. Ballard, J. Hauber, E. Bohnlein, and B. R. Cullen.** 1989. Functional characterization of a complex protein-DNA-binding domain located within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat leader region. *J.Virol.* **63**:3213-3219.
- Martinez-Picado, J., M. P. DePasquale, N. Kartsonis, G. J. Hanna, J. Wong, D. Finzi, E. Rosenberg, H. F. Gunthard, L. Sutton, A. Savara, C. J. Petropoulos, N. Hellmann, B. D. Walker, D. D. Richman, R. Siliciano, and R. T. D'Aquila.** 2000. Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* **97**:10948-10953.
- Masur, H., M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, and S. Cunningham-Rundles.** 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N.Engl.J.Med.* **305**:1431-1438.
- Mcdougal, J. S., M. S. Kennedy, J. M. Sligh, S. P. Cort, A. Mawle, and J. K. Nicholson.** 1986. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* **231**:382-385.

- Mellert, W., A. Kleinschmidt, J. Schmidt, H. Festl, S. Emler, W. K. Roth, and V. Erfle.** 1990. Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1. *AIDS* **4**:527-535.
- Miyoshi, I., I. Kubonishi, S. Yoshimoto, T. Akagi, Y. Ohtsuki, Y. Shiraishi, K. Nagata, and Y. Hinuma.** 1981. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* **294**:770-771.
- Mocroft, A., S. Vella, T. L. Benfield, A. Chiesi, V. Miller, P. Gargalianos, M. A. d'Arminio, I. Yust, J. N. Bruun, A. N. Phillips, and J. D. Lundgren.** 1998. Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group. *Lancet* **352**:1725-1730.
- Modrow S. and D. Falke.** 1997. *Molekular Virologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag
- Morikawa, Y., D. J. Hockley, M. V. Nermut, and I. M. Jones.** 2000. Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly. *J.Virol.* **74**:16-23.
- Muesing, M. A., D. H. Smith, C. D. Cabradilla, C. V. Benton, L. A. Lasky, and D. J. Capon.** 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**:450-458.
- Muesing, M. A., D. H. Smith, and D. J. Capon.** 1987. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans- activator protein. *Cell* **48**:691-701.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.
- O'Brien, W. A.** 2000. Resistance against Reverse Transcriptase Inhibitors. *Clinical Infectious Diseases* **30**:185-192.
- Ono, A., D. Demirov, and E. O. Freed.** 2000. Relationship between human immunodeficiency virus type 1 Gag multimerization and membrane binding. *J.Virol.* **74**:5142-5150.
- Ono, A., J. M. Orenstein, and E. O. Freed.** 2000. Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J.Virol.* **74**:2855-2866.

- 
- Pal, R., M. S. Reitz, Jr., E. Tschachler, R. C. Gallo, M. G. Sarngadharan, and F. D. Veronese.** 1990. Myristoylation of gag proteins of HIV-1 plays an important role in virus assembly. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **6**:721-730.
- Pepin, J., G. Morgan, D. Dunn, S. Gevao, M. Mendy, I. Gaye, N. Scollen, R. Tedder, and H. Whittle.** 1991. HIV-2-induced immunosuppression among asymptomatic West African prostitutes: evidence that HIV-2 is pathogenic, but less so than HIV-1. *AIDS* **5**:1165-1172.
- Perez, L. G., M. A. O'Donnell, and E. B. Stephens.** 1992. The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *J.Virol.* **66**:4134-4143.
- Ratner, L., W. Haseltine, R. Patarca, K. J. Livak, B. Starcich, S. F. Josephs, E. R. Doran, J. A. Rafalski, E. A. Whitehorn, K. Baumeister, and .** 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**:277-284.
- Rose, J. R., L. M. Babe, and C. S. Craik.** 1995. Defining the level of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease activity required for HIV-1 particle maturation and infectivity. *J.Virol.* **69**:2751-2758.
- Rosen, C. A., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1985. The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* **41**:813-823.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Sambrook J., Fritsch E.F., and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samson, M., O. Labbe, C. Mollereau, G. Vassart, and M. Parmentier.** 1996. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* **35**:3362-3367.
- Sanchez-Pescador, R., M. D. Power, P. J. Barr, K. S. Steimer, M. M. Stempien, S. L. Brown-Shimer, W. W. Gee, A. Renard, A. Randolph, J. A. Levy, and .** 1985. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* **227**:484-492.

- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**:5463-5467.
- Schieferstein, C.** Managment von Nebenwirkugen. 2002.
- Schramm, H. J., H. Nakashima, W. Schramm, H. Wakayama, and N. Yamamoto.** 1991. HIV-1 reproduction is inhibited by peptides derived frm t. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **179**:847-851.
- Schramm, H. J., G. Breipohl, J. Hansen, S. Henke, E. Jaeger, C. Meichsner, G. Riess, D. Ruppert, K. P. Rucknagel, W. Schafer, and .** 1992. Inhibition of HIV-1 protease by short peptides derived from the terminal segments of the protease. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **184**:980-985.
- Schramm, H. J., A. Billich, E. Jaeger, K. P. Rucknagel, G. Arnold, and W. Schramm.** 1993. The inhibition of HIV-1 protease by interface peptides. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **194**:595-600.
- Schramm, H. J., J. Boetzel, J. Buttner, E. Fritsche, W. Gohring, E. Jaeger, S. Konig, O. Thumfart, T. Wenger, N. E. Nagel, and W. Schramm.** 1996. The inhibition of human immunodeficiency virus proteases by 'interface peptides'. *Antiviral Res.* **30** :155-170.
- Shafer, R. W., D. R. Jung, B. J. Betts, Y. Xi, and M. J. Gonzales.** 2000. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res.* **28**:346-348.
- Shafer, R. W.** 2002. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* **15**:247-277.
- Siegal, F. P., C. Lopez, G. S. Hammer, A. E. Brown, S. J. Kornfeld, J. Gold, J. Hassett, S. Z. Hirschman, C. Cunningham-Rundles, B. R. Adelsberg, and .** 1981. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N.Engl.J.Med.* **305**:1439-1444.
- Strom, A.** 1999. Entwicklung von Vektoren zur Expression membranassoziierter HIV-1 Protease-Inhibitoren. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Swanstrom, R., Wills, and J.W.** Synthesis, assembly and processing of viral proteins. Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. *Retrovirus.* 263-334. 1997. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.



- Temin, H. M. and S. Mizutani.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**:1211-1213.
- Trkola, A., T. J. Ketas, K. A. Nagashima, L. Zhao, T. Cilliers, L. Morris, J. P. Moore, P. J. Maddon, and W. C. Olson.** 2001. Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J.Virol.* **75**:579-588.
- Vaheri, A. and J. S. Pagano.** 1965. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology* **27**:434-436.
- Wain-Hobson, S., P. Sonigo, O. Danos, S. Cole, and M. Alizon.** 1985. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* **40**:9-17.
- Weber, I. T.** 1990. Comparison of the crystal structures and intersubunit interactions of human immunodeficiency and Rous sarcoma virus proteases. *J.Biol.Chem.* **265**:10492-10496.
- Weber, K. and M. Osborn.** 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Biol.Chem.* **244**:4406-4412.
- Weiss, B., A. Jacquemin-Sablon, T. R. Live, G. C. Fareed, and C. C. Richardson.** 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J.Biol.Chem.* **243**:4543-4555.
- Wilk, T. and S. D. Fuller.** 1999. Towards the structure of the human immunodeficiency virus: divide and conquer. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **9**:231-243.
- Wilk, T., I. Gross, B. E. Gowen, T. Rutten, F. de Haas, R. Welker, H. G. Krausslich, P. Boulanger, and S. D. Fuller.** 2001. Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* **75**:759-771.
- Wyatt, R. and J. Sodroski.** 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**:1884-1888.
- Zakowski, P., S. Fligiel, G. W. Berlin, and L. Johnson, Jr.** 1982. Disseminated *Mycobacterium avium*-intracellulare infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. *JAMA* **248**:2980-2982.

- Zhang, Z. Y., R. A. Poorman, L. L. Maggiora, R. L. Heinrikson, and F. J. Kezdy.** 1991. Dissociative inhibition of dimeric enzymes. Kinetic characterization of the inhibition of HIV-1 protease by its COOH-terminal tetrapeptide. *J.Biol.Chem.* **266**:15591-15594.
- Zhou, W., L. J. Parent, J. W. Wills, and M. D. Resh.** 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J.Virol.* **68**:2556-2569.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. W. Liebl schulde ich Dank für die Übernahme des Referats dieser Arbeit und die stete Gesprächsbereitschaft für alle Themen, die diese Arbeit betrafen.

Herrn Prof. Dr. W. Engel danke ich für die Übernahme des Korreferates der Arbeit im Fachbereich Biologie der Georg-August-Universität Göttingen.

Herrn Prof. Dr. G. Hunsmann möchte ich für die Arbeitsmöglichkeiten am Deutschen Primatenzentrum danken.

Den Herrn PD Dr. W. Lüke, Dr. H. Petry und Dr. K.D. Jentsch danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen sowie für die Betreuung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. H. Petry dafür danken, dass er trotz der Auflösung der Arbeitsgruppe die Zeit gefunden hat, die Endphase der Promotionsarbeit auch aus Amerika kritisch zu begleiten. Seine kritischen und konstruktiven Anregungen waren mir eine große Hilfe.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Irantzu Allegria Dallo für ihre tolle Mitarbeit auf dem Gebiet der Hemmung der HIV-1 Protease und wegen ihrer spanischen Mentalität.

Ein großer Dank an Frau Prof. Dr. Einspanier und Fr. Dr. B. Husen, die mein Wissen für Ihre Zwecke recycelt haben und mir so die Möglichkeit boten, nach der Auflösung meiner alten Arbeitsgruppe, diese Arbeit als "Hobby" zu beenden.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Virologie und Immunologie, die ich während meiner Promotionszeit kennengelernt habe, besonders den Mitarbeitern der Labore 313 und 314, danke ich für das nette Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Besonders natürlich Frau Karin Giller, Frau Evelyn Meyer, Frau Corinna Boike und Herrn Alexander Strom.

Bei Herrn Dr. Oliver Ast bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit auf dem weiten Feld der Proteaseforschung. Frau Dr. Claudia Goldmann danke ich vor allem für ihre Hilfsbereitschaft und viele nette Gespräche.

Frau Angelika Jurdzinski, Kerstin Fuhrmann, Alexander Marten und den restlichen "Mädels" meiner neuen Arbeitsgruppe danke ich für das tolle Arbeitsklima und die mir gewährte Unterstützung.

Frau Dr. Martina Blaschke danke ich für Ihr Bemühen aus dem Text die kleinen Fehler des Tippers zu eliminieren. Bei Herrn Dr. Bernhard Kusian bedanke ich mich für die Hilfe beim Druck der Arbeit.

Dank schulde ich auch meiner Tochter Nele für Ihr Verständnis, dass sie mich trotz Ihrer Aussagen: "Papa muss nicht zur Arbeit" hat doch gehen lassen und Dani für ihre Hilfe.

Abschließend gebührt meinen Eltern ein großer Dank, denn ohne Ihr Vertrauen und Ihre Unterstützung hätte ich dieses Ziel nicht erreicht.

### Lebenslauf

Name: Kai Lieder  
Geburtstag, -ort: 30.01.1969, Wolfenbüttel  
Familienstand: verheiratet, eine Tochter  
Staatsangehörigkeit: deutsch

Mai 1989: Abitur am Gymnasium "Große Schule" in Wolfenbüttel  
Juni 1989-Oktober 1990: Grundwehrdienst bei der Marine in Flensburg  
September 1990-Juli 1992: Ausbildung zum staatlich anerkannten Biologisch-technischen Assistenten an der Berufsfachschule Dr. Morgenstern in Braunschweig

Oktober 1992-1998: Studium der Biologie an der Georg-August-Universität, Göttingen  
Oktober 1994: Vordiplomprüfung  
Februar 1997: Mündliche Diplomprüfungen im Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Biochemie und Organische Chemie

März 1997-April 1998: Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit am Deutschen Primatenzentrum, Abt. Virologie und Immunologie bei Herrn Prof. Dr. G. Hunsmann mit dem Thema: Untersuchungen zur Wirksamkeit intrazellulär exprimierter HIV-1 spezifischer Proteaseinhibitoren

Juli 1998-Juni 2001: Doktorand am Deutschen Primatenzentrum, Abt. Virologie und Immunologie bei Herrn Prof. Dr. G. Hunsmann. Beginn der Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit dem Thema: Interface-Peptide der viralen Protease von HIV-1 als gentherapeutisch einsetzbare antivirale Substanzen

seit Juli 2001: Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abt. Reproduktionsbiologie in der Arbeitsgruppe Ovarphysiologie bei Frau Prof. Dr. A. Einspanier





