

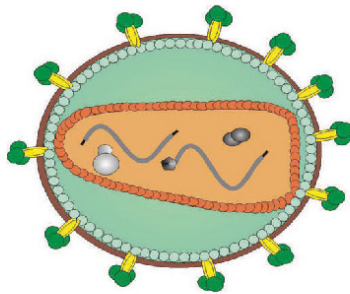


Kai Lieder (Autor)

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

Kai Lieder

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



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3410>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
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
2. Material	14
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
3. Methoden	19
3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	19
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
3.2 Protein-biochemische Methoden	22
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 Zellyse kotransfizierter LC-5 Zellen	27

	Seite
3.3	Verwendete Transfektionsmethoden 28
3.3.1	Transfektion nach der DEAE-Dextranmethode 28
3.3.2	Transfektion von LC-5 Zellen mittels Effectene [®] 28
3.4	Molekulargenetische Methoden 29
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 α 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
3.5	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 39
4.	Ergebnisse 40
4.1	Interface-Peptide und die Wirkung auf HIV-1 40
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 ⁺ 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

	Seite	
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
4.2	Untersuchungen zur Verpackung intrazellulär exprimierter nicht-viraler Proteine	62
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
5.	Diskussion	84
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 ⁺ 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
6.	Zusammenfassung	103
7.	Literatur	105
Anhang		118