

# Identifizierung von Hemmstoffen der HIV-Infektion mittels eines neuen HIV-Indikatorzellsystems

---

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von:

**Markus Helfer**

München, 18. Mai 2011

Helmholtz Zentrum München

Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)

Institut für Virologie

Gutachter:

Prof. Dr. Ruth Brack-Werner

Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Prof. Dr. Bettina Kempkes

Prof. Dr. Ute Voithknecht

Tag der mündlichen Prüfung:

25. 10. 2011

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>HIV</b>	<b>1</b>
1.1.1	Die Globale Situation	1
1.1.2	Epidemiologie und Sozioökonomische Auswirkungen von HIV/AIDS	3
1.1.3	Die Biologie von HIV	4
1.1.3.1	Die Übertragung und Replikation von HIV in humanen Zellen	6
1.1.3.2	Der Eintritt des Virus in die Zielzelle:	6
1.1.3.3	Die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms in DNA	6
1.1.3.4	Die Integration in das Wirtsgenom	8
1.1.3.5	Die Expression der HIV Proteine und Enzyme	9
1.1.3.6	Der Zusammenbau und die Reifung neuer Viren	10
1.1.4	Geschichte von HIV	12
1.1.5	Aktuelle Therapiemöglichkeiten für HIV-Patienten	13
1.1.6	HIV-Testsysteme	15
<b>1.2</b>	<b>Naturstoffe in der Wirkstoffforschung</b>	<b>17</b>
1.2.1	Beispiele bekannter Medikamente mit Naturstoff-Herkunft	17
1.2.2	Niedergang und beginnende Renaissance der Naturstoffforschung	18
1.2.3	Naturstoffe und HIV	20
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>23</b>
2.1.1	Eukaryotische Zelllinien und Zellen	23
2.1.1.1	Herleitung der LC5-RIC Zelllinie von der parentalen HeLa Zelllinie LC5	23
2.1.1.2	Verwendete Zellen und Zelllinien	24
2.1.2	Medien und Lösungen für die Kultivierung eukaryotischer Zellen	25
2.1.2.1	Zellkulturmedium für adhärent wachsende Zellen (HeLa, LC5-CD4, LC5-RIC, LC5-RIC-R5 und HEK-293T)	25
2.1.2.2	Zellkulturmedium für Suspensionszellen (humane T-Lymphom-Zelllinien J-Lat, KE37.1 und KE37.1-HIV-1 <sub>IIIb</sub> )	25
2.1.2.3	Zellkulturmedium für PBMCs (Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts)	26
2.1.2.4	Einfriermedium für eukaryotische Zellen	26
2.1.3	Puffer und spezielle Lösungen	26
2.1.4	Reagenzien und Lösungsmittel	26
2.1.4.1	Lösungsmittel	26
2.1.4.2	Allgemeine Reagenzien und Chemikalien	26
2.1.4.3	HIV Referenzsubstanzen	27
2.1.4.4	Pflanzenmaterial und Phytopharmaka	27

# Inhaltsverzeichnis

---

2.1.4.5	Substanzbibliotheken _____	27
2.1.4.6	Antikörper _____	28
2.1.5	Plasmide _____	28
2.1.6	Verbrauchsmaterial _____	30
2.1.7	Infektiöse Virusüberstände _____	30
2.1.8	Spezielle Geräte _____	31
2.1.9	Spezielle Software _____	32
<b>2.2</b>	<b>Methoden _____</b>	<b>33</b>
2.2.1	Zellkultur für humane Zelllinien und Isolate _____	33
2.2.2	Die Standard Anordnung des EASY-HIT Tests _____	33
2.2.3	Der MTT-Test zur Messung der Zellvitalität _____	34
2.2.4	Validierungsexperimente nach den Vorgaben des NCGC _____	35
2.2.5	Time-Of-Addition Assay - TOA _____	35
2.2.6	PBMC Infektionsassay _____	36
2.2.7	RNA-Isolierung aus humanen Zellen _____	36
2.2.8	Reverse Transkription _____	36
2.2.9	Real-Time PCR _____	36
2.2.10	LightCycler-Ansatz und Amplifikations-Programm _____	37
2.2.11	Viruspräparation in KE37.1 <sub>III</sub> B Zellen _____	38
2.2.12	Viruspräparation in HEK-293T Zellen und Titration mit den LC5-RIC Zellen _____	38
2.2.13	p24 ELISA _____	39
2.2.14	Antikörperfärbungen CD4, CXCR4 und CCR5 _____	39
2.2.15	Detektion von zytoplasmatischem HIV p24 mittels Immunfluoreszenz _____	39
2.2.16	FACS Analysen _____	40
2.2.17	Handhabung und Extraktion von Pflanzenmaterial _____	40
2.2.17.1	EPs 7630® (Umckaloabo®) _____	40
2.2.17.2	Extraktion der getrockneten Wurzeln von Pelargonium sidoides _____	40
2.2.17.3	Extraktion der Wurzeln der frischen Pflanze Pelargonium sidoides _____	41
2.2.17.4	Echinacea Liquidum (Ratiopharm) _____	41
2.2.18	Dünnschichtchromatographie _____	41
2.2.19	Festphasenextraktion „Solid Phase Extraction“ (SPE) _____	42
2.2.20	UPLC/Q-TOF Analyse _____	43
2.2.21	FT-ICR-MS _____	44
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE _____</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>EASY-HIT – Etablierung und Validierung eines Zell-basierten Reportersystems zur Identifizierung von Inhibitoren multipler Zielstrukturen im HIV-1 Replikationszyklus _____</b>	<b>46</b>
3.1.1	Charakterisierung der HIV-Indikator Zelllinie LC5-RIC _____	46
3.1.1.1	Untersuchung der Expression von HIV-Rezeptor und Korezeptoren auf der Zelloberfläche _____	46

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.1.2	Expression des DsRed1 Reporterproteins in HIV-infizierten LC5-RIC Zellen _____	47
3.1.1.3	Qualitative und quantitative Charakterisierung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Infektionsstärke _____	48
3.1.2	Entwicklung eines Assay-Aufbaus und -Ablaufs zur standardisierten Testung auf anti-HIV Aktivität. _____	53
3.1.2.1	Optimierung der Rahmenbedingungen _____	53
3.1.2.2	Validierung nach statistischen Parametern zur Assay-Entwicklung _____	55
3.1.2.3	Validierung des EASY-HIT Systems für das Screening von größeren Substanzbibliotheken _____	59
3.1.3	Das „Time-Of-Addition Assay“ zur Einordnung der Wirkungsweise neuer anti-HIV aktiver Substanzen in den HIV-Replikationszyklus _____	61
3.1.4	Identifikation neuer Substanzen mit anti-HIV Aktivität mithilfe des EASY-HIT Systems____	62
<b>3.2</b>	<b>Inhaltsstoffe eines Extraktes getrockneter Wurzeln von <i>Pelargonium sidoides</i> hemmen die Infektion mit HIV-1 <i>in vitro</i>_____</b>	<b>69</b>
3.2.1	Der anti-HIV Effekt verschiedener, wässriger Extrakte der Wurzeln von <i>Pelargonium sidoides</i> _____	69
3.2.2	Die anti-HIV Aktivität von PS verhindert die Anlagerung des Virus an die Zielzellen _____	73
3.2.2.1	Prä-Inkubationsexperimente um den Einfluss von PS auf die Zielzellen bzw. auf die Viruspartikel selbst zu untersuchen _____	74
3.2.2.2	Abhängigkeit der anti-HIV Aktivität von PS von den HIV-Rezeptoren auf den Zielzellen _____	75
3.2.2.3	Der inhibitorische Effekt von PS auf die HIV-Infektion primärer humaner Zellen _____	77
3.2.2.4	Eine eventuelle immunstimulierende Wirkung von PS aktiviert nicht die HIV-Transkription in latent infizierten T-Zellen _____	78
3.2.3	Bioassay-angeleitete Fraktionierung des wässrigen Extraktes von PS zur näheren Charakterisierung der aktiven Inhaltsstoffe _____	79
3.2.3.1	Untersuchung der generellen Separierbarkeit der Inhaltsstoffe von PS _____	79
3.2.3.2	Fraktionierung von PS mit dem Advion NanoMate via UPLC-MS _____	81
3.2.3.3	Massenspektroskopische Analyse aller Fraktionen und erste Auswertungen _____	83
<b>4</b>	<b>DISKUSSION _____</b>	<b>91</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung der LC5-RIC HIV Indikatorzelllinie _____</b>	<b>91</b>
4.1.1	Zelluläre Voll-Replikationssysteme bieten Vorteile bei der initialen Identifizierung von Inhibitoren _____	91
4.1.2	Charakterisierung der LC5-RIC Zelllinie _____	92
4.1.3	Vorteil der Abhängigkeit der Reporterexpression von HIV Tat und Rev _____	93
4.1.4	Vorteil von <i>DsRed1</i> als Reporterprotein _____	93
4.1.5	Vorteile der von HeLa-Zellen abgeleiteten LC5-RIC gegenüber anderen HIV-Indikatorzellen _____	94
4.1.6	Validierung des EASY-HIT Systems _____	95

4.1.7	Der Time-Of-Addition Assay (TOA) als schnelles System zur Eingrenzung von möglichen Zielstrukturen eines potentiellen Inhibitors _____	95
4.1.8	Die Identifizierung weiterer Naturstoffe mit anti-HIV Wirkung _____	97
4.1.9	Ausblick auf weitere Anwendungsmöglichkeiten und Erweiterungen des EASY-HIT Systems	98
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der anti-HIV Aktivität eines wässrigen Extraktes der Wurzeln von <i>Pelargonium sidoides</i></b> _____	<b>99</b>
4.2.1	Eine kurze Einführung zur Herkunft von <i>P. sidoides</i> als Arzneimittel _____	99
4.2.2	Anti-HIV Wirkung von Extrakten frischer und getrockneter Wurzeln von <i>Pelargonium sidoides</i> und Umckaloabo® _____	100
4.2.3	Die inhibitorische Wirkung von PS auf den viralen Eintritt im EASY-HIT System und in primären Zellen _____	101
4.2.4	Fraktionierung des Rohextraktes _____	102
4.2.5	Massenspektrometrische Analyse der Inhaltsstoffe _____	103
4.2.6	Flavonoide und Cumarine sind die vorrangig identifizierten Substanzen in den aktiven Fraktionen _____	104
4.2.7	Ein Extrakt der Wurzeln von <i>Pelargonium sidoides</i> als natürliches Multiwirkstoffpräparat gegen HIV? _____	105
4.2.7.1	Herausforderungen, die bei einer Entwicklung zu einer einsatzfähigen Arznei überwunden werden müssten _____	106
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> _____	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK</b> _____	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> _____	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> _____	<b>116</b>
<b>9</b>	<b>ERKLÄRUNG</b> _____	<b>126</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 HIV

### 1.1.1 Die Globale Situation

Trotz der heutigen Vielfalt an Therapiemöglichkeiten und der teilweise omnipräsenten AIDS-Aufklärung in den Medien und auch vor Ort in den schwer betroffenen Gebieten in Afrika, waren 2009 nach Angaben der UNAIDS weltweit 33,3 Millionen Menschen mit HIV infiziert (Abbildung 1). 1999 betrug diese Zahl 26,2 Millionen, was eine 27% Steigerung in 10 Jahren bedeutet. Die Zahl der jährlichen Neuinfektionen nahm über die letzten Jahre hinweg tendenziell trotzdem ab. Dies ist einerseits durch die Einführung und stetige Verbesserung der Antiretroviralen Therapie (HAART) aber auch nicht zuletzt durch eine stärkere Aufklärung der Betroffenen erreicht worden. Die Verteilung der Infektionsrate zwischen den Geschlechtern liegt bei 52% Frauen. 7,5% (2,5 Millionen) der Infizierten sind Kinder.

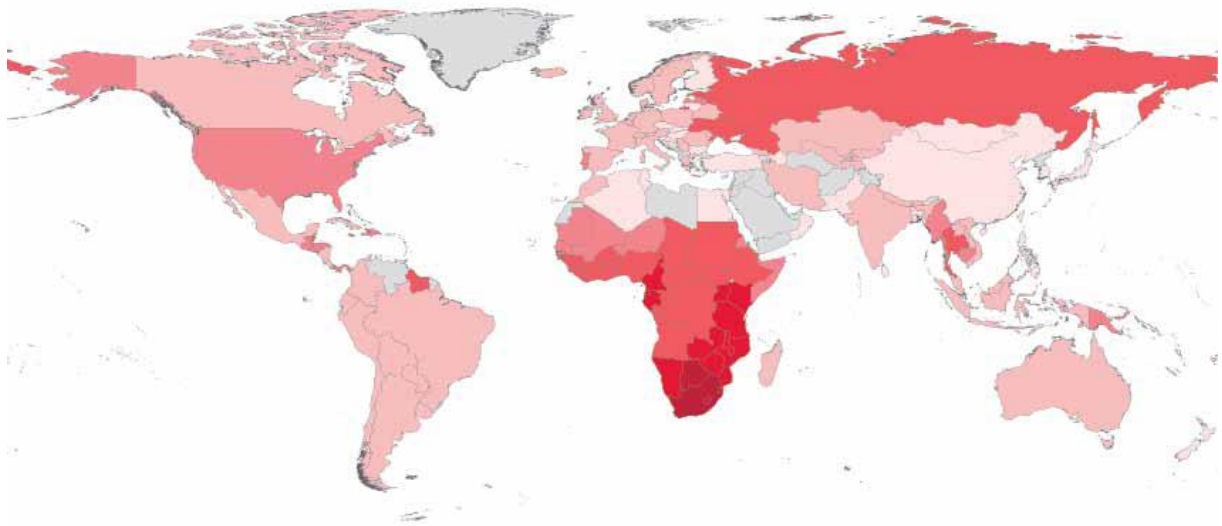


Abbildung 1: Die globale Prävalenz von HIV in 2009. ■ keine Daten, ■ <0,1%, ■ 0,1% – 0,49%, ■ 0,5% – 0,99%, ■ 1% – 4,9%, ■ 5% – 14,9%, ■ 15% – 28% der Bevölkerung sind HIV positiv. Quelle: [www.unaids.org](http://www.unaids.org)

Wie auf der Karte (Abbildung 1) gut zu sehen, ist Afrika nach wie vor der am stärksten von der HIV-Epidemie heimgesuchte Kontinent. In Abbildung 2 wird die Situation für Deutschland erläutert. Nachdem die Anzahl der Neuinfektionen etwa 1985 mit über 6000 ihr Maximum erreichte, nah sie wieder ab und befindet sich seit 2007 bei etwa 3000 neu Infizierten pro Jahr. Dies wurde laut Robert Koch Institut (RKI) durch eine bessere Aufklärung, als auch eine verstärkte Qualitätssicherung für Blutspenden und Drogenintervention erreicht. Der Ausbruch von AIDS und die Mortalität erreichten ihr Maximum etwa 1994. Durch die verbesserten Behandlungsmethoden geht dieser Wert seit 1995 aber wieder stark zurück.

Insgesamt rechnet das RKI mit etwa 70000 (60000 – 83000) Menschen, die Ende 2010 mit HIV/AIDS in Deutschland leben.

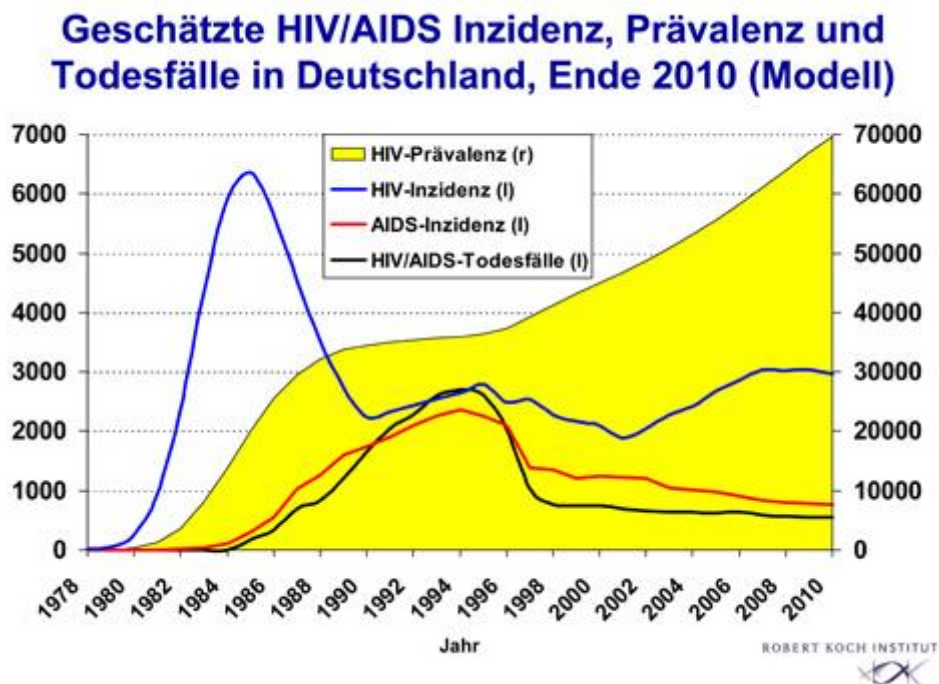


Abbildung 2: Grafik zu HIV Neuinfektionen, Infizierten und Todesfällen in Deutschland. R= rechte Y-Achse; L= linke Y-Achse. Dargestellt sind für die Jahre 1978 – 2010 die HIV-Prävalenz (Anzahl infizierter Individuen; R) in gelb, die HIV-Inzidenz (Anzahl der diagnostizierten HIV Neuinfektionen; L) in blau, Die AIDS-Inzidenz (Anzahl der diagnostizierten AIDS-Erkrankungen; L) in rot und die Anzahl der HIV/AIDS-assoziierten Todesfälle in schwarz (L). Quelle: [www.rki.de](http://www.rki.de), Stand: Februar 2011

Weltweit sind die Raten der neu hinzukommenden Infektionen bis auf Ausnahmen in Asien, Vorderasien und Ost-Europa (Bridge et al. 2010; Cohen 2010; Jasny et al. 2010) meist stabil oder verringern sich sogar (Abbildung 3). Dies ist einerseits der besser werdenden Versorgung mit Medikamenten und andererseits einer besseren, zielgerichteten Aufklärung und Weiterbildung der betroffenen Bevölkerungen gutzuschreiben. Die teils rasante Zunahme der HIV-Infektionen (>25% Inzidenzsteigerung pro Jahr) in einigen Ländern der ehemaligen Sowjetunion (Georgien, Kasachstan) und Asiens (Bangladesch, Philippinen) wird im Globalen Report über die AIDS Epidemie der UNAIDS ([www.unaids.org/globalreport/Global\\_report.htm](http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm)) hauptsächlich auf die gemeinsame Nutzung von Spritzbesteck unter Drogensüchtigen in diesen Ländern zurückgeführt. Für Ende 2009 gaben die Weltgesundheitsorganisation (WHO), UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) und UNDP (United Nations Development Programme) unlängst in einer Presseerklärung an, dass von den 33 Millionen infizierten etwa 15 Millionen Menschen den Bedarf nach einer antiretroviralen Therapie zeigten. Dieser Bedarf entsteht unter anderem, wenn die Zahl der CD4-positiven T-Zellen unter 350 - 500 Zellen pro  $\text{mm}^3$  Blut fällt



(DHHS 2011). Allerdings besitzen nur 5,2 Millionen Menschen Zugang zu Antiretroviraler Therapie (Pressemitteilung der WHO, Genf 15.03. 2011; [www.who.int/hiv](http://www.who.int/hiv)).

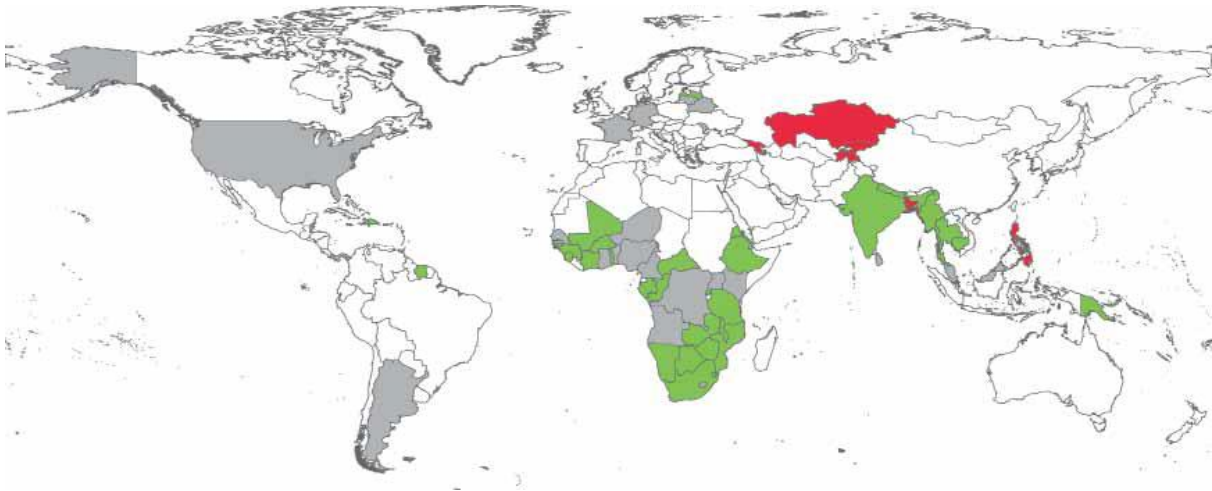


Abbildung 3: Änderung der HIV Neuinfektionsrate 2001 – 2009. ■ Zunehmend >25%, ■ Stabil, ■ Abnehmend >25%, □ Nicht in der Analyse beinhaltet. Quelle: [www.unaids.org](http://www.unaids.org)

### 1.1.2 Epidemiologie und Sozioökonomische Auswirkungen von HIV/AIDS

Verschiedene Wirkstoffe und Medikamente wurden für die Therapie der HIV-Infektion die als HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy; Hochaktive antiretrovirale Therapie) bezeichnet wird, entwickelt. Jedoch bringt die Behandlung von HIV-positiven Menschen viele Probleme mit sich. Neben teils drastischen und vielfältigen Nebenwirkungen wie Allergien, Laktatazidosen, Neuropathien und Beeinträchtigungen des zentralen Nervensystems, spielen vor allem Resistenzbildungen eine große Rolle (McNamara and Naples 2006; Adamson and Freed 2008). Diese treten durch die hohe Mutationsrate und Varianz von HIV selbst innerhalb eines Individuums häufig auf und indizieren eine rasche Umstellung der jeweiligen betroffenen Medikamente (Wood et al. 2009). Auch die Problematik der opportunistischen Infektionen soll hier aufgezeigt werden. Infektionen mit HBV/HCV (Hepatitis B und C) oder *Mycobacterium tuberculosis*, und über 20 andere Infektionskrankheiten und Krebserkrankungen werden durch die Immunschwäche der Betroffenen begünstigt und erfordern nach Auftreten zusätzliche Behandlung (Zolopa et al. 2009; Ramaiah et al. 2010). Die genauen Kosten für die HAART oder generelle Behandlung darzustellen sind immer wieder Gegenstand statistischer Studien. Durch die weitgreifenden Auswirkungen der Erkrankung für das soziale und ökonomische Umfeld der Betroffenen sind sie schwer zu ermitteln. Laut einer Studie des Robert Koch Institutes (Projektnummer CS-689-003) belaufen sich die Kosten pro Jahr und Fall in Deutschland auf etwa 20000 – 30000 Euro. Etwa 16000 Euro stellen hierbei die reinen anti-retroviralen Arzneimittelkosten der HAART. Diese Kosten spiegeln sich in etwa weltweit wieder. Trotz des anscheinend recht hohen Kostenvolumens für eine lebenslange Behandlung gilt HAART im Allgemeinen als

kosteneffektiv weil zum Beispiel häufige Hospitalisierungszeit minimiert, wie auch frühzeitige Arbeitsunfähigkeit der Betroffenen verhindert werden kann und somit die sozialökonomischen Auswirkungen beschränkt werden (Stoll 2007).

### 1.1.3 Die Biologie von HIV

Die Biologie und Replikation des HI-Virus ist sehr komplex (Cullen 1991). HIV ist seit etwa 30 Jahren Gegenstand wissenschaftlicher Forschung und soll wegen der immensen Menge an angehäuften Erkenntnissen hier nur im Übriss beschrieben werden. Dem interessierten Leser lege ich zur näheren Information folgende Artikel nahe: (Greene 1991; Freed 2001; Armitage et al. 2008; Carter and Ehrlich 2008; Ganser-Pornillos et al. 2008; Watts et al. 2009)

HIV ist ein Retrovirus aus der Gattung der Lentiviren. Es besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom in positiv-Orientierung ((+)ssRNA). Der genaue Aufbau eines Virions ist in Abbildung 4 dargestellt. Als behülltes Virus besitzt das Virion eine Lipidmembran, die von der Wirtszelle abstammt. Die Membran enthält virale Glykoproteinkomplexe die aus Untereinheiten des transmembranen Proteins gp41 und daran assoziiertem Oberflächenprotein gp120 bestehen und das Andocken an- und die Fusion mit der Zielzelle vermitteln. Das virale Lumen wird durch eine Schicht Matrixproteine p17 von der Membran getrennt. Das Nukleocapsidprotein p7-assoziierte RNA-Genom und die viralen Enzyme reverse Transkriptase (RT), Integrase und Protease sind innerhalb des Capsids lokalisiert welches aus dem Capsidprotein p24 besteht. Weitere akzessorische Proteine, die unter anderem regulatorische Funktionen besitzen sind Vpu (Collins 2009), Vif (Malim and Emerman 2008), Vpr (Li et al. 2009), und Nef (Foster et al. 2011). Diese haben unter anderem Einfluss auf zelluläre Faktoren, die eine wichtige Rolle bei der Infektion spielen. Vpu beispielsweise fördert die Degradierung des Oberflächenrezeptors CD4 und könnte so zum Beispiel die Re-Infektion der bereits infizierten Zelle die das neue Virion gebildet hat (Superinfektion) erschweren. Dadurch könnten sich neu gebildete Viren besser im Wirt ausbreiten und neue, bis dahin noch nicht infizierte Zellen infizieren (Collins 2009; Miyauchi et al. 2009; Andrew and Strebel 2010).

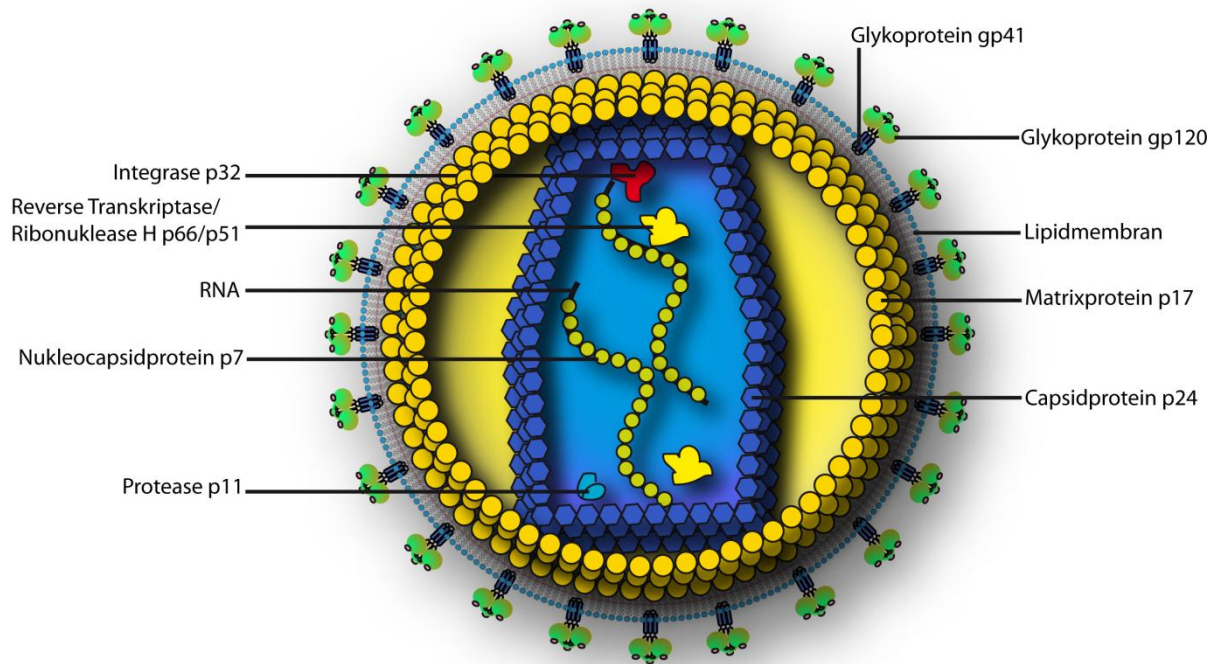


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines HIV Partikels. In der Lipiddoppelmembran sind die multimeren Glykoproteinkomplexe gp41 verankert und daran gebunden die gp120 Multimere. Im Anschluss an die Membran wird die virale Matrix durch eine Schicht Matrixprotein p17 abgetrennt. In der Matrix befindet sich das Capsid. Es wird durch eine Schicht Capsidprotein p24 gebildet und enthält die p7-assoziierte RNA sowie die viralen Enzyme Integrase, Protease und Reverse Transkriptase/Ribonuklease H (RNase H).

Eine schematische Darstellung des HIV Provirus ist in Abbildung 5 dargestellt. Die in das Wirtsgenom integrierte virale DNA (Provirus) misst 9,75 Kilobasenpaare und kodiert für 15 virale Proteine. Die Leseraster werden beidseitig durch „long terminal repeats“ (LTR) flankiert. Die 5'LTR ist für die Initiation und die 3'LTR für die Termination der Transkription verantwortlich (Frankel and Young 1998).

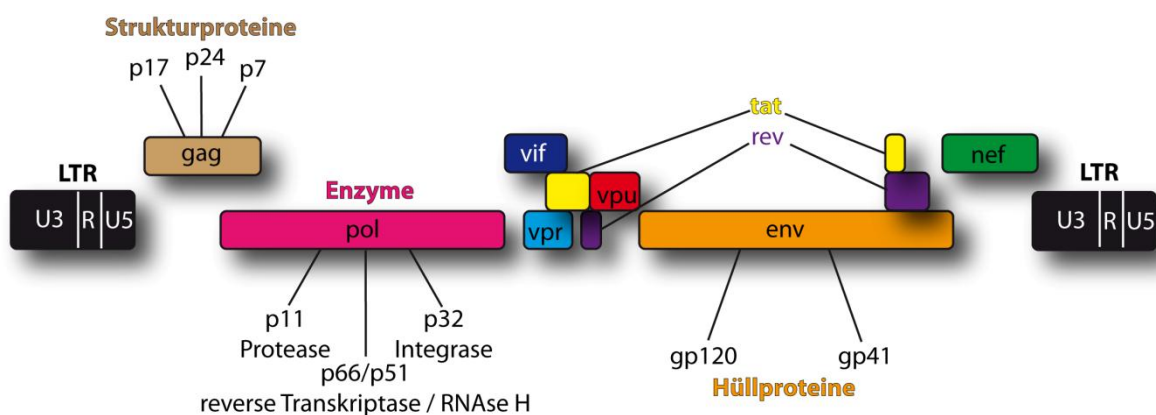


Abbildung 5 Schematische Darstellung des HIV Provirus. Die Bereiche gag, pol und env sind typische Bestandteile von retroviralen Provirus-Genomen und kodieren für die Struktur- und Hüllproteine sowie die Enzyme des Virus. Als komplexes Retrovirus enthält das HIV Provirus außerdem kodierende Bereiche für akzessorische (vif, vpr, vpu, nef) und regulatorische (tat, rev) Proteine.

### **1.1.3.1 Die Übertragung und Replikation von HIV in humanen Zellen**

HIV wird bis auf Speichel und Schweiß durch Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Blut und Sperma übertragen. Besonders gefährdet sind hierbei Empfänger von Konserven mit verunreinigtem Blut, Drogensüchtige die sich HIV-kontaminierte Injektionsnadeln teilen und Menschen die bei sexuellen Kontakten mit HIV-positiven Menschen zum Beispiel ungeschützten Anal- aber auch vaginalen oder oralen Verkehr praktizieren (Friedland and Klein 1987; Johnson 1988; Musto et al. 2008; Bertoni et al. 2011). Auch eine Übertragung von Mutter zu Kind während der Schwangerschaft oder auch beim Stillen des Säuglings durch beispielsweise Verletzungen an der Brustwarze ist möglich (Embree et al. 2000; Essex and Lu 2008). Infiziert werden primär Zellen des Immunsystems, die die dafür nötigen Oberflächenrezeptoren CD4 und CXCR4 oder CCR5 bereitstellen. Hauptsächlich erfüllen diese Voraussetzungen T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen. Ein Übersichtsschema des Replikationszyklus ist in Abbildung 8 dargestellt. Die wichtigsten Schritte des viralen Replikationszyklus werden im Nachfolgenden grob geschildert und sollen dem Betrachter unter anderem aufzeigen, dass mit den aktuell gebräuchlichen Medikamenten noch weitaus nicht alle möglichen Zielstrukturen ausgeschöpft wurden.

### **1.1.3.2 Der Eintritt des Virus in die Zielzelle:**

Die HIV-Anlagerung an die Zelle erfolgt über die Bindung der C3-Domäne des gp120 an CD4. Nach einer Konformationsänderung erfolgt die Bindung der hochvariablen V3-Domäne an den entsprechenden Korezeptor CXCR4 oder CCR5. Nun erfolgt eine weitere Konformationsänderung und die Umlagerung des gp41 induziert die Fusion der viralen und zellulären Membran (Freed 2001). Alternative Hypothesen gehen davon aus, dass HIV auch über den Weg der Endozytose in die Zelle aufgenommen werden kann (Miyachi 2009; Uchil and Mothes 2009; Mercer et al. 2010). Die eigentliche Fusion der viralen Membran mit der Membran des Endosoms und Freisetzung des Capsides oder Capsidinhaltes erfolgt nach diesem Modell erst intrazellulär.

### **1.1.3.3 Die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms in DNA**

Die reverse Transkription dient der Umschreibung des viralen RNA-Genoms in ein DNA-Genom, das dann stabil in das Wirtsgenom integriert werden kann. Die RT ist dabei eine RNA- bzw. DNA-abhängige DNA Polymerase, als auch eine Ribonuklease (RNase H). Als Polymerase bildet die RT bei der reversen Transkription ein DNA/RNA Hybridmolekül, welches danach durch die Nukleasefunktion der RT von der Matrizen-RNA befreit wird. Die nun einzelsträngige DNA wird daraufhin wiederum durch die Polymeraseaktivität der RT zu einer doppelsträngigen DNA ergänzt.

Im Detail läuft dieser Prozess folgendermaßen ab: Nach der Fusion zerfällt das ursprüngliche p24-Capsid wobei verschiedene Vorstellungen über den Zeitpunkt des Zerfalls

existieren. In dem älteren Modell geht man davon aus, dass das Capsid sofort nach der Fusion des Virus mit der Zelle zerfällt, und das virale RNA-Genom sowie die enthaltenen Enzyme in das Zytosol freigesetzt werden. Teile des Capsides bleiben allerdings mit der RNA, der RT und der Integrase assoziiert und bilden den Reversen-Transkriptions-Komplex (RTC) (Freed 2001). Ein anderes Modell besagt, dass das Capsid während des gesamten Transportes zum Zellkern erhalten bleibt und die reverse Transkription erst nach Bindung des Capsids an den Kernporenkomplex auf zytoplasmatischer Seite innerhalb des Capsids stattfindet. Der Zerfall des Capsids findet nach diesem Modell erst nach der reversen Transkription statt (Arhel 2010). Die reverse Transkriptase besitzt eine hohe Fehlerrate aber keine Korrekturfunktion (Roberts et al. 1988). Dies ist mitunter ein Grund für die hohe Mutationsrate von HIV und Retroviren im Allgemeinen (Preston and Dougherty 1996). Regulative Rollen bei der reversen Transkription spielen sowohl zelluläre tRNAs (Primerfunktion), das RNA-assoziierte Nukleocapsidprotein p7, die Integrase und Capsidproteine p24 die zusammen mit RT und RNA den RTC bilden. Der Ablauf der reversen Transkription ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

In beiden genannten Modellen für den Capsid-Zerfall schreibt die virale RT das virale RNA-Genom über einen kompliziert regulierten Mechanismus zuerst in ein kurzes (-)cDNA-Fragment um. Zelluläre tRNAs fungieren bei diesem Schritt als Primer. Sie binden an die Primer Bindungsstelle (PBS) am 5'-Ende der viralen RNA. Dieses erste, kurze (-)cDNA-Fragment bindet nun an das 3'-Ende der viralen RNA-Matrize mit Hilfe der komplementären Sequenzen des R-Bereichs. Die RT verlängert und komplettiert nun das kurze (-)cDNA-Fragment zur vollen Länge. Die RNase H-Aktivität der RT degradiert zeitgleich die virale RNA-Matrize. Zwei kurze Polypurintrakte (PPT) werden hierbei nicht degradiert (Charneau et al. 1992; Coffin et al. 1997; Li et al. 2007). Diese zwei PPTs, nämlich der zentrale PPT (cPPT) und der 3'-Ende PPT (3'PPT) fungieren nun als Primer für die (+)cDNA Synthese. Initiiert durch das 3'PPT wird so aus der entstandenen (-)cDNA ein kurzes Stück komplementäre (+)cDNA und ein kürzeres Segment (+)cDNA ausgehend von der cPPT Bindungsstelle gebildet. Um nun das vor dem cPPT liegende Stück (-)cDNA mit (+)cDNA zu komplementieren, findet ein reversibler Ringschluss statt. So kann die RT das 3'PPT-initiierte Stück bis zur zentralen Terminationssequenz (CTS) verlängern. Da die CTS am 3'-Ende des cPPT liegt, überlappen sich die beiden (+)cDNA Segmente um etwa 100 Nukleotide. Den entstandenen Überhang nennt man DNA Flap (Arhel 2010). Dieser DNA Flap ist essentiell für die Degradierung des RTC und den Import des Prä-Integrationskomplexes in den Zellkern (Zennou et al. 2000).

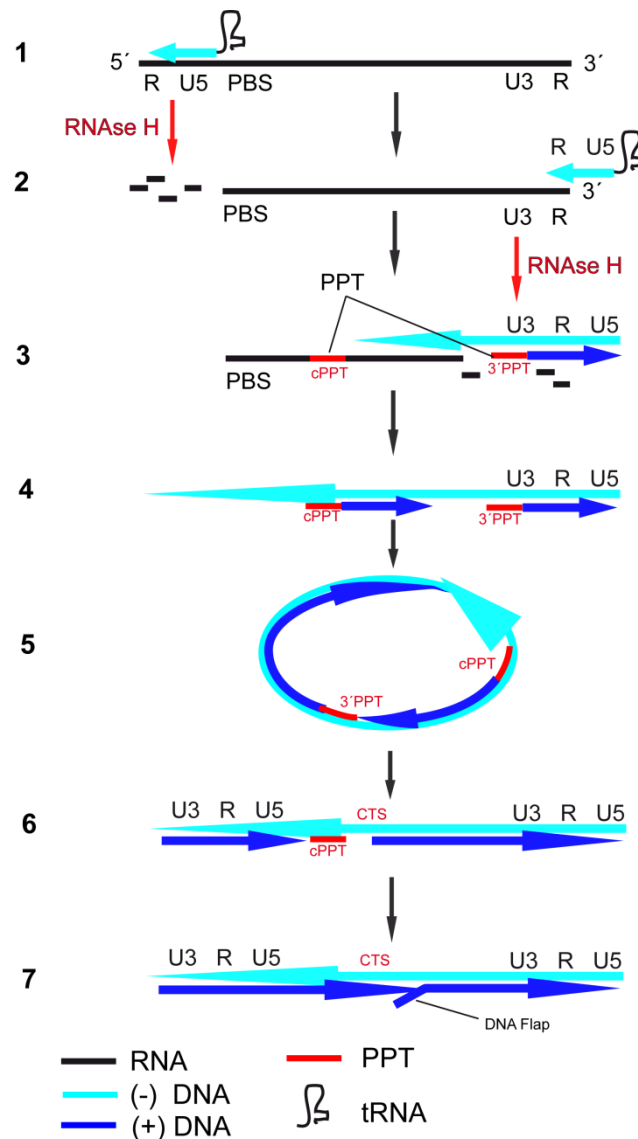


Abbildung 6: Der Ablauf der reversen Transkription. 1: Zelluläre tRNAs fungieren als Primer und binden an die PBS der viralen RNA (schwarze Linie). Ein kurzes Stück (-)cDNA wird gebildet (hellblau). 2: Das (-)cDNA-Stück wird an das 3'-Ende der RNA transferiert und verlängert. 3 und 4: Die RNA wird durch die RNase H Aktivität der RT abgebaut. 2 Polypurintrakte (cPPT und 3'PPT) werden nicht verdaut (rote Linien). Die PPTs fungieren als Primer zur Synthese der (+)DNA (dunkelblaue Linie). 5: Damit das vor dem cPPT liegende Segment der (-)cDNA komplementiert werden kann, findet ein Ringschluss statt. 6: Nun wird die Verlängerung der (+)cDNA bis zu einer zentralen Terminationssequenz (CTS) fortgesetzt. 7: Da die CTS am 3'-Ende des cPPT liegt, überlappen die durch cPPT und 3'PPT initiierten (+)cDNA Segmente um etwa 100 Nukleotide. Dies führt zum Entstehen des sogenannten DNA-Flaps.

### 1.1.3.4 Die Integration in das Wirtsgenom

Ist die virale RNA nun in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben, nennt man den Komplex aus DNA, Integrase und den anderen beteiligten Faktoren Prä-Integrationskomplex (PIC). Der PIC wird in den Kern transportiert, und dort integriert die virale Integrase das HIV-Genom stabil in das Wirtsgenom. Dies geschieht in 3 Hauptschritten, die hier nur kurz skizziert werden: Zuerst entfernt die Integrase je ein Dinukleotid von den 3'-Enden der

jeweiligen Stränge der viralen DNA. Dann erfolgt der Strangtransfer. Dazu wird die Ziel-DNA geschnitten, sodass beidseitig ein Überhang aus fünf Nukleotiden entsteht. Die zwei Überhang-Nukleotide (CA) der viralen DNA werden nun an diese Überhänge der Ziel-DNA angelagert. Der letzte Schritt besteht in der Reparatur des übrigen Spaltes von je drei Nukleotiden in der Ziel-DNA (Delelis et al. 2008). Ein wichtiger zellulärer Faktor in der Regulation dieser Prozesse ist LEGDF/p75 (Llano et al. 2006) welches unter anderem die Chromatin-Assoziation der Intergrase vermittelt und deren proteasomalen Abbau verhindert. Auch virales Rev spielt eine regulatorische Rolle bei der Integrase/LEGDF-Interaktion (Levin et al. 2010).

### **1.1.3.5 Die Expression der HIV Proteine und Enzyme**

#### 1.1.3.5.1 Die Bildung viraler RNAs und Expression früher viraler Proteine

Die Prozesse der Initiation und Regulation der HIV-Transkription sind sehr komplex und multifaktoriell. Viele zelluläre Faktoren und deren Interaktion mit der HIV LTR (Pereira et al. 2000) und mit viralen Faktoren wie Tat spielen eine Rolle (Romani et al. 2010). Die Initiation der Transkription der viralen Gene geschieht durch die Bindung der entsprechenden Faktoren (z.B. NfκB) an die U3-Region der 5'LTR. Durch diese basale Aktivität der LTR wird eine primäre mRNA gebildet die mehrfach gespleißt wird, was zur Produktion der regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef führt. Tat und Rev werden nach ihrer Translation in den Kern transportiert.

#### 1.1.3.5.2 Die Bildung viraler RNAs und Expression später viraler Proteine

Es sei vorweg angemerkt, dass Tat neben der hier beschriebenen Funktion noch multiple andere Funktionen für die virale Replikation als auch das Schicksal der Zelle besitzt (Romani 2010), die alle hier zu erklären den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Ebenso sei erwähnt, dass auch das Rev Protein einen multifunktionellen Faktor darstellt (Suhasini and Reddy 2009).

Nach der Translokation in den Kern bindet Tat an die TAR-Sequenz der gebildeten viralen mRNA und rekrutiert dort den „Positiven Transkription Elongationsfaktor b“ (P-TEFb). Diese Cyklin-abhängige Kinase aus CDK9 und einem Cyklin T1 phosphoryliert nun die RNA-Polymerase II und amplifiziert somit die Transkription um ein Vielfaches in un- oder einfach gespleißten viralen mRNAs (Abbildung 7). Rev bindet nun an das „Rev-Response-Element“ (RRE) und fördert, indem es den Exportrezeptor CRM1/Exportin1 an die mRNA rekrutiert ihren Export aus dem Zellkern (Hirsch et al. 2008). Jetzt findet auch die Produktion der übrigen viralen Proteine und Enzyme statt (). Dabei entsteht ein Gag-Vorläuferprotein (Matrixprotein-Capsidprotein-Nukleocapsidprotein). Durch einen Leserasterschub um ein Nukleotid in der Region, die für das Nukleocapsidprotein kodiert, wird das Stopcodon des

Gag-Vorläuferproteins überlesen und es entsteht das Gag-Pol-Polypeptid (Gag-Protease-RT-Integrase) (Freed 2001; Watts 2009; AIDSmeds 2011). Nach einem Dimerisierungsschritt schneidet sich die Protease autokatalytisch aus dem Gag-Pol-Polypeptid aus und es entsteht das Gag-Polypeptid sowie die ebenfalls von der Protease prozessierten Enzyme RT und Integrase. Das Env-Vorläuferprotein gp160 wird zuerst im endoplasmatischen Retikulum glykosyliert, worauf es im Golgi-Netzwerk durch Furin-Proteasen zu gp120 und gp41 weiterprozessiert wird (Adamson and Freed 2007).

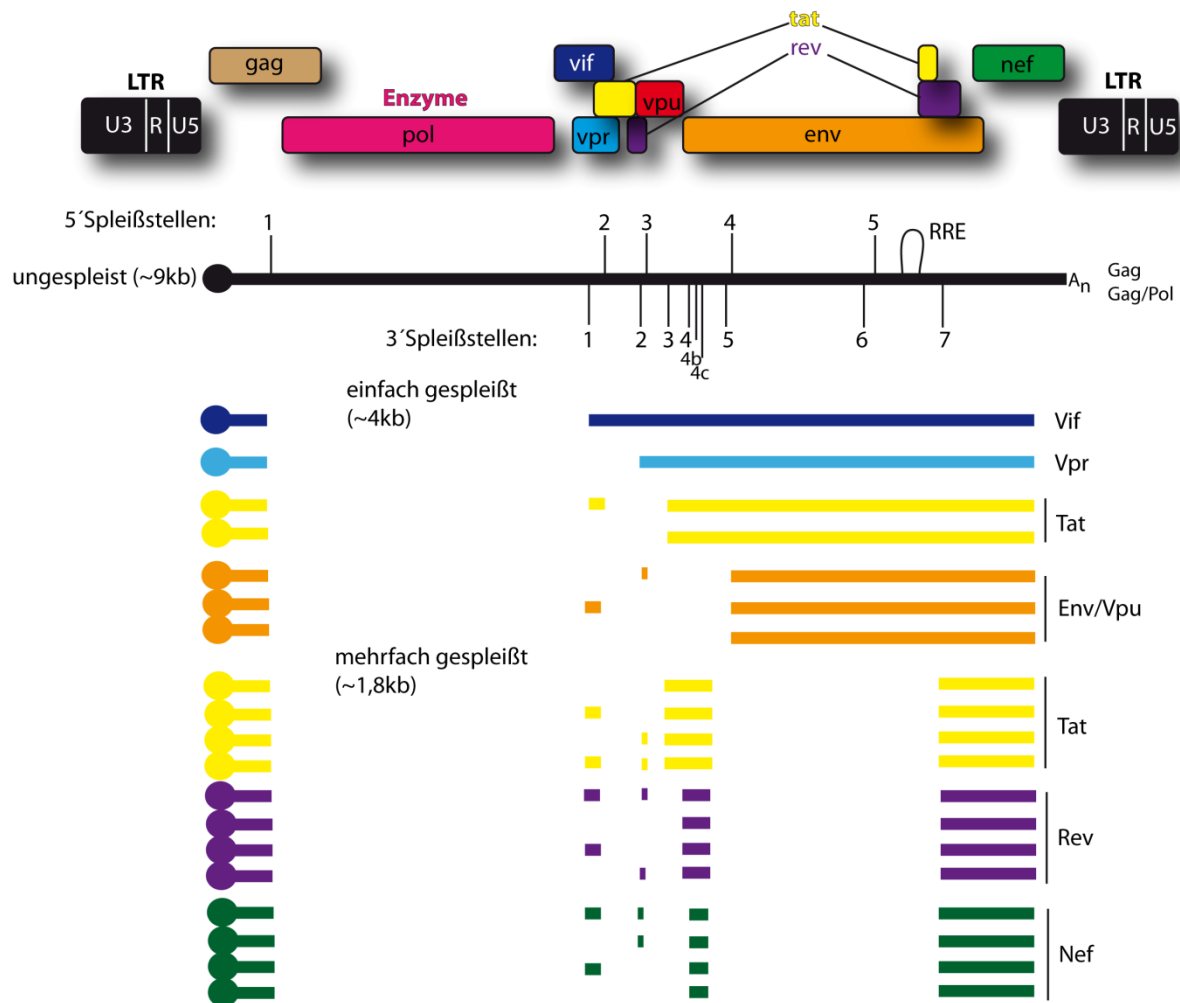


Abbildung 7 Prozessierung der HIV-1 RNA. Oben: Provirus. Über der ungespleißten mRNA sind die 5'-Spleißstellen 1-5 angegeben, darunter die 3'-Spleißstellen 1-7. Die jeweiligen einfach oder mehrfach gespleißten Produkte sind darunter entsprechend des Farbcodes der Genomsegmente im Provirus dargestellt. (Abbildung angefertigt nach Cochrane et al. 2006)

### 1.1.3.6 Der Zusammenbau und die Reifung neuer Viren

Nach der Bildung der viralen Strukturproteine, Enzyme und des RNA-Genoms wird das neue Virus an der Zellmembran zusammgebaut. Das Gag-Polypeptid lagert sich an der Membran an, in der bereits die Golgi-prozessierten gp120/gp41 Glykoproteine sitzen. Nach der Knospung der neuen Partikel von der Zelle, wird das Gag-Polypeptid durch die Protease katalytisch gespalten. Die Protease zerschneidet hierbei das Gag-Polypeptid in das



Capsidprotein p24, das Matrixprotein p17, das Nukleocapsidprotein p7 und Protein p6. Durch diesen Schritt kann sich das p24-Capsid ausformen und der neue Partikel wird infektiös. (Ganser-Pornillos 2008; Briggs et al. 2009)

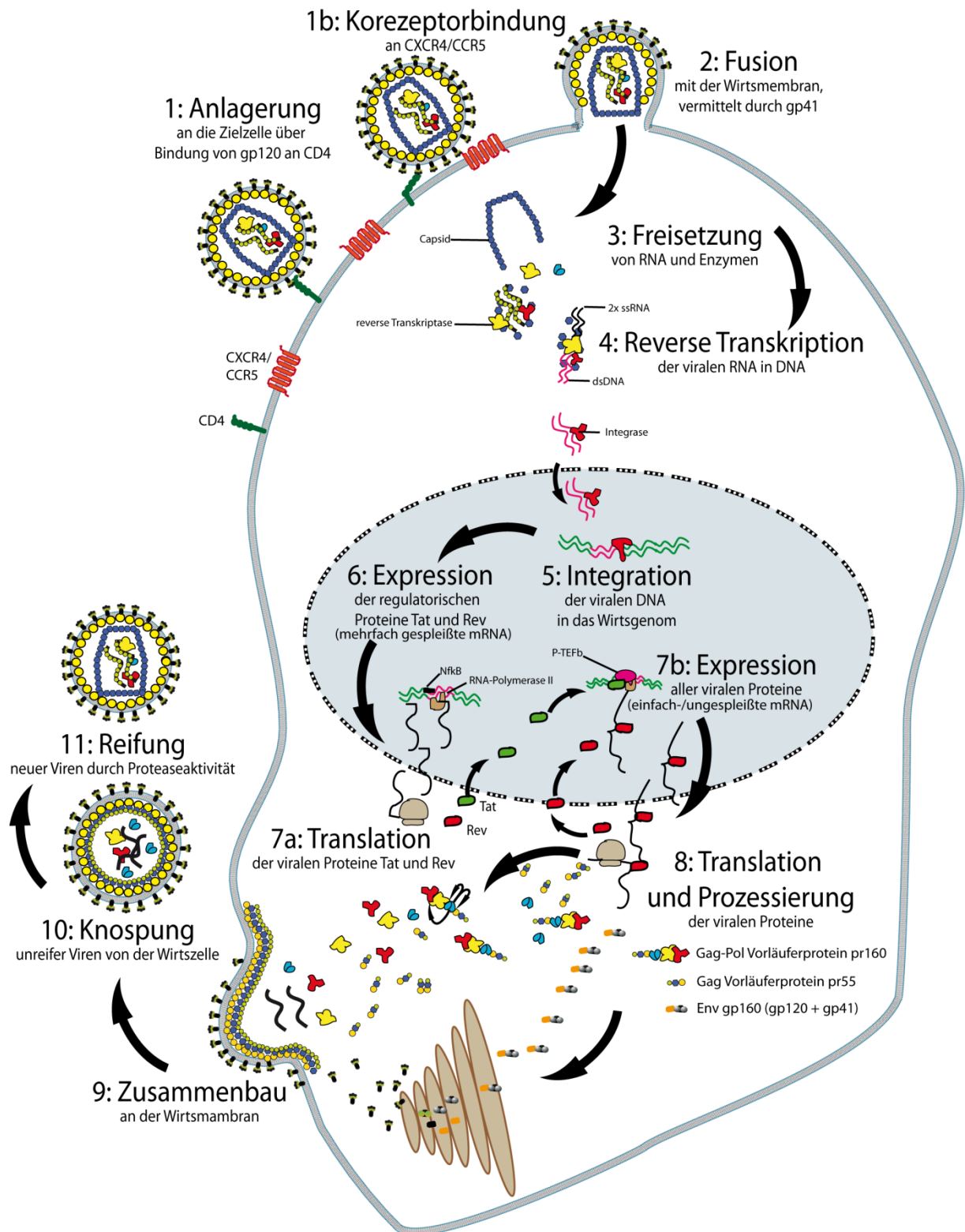


Abbildung 8: Der HIV Replikationszyklus. Nachdem HIV über gp120 an den zellulären Rezeptor CD4 und danach an den Korezeptor CXCR4 oder CCR5 bindet (1), fusioniert HIV mit der Zellmembran (2) und das Capsid gelangt in das Zytosol, wo es die viralen Enzyme und RNA freigibt (3). Die Reverse Transkriptase schreibt nun das RNA-

Genom in DNA um (4), welche danach in den Zellkern transportiert und mittels viraler Integrase ins Wirtsgenom integriert wird (5). Die anfänglich basale Transkription wird durch NfκB angeregt und erzeugt mehrfach gespleißte mRNAs (6). Deren Produkte Tat und Rev werden nach Translation in den Kern relokalisiert (7a). Durch Rekrutierung von P-TEFb durch Tat und die Phosphorylierung der RNA-Polymerase II wird die Transkription amplifiziert und es entstehen einfach gespleißte oder ungespleißte mRNAs, die durch die Aktivität von Rev exportiert werden (7b). Nach der Translation und Prozessierung der viralen Proteine (8) werden die neuen Viruspartikel an der Zellmembran zusammengebaut (9) und nach der Knospung von der Wirtszelle (10) reifen die Partikel durch die Aktivität der HIV-Protease zu neuen infektiösen Viren (11).

#### 1.1.4 Geschichte von HIV

Man geht davon aus, dass HIV von dem Affen-Lentivirus SIV<sub>CPZ</sub> (Simian Immunodeficiency Virus Chimpanzee) abstammt und wahrscheinlich Anfang des 20. Jahrhunderts auf den Menschen übertragen wurde (Sharp and Hahn 2010). Geschehen ist dieser Schimpanse-Mensch Übersprung von dem heute häufigsten HIV-1 Gruppe M Subtyp B (HIV-1<sub>III B</sub>) wahrscheinlich durch die Exposition von infiziertem Blut oder anderen Körperflüssigkeiten während der Schlachtung von Affen zur Herstellung von Buschfleisch im südöstlichen Kamerun (Sharp and Hahn 2010). Andere Stämme von SIV sprangen auch auf den Menschen über und führten zu der Entstehung der HIV-1 Subtypen N, O und P und HIV-2, das auf West-Afrika beschränkt ist und eine weit geringere Virulenz aufweist (Jaffar et al. 2004). Insgesamt scheinen an die 12 solcher Übertragungen (4 für HIV-1 und 8 für HIV-2) verschiedener SIVs auf den Menschen geschehen zu sein, allerdings keine älter als der Subtyp M (Peeters et al. 2010). Die Globalisierung Mitte des letzten Jahrhunderts und die sprunghafte Zunahme der menschlichen Population führten dazu, dass solche Viren sich zu globalen Pandemien ausbreiteten (Sharp and Hahn 2010).

1983 entdeckten und charakterisierten Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi am Institut Pasteur in Paris das humane Immundefizienz Virus, kurz HIV (Barré-Sinoussi et al. 1983). Sie identifizierten dieses Virus als Erreger der erworbenen Immunschwächekrankheit AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), die Anfang der 1980er Jahre in den USA auftrat. Auffällig viele junge, homosexuelle Männer litten damals neben anderen opportunistisch auftretenden Krankheiten wie Kaposi-Sarkomen, unter einer besonderen Form der Lungenentzündung, ausgelöst durch den Pilz *Pneumocystis jirovecii*. Da diese Erkrankung bis dato nur bei Personen mit angeborenen Immunschwächen vorkam, wurde schnell von einer erworbenen Immunschwäche gesprochen, die mit AIDS bezeichnet wurde. 1983 gelang es Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi ein Retrovirus zu isolieren, das sie LAV (Lymphadenopathie-Virus) nannten (Barré-Sinoussi 1983). Fast zeitgleich publizierte Robert Gallo die Entdeckung des HTLV-III (humanes T-Zell-lymphotropes Virus III), das er als das AIDS-erregende Virus deklarierte (Gallo et al. 1983). Nachdem sich 1985 herausstellte, dass die beiden Viren LAV und HTLV-III ein- und dasselbe Virus darstellten wurde es schließlich 1986 einheitlich in HIV - Humanes Immunschwäche Virus (human

immunodeficiency virus) umbenannt (Van der Graaf and Diepersloot 1986). 1986 wurde dann das eigentlich 1964 für die Krebstherapie entwickelte Nukelosidanalogen AZT (Azidothymidin) als erstes HIV-Medikament eingesetzt (De Clercq 2009). Interessanterweise stammt dieser Inhibitor der reversen Transkriptase aus dem marinen Schwamm *Cryptotethya crypta* (Esteves et al. 2011)

In den darauffolgenden Jahren wurde, nach immer kleinlauter werdenden, baldigen Heilsversprechen ein immenser Forschungsaufwand initiiert, um dem neuen Virus Herr zu werden. Allerdings gelang bis heute noch nicht die Entwicklung eines Impfstoffes, der vor einer Infektion mit HIV schützt. Ebenso wenig gibt es Verfahren, die es ermöglichen das Virus aus infizierten Personen zu entfernen. Meilensteine in der Erforschung des damals neuen Virus hin, zum wahrscheinlich am besten erforschten Krankheitserreger der heutigen Zeit werden von Luc Montagnier, einem der Mit-Entdecker von HIV in seiner Rede zum Empfang seines Nobelpreises für Medizin 2008 in folgender Tabelle wie folgt definiert:

**Tabelle 1: Meilensteine in der HIV-Forschung nach Luc Montagnier in seiner Rede zum Empfang des Nobelpreises für Medizin 2008.**

Jahr	Meilenstein
1981	Identifikation der Krankheit in den USA als Pilz-verursachte Lungenentzündung
1983	Erste Isolation von HIV
1984	Bestätigung, dass HIV der Auslöser von AIDS ist; biologische und molekulare Charakterisierung
1985	Erster Bluttest zur Eliminierung der Übertragung von HIV durch Bluttransfusionen
1986	Isolation von HIV-2
1986	Erster Einsatz von AZT als anti-retrovirales Medikament
1991	Identifizierung der Apoptose als Mechanismus des Zelltodes bei AIDS
1995	Abnahme der perinatalen Übertragung von HIV durch die Gabe von AZT an werdende Mütter
1995	Demonstration einer hohen HIV-Replikationsrate während der stillen Phase der Infektion
1996	Identifikation der wichtigsten HIV Korezeptoren
1996-97	Einführung von HAART in der westlich zivilisierten Welt

### 1.1.5 Aktuelle Therapiemöglichkeiten für HIV-Patienten

Die Einführung von HAART (Hoch-aktive anti-retrovirale Therapie) war Ende des letzten Jahrhunderts ein sehr wichtiger Meilenstein in der Behandlung von HIV. Dabei wird dem Patienten eine Kombination aus mindestens 3 verschiedenen antiretroviralen Medikamenten verabreicht, was zu einer äußerst effektiven Unterdrückung der Virusreplikation im Körper führt und sowohl Lebenserwartung als auch Lebensqualität der Betroffenen stark verbesserte (Booyesen et al. 2007; De Clercq 2007; Mehellou and De Clercq 2009). Anfang

2011 sind insgesamt 30 zugelassene Medikamente aus insgesamt 26 Wirkstoffen aufgeteilt in 6 Wirkprinzipien und einem Multiklassen Medikament in der Anwendung (De Clercq 2009; Montagnier 2010; AIDSmeds 2011). Ihre Zusammensetzung und Wirkungsweise ist in nachstehender Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2: Zugelassene und im Gebrauch befindliche HIV-Medikamente sortiert nach Wirkklasse und Wirkstoffen.  
Quelle: www.aidsmeds.com, Stand: Februar 2011.

<b>Medikamente nach Inhibitor-Klasse (Zielstruktur in der HIV Replikation)</b>	
<b>Handelsname</b>	<b>Wirkstoff(e) (Name, Abk.)</b>
<b>Multiklassen Medikamente</b>	
<b>Atripla</b>	Efavirenz + Tenofovir + Emtricitabin
<b>Eintritt Inhibitoren (inkl. Fusion)</b>	
<b>Fuzeon</b>	Enfuvirtid, ENF, T-20
<b>SelzEintritt</b>	Celsentri, Maraviroc, UK-427,857
<b>Nukleosidische RT-Inhibitoren</b>	
<b>Combivir</b>	Zidovudin + Lamivudin, AZT + 3TC
<b>Emtriva</b>	Emtricitabin, FTC
<b>Epivir</b>	Lamivudin, 3TC
<b>Epzicom</b>	Abacavir + Lamivudin, ABC + 3TC
<b>Retrovir</b>	Zidovudin, AZT, ZDV
<b>Trizivir</b>	Abacavir + Zidovudin + Lamivudin, ABC + AZT + 3TC
<b>Truvada</b>	Tenofovir DF + Emtricitabin, TDF + FTC
<b>Videx &amp; Videx EC</b>	Didanosin, ddl
<b>Viread</b>	Tenofovir Disoproxilfumarat, TDF
<b>Zerit</b>	Stavudin, d4T
<b>Ziagen</b>	Abacavir, ABC
<b>Nicht-Nukleosidische RT-Inhibitoren</b>	
<b>Intelece</b>	Etravirin, ETV, TMC-125
<b>Rescriptor</b>	Delavirdin, DLV
<b>Sustiva</b>	Stocrin, Efavirenz, EFV
<b>Viramune</b>	Nevirapin, NVP
<b>Integrase Inhibitoren</b>	
<b>Isentress</b>	Raltegravir, MK-0518
<b>Protease Inhibitoren</b>	
<b>Agenerase</b>	Amprenavir, APV
<b>Aptivus</b>	Tipranavir, TPV
<b>Crixivan</b>	Indinavir, IDV
<b>Invirase</b>	Saquinavir, SQV
<b>Kaletra</b>	Aluvia, Lopinavir/Ritonavir, LPV/r
<b>Lexiva</b>	Telzir, Fosamprenavir, FPV
<b>Norvir</b>	Ritonavir, RTV
<b>Prezista</b>	Darunavir, DRV
<b>Reyataz</b>	Atazanavir, ATV
<b>Viracept</b>	Nelfinavir, NFV
<b>Pharmakokinetische Verstärker</b>	
<b>Norvir</b>	Ritonavir, RTV

Weitere Medikamente und Wirkstoffe stehen im Frühjahr 2011 kurz vor der Einführung ([www.aidsmeds.com](http://www.aidsmeds.com)). Darunter weitere Inhibitoren der reversen Transkriptase (RT), sowohl NRTI als auch NNRTI, Eintritt und Integrase. Aber auch bisher noch nicht attackierte Ziele im HIV-Replikationszyklus sollen nun beachtet werden. Hierzu zählen zum Beispiel Reifungsinhibitoren (Bevirimat, ein Derivat des Naturstoffes Betulinsäure) und Immunsystem-basierte Therapeutika zur Unterstützung der körpereigenen Abwehr. Die Entwicklung von Bevirimat wurde zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit allerdings vorübergehend gestoppt. Auch Inhibitoren zellulärer Prozesse, die HIV für seine Replikation nutzt befinden sich in der Erforschung. Zum Beispiel Hydroxiurea (Droxia), ein Antineoplastikum aus der Krebstherapie, das T-Zellen an der Teilung hindert und somit aktive Reservoirs der Virenproduktion verkleinern soll (AIDSmeds 2011). Auch an der Entwicklung von Mikrobiziden in Form von zum Beispiel intravaginalen Gelen wird gearbeitet, um das Infektionsrisiko von Frauen aus Risikogruppen vor allem in der Dritten Welt zu senken (Garg et al. 2009).

#### **1.1.6 HIV-Testsysteme**

Für die Suche nach Inhibitoren der HIV-Replikation wurden über die Jahre hinweg einige Testsysteme mit verschiedenen Prinzipien entworfen. Neben käuflichen, enzymatischen Tests zum Nachweis katalytischer Aktivität der RT und Protease und Immunfärbungen infizierter Zellen (Roche, Quiagen, NIH u.a.) der HIV-ELISA (diverse Hersteller) sowie PCR-basierte Methoden zum Nachweis und Quantifizierung einer Infektion humaner Zellen, wurden auch zellbasierte HIV-Indikatorsysteme entwickelt, bei denen ein messbares Signal erzeugt wird, wenn die Zelle durch HIV infiziert wird. So haben einige frühe Systeme ein HIV-abhängiges Reporter-gen welches für die  $\beta$ -Galaktosidase kodiert (Rocancourt et al. 1990; Kimpton and Emerman 1992). Bei Infektion dieser Zellen kann nach deren Fixierung und Zugabe des Substrates ein quantifizierbarer blauer Farbumschlag beobachtet werden. Ein weiteres Prinzip besteht darin die  $\beta$ -Galaktosidase durch eine Luciferase zu ersetzen (Roos et al. 2000; Chiba-Mizutani et al. 2007). Eine weitere Methode ist der Einsatz von markierten Viren, bei denen ein virales Protein mit einem fluoreszierenden Protein, z.B. GFP markiert ist. Dabei können bereits fluoreszierende Viren zur Infektion eingesetzt werden um beispielsweise Lokalisationsexperimente durchzuführen (z.B. Anlagerung an der Zellmembran). Es können auch Viren hergestellt werden, welche das Gen für GFP gekoppelt an ein virales Gen besitzen, was nach Expression der viralen Gene und auch des GFPs zur messbaren Grünfluoreszenz infizierter Zellen führt (Butler et al. 2001; McDonald et al. 2002). Alternativ kann auch hier das GFP gegen Luciferase ersetzt werden. Auch Doppelreportersysteme mit zwei verschiedenen Luciferasen oder Luciferase in Kombination mit der  $\beta$ -Galaktosidase zur Indikation der Infektion und eines anderen Parameters wie zum Beispiel Vitalität sind möglich (Roos 2000; Spenlehauer et al. 2001). Fluoreszierende

Proteine können aber auch die Galaktosidase oder Luciferase in den o.g. Reporterzelllinien komplett ersetzen (Gervaix et al. 1997). Fluoreszierende Proteine haben gegenüber den Galaktosidasen und Luciferasen den Vorteil, dass sie sich ohne zusätzliche Schritte wie zum Beispiel Fixierung, Lyse, Färbung und Substratzugabe nachweisen lassen. Man kann ihre Fluoreszenzintensität direkt in der lebenden Zelle messen und das jeweilige Testsystem gewinnt an Flexibilität und Einfachheit in Aufwand und Handhabung. Ein weiterer Vorteil der passiv fluoreszierenden Proteine gegenüber den erwähnten Indikatoren ist die Tatsache, dass beim Untersuchen größerer Substanzsammlungen (Bibliotheken) zum Beispiel nie ausgeschlossen werden kann, dass einige dieser Substanzen eine inhibierende Wirkung auf katalytische Enzyme wie Galaktosidasen und Luciferasen ausüben können. Somit würde fälschlich eine Inhibition der HIV-Infektion angenommen werden. Momentan werden vom National Institute of Health (NIH) über dessen „AIDS Research and Reference Reagent Programm“ ([www.aidsreagent.org](http://www.aidsreagent.org)) 17 HIV-Indikator Zelllinien zur akademischen Forschung angeboten, die in Tabelle 3 (nächste Seite) zusammengestellt sind. Diese Zelllinien stammen sowohl von natürlichen HIV-Zielzellen wie T-Zellen ab, aber auch von HeLa-Zellen, die durch Modifikationen in der Zusammensetzung ihrer Oberflächenrezeptoren für eine Infektion durch HIV empfänglich gemacht wurden. HeLa Zellen haben den deutlichen Vorteil gegenüber T-Zellen, dass sie adhärent wachsen und somit zum Beispiel Waschschriffe stark vereinfachen. Das jeweilige Signal liegt in einer Ebene auf dem Boden der Zellkulturplatten, was die Messungen erleichtert. Die meisten der verwendeten Reporterkonstrukte unterliegen der Kontrolle der HIV-LTR und Tat. Auch die EASY-HIT HIV-Indikatorzelllinie LC5-RIC, die in dieser Arbeit beschrieben wird stammt von einer HeLa Zelllinie ab und besitzt ein Tat-abhängiges HIV-Indikatorgen, das bei Infektion ein fluoreszierendes Protein produziert. Zusätzlich führten wir die zusätzliche Restriktion der Expression durch Rev ein, was die Hintergrundexpression des Fluoreszenzproteins eliminierte. In Kapitel 3.1 wird diese Zelllinie näher beschrieben.

Tabelle 3: Aktuell beim NIH erhältliche HIV-Indikatorzelllinien. CAT: Chloramphenicol Acetyl Transferase; GFP: Grün fluoreszierendes Protein. Quelle: www.aidsreagent.org; Stand März 2011.

Name der Zelllinie	Zelltyp; parentale Zelllinie	HIV Indikator
TZM-bl	HeLa	Luciferase; $\beta$ -Galaktosidase
HL3T1	HeLa	CAT
M311	T-Zell Leukämie; Molt-4	CAT
BF24	Monozytäre Leukämie; THP-1	CAT
U38	Monocytäres Lymphom; U937	CAT
H938	T-Zellen, H9	CAT
HLCD4-CAT	HeLa	CAT
LuSIV Cells	T-Zell Leukämie; CEM	Luciferase
1G5	T-Zell Leukämie; Jurkat	Luciferase
Rev-CEM	T-Zell Leukämie; CEM	GFP
U373-MAGI	Glioblastom-Astrocytom; U373MG	$\beta$ -Galaktosidase
CEM-GFP	T-Zell Leukämie; CEM	GFP
HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal	HeLa	$\beta$ -Galaktosidase
TZM-bl/FcyRIIa	HeLa	Luciferase; $\beta$ -Galaktosidase
TZM-bl/FcyRI	HeLa	Luciferase; $\beta$ -Galaktosidase
TZM-bl/FcyRIIIa	HeLa	Luciferase; $\beta$ -Galaktosidase
TZM-bl/FcyRIIb	HeLa	Luciferase; $\beta$ -Galaktosidase

## 1.2 Naturstoffe in der Wirkstoffforschung

Naturstoffe dienen den Menschen seit jeher als Quelle für Behandlung und Heilung jeglicher Krankheiten. Jahrtausende lang haben weltweit verschiedene Zivilisationen ganz eigene medizinische Traditionen entwickelt, um sich den gegebenen pathogenen Einflüssen ihrer Umwelt zu widersetzen. Früheste Hinweise auf die Verwendung von Pflanzen zu Heilzwecken gibt es schon für die Neandertaler etwa 60000 Jahre vor unserer Zeit (Cowan 1999). In der westlichen Welt rückte Mitte des letzten Jahrhunderts die industrielle kombinatorische Medizinalchemie (CombiChem) in den Mittelpunkt der medizinischen Wirkstoffforschung. Die technischen Entwicklungen in der Analyse und Synthese sowie das Verständnis komplexer Zusammenhänge zwischen Pathogen, Wirt und Krankheit in Medizin und Biologie schritt sehr rasch voran und verdrängte das traditionell überlieferte Wissen um Herstellung und Wirkung pflanzlicher Arzneimittel (Phytotherapeutika). Trotzdem basieren viele der heute gebräuchlichen Arzneimittel und auch sogenannte Blockbuster-Medikamente mit  $\geq 1$  Mrd. USD Umsatz/Jahr (Cutler 2007) ursprünglich auf Naturstoffen oder synthetischen Kopien oder Modifikation ebensolcher (Newman and Cragg 2007; Butler and Newman 2008; Beutler 2009).

### 1.2.1 Beispiele bekannter Medikamente mit Naturstoff-Herkunft

Morphium wurde als erster Naturstoff in Reinform 1826 von Merck als Medikament eingeführt (Newman et al. 2000). Ein weiteres wichtiges Beispiel ist die Entdeckung der Antibiotika im frühen 20. Jahrhundert durch Alexander Fleming und seine Zeitgenossen (Fleming 1950). In Form von Penicillin als Produkt des Pilzes *Penicillium notatum* wurde es zuerst bei Soldaten eingesetzt, was die Todesfälle durch Sepsis und Wundbrand nach dem ersten Weltkrieg und später auch unter der Zivilbevölkerung erheblich senkte (Clark 1996).

1945 erhielt Sir Alexander Fleming für seine Entdeckung den Nobelpreis (Ligon 2004). Aspirin, das 1899 von Bayer als erstes semi-synthetisches Medikament auf den Markt gebracht wurde, ist ein weiteres Beispiel. Dessen Wirkstoff Acetylsalicylsäure die von dem, in Weidenrinde vorkommenden Salicyl herrührt, wurde in Form von Weidenrindenextrakt bereits in der Antike gegen Schmerzen und Fieber eingesetzt (Mahdi et al. 2006). Paclitaxel (Taxol) aus der Krebstherapie erfüllt die Definition eines Blockbuster-Medikaments und wurde ursprünglich in den 1960er Jahren in der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) entdeckt und heutzutage teilsynthetisch aus einer in der europäischen Eibe (*Taxus baccata*) vorkommenden Vorläufersubstanz Baccatin III hergestellt (Koehn and Carter 2005).

### 1.2.2 Niedergang und beginnende Renaissance der Naturstoffforschung

Ungeachtet dieser Fakten wandte sich die pharmazeutische Industrie in den 1990er Jahren von der Naturstoffforschung ab. Die neuen Methoden zum Hochdurchsatz-Screen großer Substanzbibliotheken und die Möglichkeit durch kombinatorische Chemie diese Bibliotheken auf „Wirkstoff-Ähnlichkeit“ vorweg zu selektieren und zu gestalten erschienen vielversprechender (Beutler 2009; Ji et al. 2009; Molinari 2009; Altmann et al. 2010; Campos et al. 2010). Das führte dazu, dass große Pharmafirmen ihre Aktivitäten im Naturstoffsektor komplett einstellten und ihre teils riesigen Naturstoffsammlungen verkauften oder gar vernichteten. Es sei angemerkt, dass Novartis, Merck, Bayer und einige japanische Unternehmen diesem Trend nicht Folge (Von Nussbaum et al. 2006; Baker et al. 2007; Armitage 2008). Für diese Firmen hat sich die grundsätzliche Art der Naturstoffforschung nicht verändert, bei der Extrakte mikrobieller Fermentationen oder biologischer Gewebe auf gewünschte Aktivität getestet werden. Allerdings hat sich die geographische Orientierung bei der Beschaffung der jeweiligen biologischen Rohstoffe hin zu extremen Lebensräumen wie der Tiefsee oder polaren Regionen verlagert (Arrieta et al. 2010). Die biologische Diversität in einigen dieser Gebiete ist bis dato kaum erforscht und somit ein vielversprechender potentieller Lieferant neuer Wirkstoffe. Allein die Zahl der marinen bioaktiven Naturstoffe die seit den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckt wurden beläuft sich auf etwa 15000 (Mukherjee et al. 2008).

Der (vorübergehende) Niedergang der Naturstoffe als Wirkstoffquelle ging einher mit immer besseren diagnostischen Möglichkeiten, der Neuentwicklung analytischer Methoden in Chemie, Pharmazie und Biologie und nicht zuletzt der Entwicklung eines extremen finanziellen Potentials der Pharmaindustrie (Desai and Chackalamannil 2008; Ganesan 2008; Ojima 2008; Beutler 2009; Ji 2009; Singh and Bodiwala 2010). Aber obwohl sich die kombinatorische Chemie in den 1990er Jahren zur bevorzugten Methode der Wirkstoffforschung entwickelte, wurde bis 2007 nur ein einziger Wirkstoff zugelassen, der *de novo* entwickelt und durch Hochdurchsatz-Screening einer Substanzbibliothek identifiziert



wurde. Hierbei handelte es sich um den Multikinase-Inhibitor Sorafenib (Nexavar; FDA-zugelassen 2005) von Bayer, der mehrere Serin- Threonin- und Tyrosinkinase inhibiert (Newman and Cragg 2007; Harvey 2008). Wie wichtig die Naturstoffe als Quelle für neue Wirkstoffe waren und sind erfährt man, wenn man sich die Herkunft neuer Wirkstoffe der letzten 30 Jahre näher betrachtet. Nach dem Artikel von Newman und Cragg 2007, wurden zwischen 1981 und 2006 insgesamt 1010 neue Wirkstoffe gegen Krankheiten aller Art (Krebsmedikamente, Antibiotika, Antimykotika u.a.) gefunden von denen aber nur 310 auf totaler Synthese beruhen während alle anderen, wenn auch teilweise als synthetisch bezeichnet, zumindest auf einem natürlichen Pharmakophor basieren. In Abbildung 9 ist die Herkunft von 1184 Wirkstoffen aller Art dargestellt. Demnach sind nur 30% aller zwischen 1981 und 2006 eingeführten Wirkstoffe vollsynthetischen Ursprungs. Diese Verhältnisse zwischen vollsynthetischen Stoffen und Naturstoffen gelten ähnlich bei der Gruppe der antiviralen Wirkstoffe. So sind von 78 antiviralen Medikamenten die zwischen 1981 und 2006 zugelassen wurden nur 7 vollsynthetischen Ursprungs. Zieht man von den gesamten 78 die 12 biologischen (Peptide oder Proteine die aus Organismen isoliert und biotechnologisch in einem Ersatzorganismus produziert werden) und 25 Impfstoffe ab, erhält man immer noch 41 Einzelsubstanzen. Die 7 vollsynthetischen Wirkstoffe halten von diesen 41 Substanzen somit einen Anteil von 17,07% gegenüber 82,97% Naturstoffen oder von natürlichen Pharmakophoren abgeleiteten Stoffen.

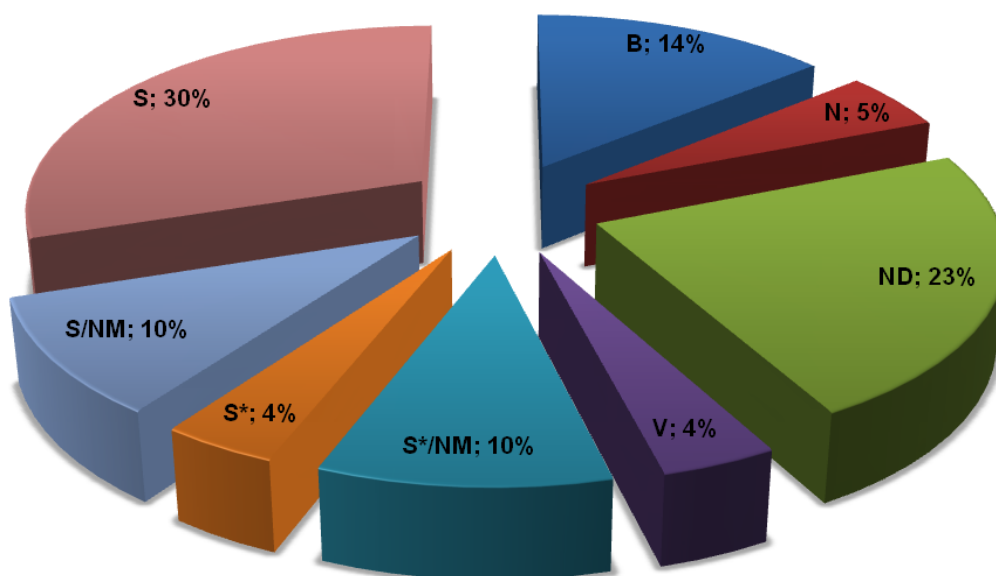


Abbildung 9: Herkunft aller neuen Wirkstoffe zwischen 01/1981 – 06/2006 (n=1184) (Newman and Cragg 2007). B = Biologisch; üblicherweise größere (> 45 Aminosäuren) Peptide oder Proteine die entweder direkt aus Organismen isoliert oder in Ersatzorganismen biotechnologisch hergestellt werden. N = Naturstoff. ND = Von einem Naturstoff abstammend und üblicherweise semi-synthetisch modifiziert. V = Vakzin. S\* = Durch Totalsynthese hergestellt, aber der Pharmakophor ist oder war ursprünglich ein Naturstoff. S = Vollsynthetischer Wirkstoff. Subkategorie NM = einen Naturstoff nachahmend.

Einige Probleme ergeben oder ergaben sich allerdings bei der weiteren Qualifizierung vieler dieser Stoffe zu einem Kandidaten zur Arzneistoffentwicklung. Viele Naturstoffe sind von unvorhersehbarer Komplexität und entzogen sich in den letzten Jahrzehnten der technischen Synthese. Auch die Verletzung der Lipinski Regeln zur „Arzneistoff-Ähnlichkeit“ (Lipinski et al. 1997) verwehrten einigen vielversprechenden Kandidaten den Zugang zur Weiterentwicklung. Diese sogenannten „Rule-of-Five“ oder RO5 besagen, dass ein Wirkstoff:

- 1)  $< 5$  Protonendonatoren,
- 2)  $< 10$  Protonenakzeptoren
- 3) eine Masse von  $< 500$  g/mol (160 – 480)
- 4) einen  $\log P$  (Verteilungskoeffizient)  $< 5$  und
- 5) eine Summe von Stickstoff- und Sauerstoffatomen  $< 10$  haben sollte.

Diese Regeln sollten dem Design neuer Wirkstoffe dienen um das Risiko schlechter Bioverfügbarkeit zu minimieren und sind auf Naturstoffe schlecht anwendbar, da sie häufig durch Regel 3 und 5 der RO5 disqualifiziert würden. Anzumerken sei hier, dass von 1204, von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA) zugelassenen „small-molecule“-Wirkstoffen nur 73% die RO5 erfüllen. Davon sind nur 619 oral verabreichbar, was bedeutet, dass nur etwa 51% der 1204 Medikamente RO5-konform sind (Overington et al. 2006; Zhang and Wilkinson 2007).

### 1.2.3 Naturstoffe und HIV

Auch die Forschung nach antiviralen Wirkstoffen bediente und bedient sich der Naturstoffe als Ressource. Bereits das erste Medikament AZT stammt aus einem marinen Schwamm (Yan 2004), wenn auch ursprünglich als Krebsmedikament geplant. Auch ein unlängst in klinischen Studien erprobter Wirkstoff basiert auf einem Naturstoff. Bevirimat der Firma Panacos Pharmaceuticals (Martin et al. 2007) ist ein synthetisches Derivat der Betulinsäure und soll die Reifung neuer Viren durch die Inhibition der Capsidbildung verhindern. Dies geschieht durch die Inhibierung der Abspaltung des Linker-Peptids p2 von p25 zur Reifung von p24 durch die HIV-Protease (Heider et al. 2010). Griffithsin, ein Lektin aus der marinen Rotalge *Griffithsia* sp. (Mori et al. 2005) inhibiert die Anlagerung von HIV an die Zelle durch Blockade von gp120 im pikomolaren Bereich. Es soll zu einem Mikrobizid weiterentwickelt werden und wird momentan auf Produktion in transgenem Tabak optimiert (O'Keefe et al. 2009). Carrageenane sind sulfatierte Polysaccharide und werden von einer Vielzahl mariner Seegräser produziert. Sie zeigen ebenfalls starke inhibitorische Wirkung gegen HIV-Anlagerungsprozesse und sind Bestandteil klinischer Studien zu topischen Mikrobiziden (McLean et al. 2010).

Viele Forschergruppen in Amerika, Europa und China erforschen Naturstoffe in Reinform aber auch Extrakte auf anti-HIV Aktivität. Manche Stoffe, beziehungsweise Stoffgruppen kehren dabei immer wieder. So scheinen bei näherer Betrachtung der anti-HIV Wirkstoffdatenbank des NIH (<http://chemdb.niaid.nih.gov/>) unter anderem Quinone und Quinoline (hierzu gehört der Proteaseinhibitor Saquinavir), Flavonoide, Cumarine, Katechole und viele weitere chemische Klassen – kurz fast alle chemischen Klassen von Metaboliten höherer und niederer terrestrischer und mariner Pflanzen und Mikroorganismen - anti-HIV wirksame Mitglieder zu besitzen. Sulfatierte Polysaccharide, Flavonoide und Lektine treten häufig als Adsorptionsinhibitoren auf. Das Algenlektin Griffithsin gehört in diese Wirkstoffklasse. Genannt sei hier auch das in der Naturstoffforschung allgegenwärtige Flavonoid Epigallocatechingallat (EGCG) und dessen Derivate, das beispielsweise über eine Interaktion mit gp120 inhibitorisch wirkt (Nance et al. 2009). Flavonoide können aber auch praktisch alle bekannten Ziele in der HIV-Replikation inhibieren, manchmal auch mehrere auf einmal. So inhibieren Quercetin und andere verwandte Flavonoide zum Beispiel die RT, Integrase, Protease und gp120 (Cos et al. 2008). Curcumin und andere Kaffeesäurederivate wie auch Chicoriensäure aus *Echinacea purpurea* inhibieren häufig die Integrase (De Clercq 2000). Die Aktivität von Tat und Rev kann durch eine Vielzahl verschiedener Stoffklassen inhibiert werden wie Quinoline, Quinolone, Steroide, Diazepane und Pyrimidine (<http://chemdb.niaid.nih.gov/>). Cumarine können RT, Integrase und Protease inhibieren. Das Cumarin Calanolide A, isoliert aus dem Regenwaldbaum *Calophyllum lanigerum* und dessen natürliche und synthetische Derivate sind Gegenstand aktueller Forschung und Entwicklung zu neuen NNRTIs (Xue et al. 2010), zeigen aber auch inhibitorische Effekte gegen Tuberkulose (Gothi and Joshi 2011) .

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

HIV ist seit nunmehr fast 30 Jahren ein globales Problem mit einem Schwerpunkt vor allem in den ärmeren Regionen der Welt. HIV entwickelt häufig Resistenzen gegen viele der 26 verfügbaren Medikamente. Auch die teils starken Nebenwirkungen dieser Medikamente aber auch deren schlechte Verfügbarkeit in weiten Teilen der Welt erzeugt einen kontinuierlichen Bedarf an neuen Wirkstoffen. Um neue Wirkstoffe zu identifizieren, benötigt man ein geeignetes Testsystem. Hierbei bringt es enorme Vorteile mit sich, wenn man ein zelluläres Testsystem nutzt, mit dem man den gesamten Replikationszyklus von HIV betrachten kann. Dies ermöglicht dem Nutzer einen multidirektionalen Ansatz bei dem es möglich ist, Inhibitoren gegen alle Zielstrukturen des Virus, als auch gegen zelluläre Faktoren, die bei der HIV-Replikation essentiell sind zu identifizieren. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein HIV-Indikatorzellsystem zu etablieren, mit dem die Suche nach neuen HIV-Inhibitoren des gesamten viralen Replikationszyklus einfacher und effizienter durchgeführt werden kann, als mit herkömmlichen Systemen.

Dieses System sollte dann dazu genutzt werden, um neue Inhibitoren der HIV-Replikation zu identifizieren. Als Quelle hierzu sollten vor allem Naturstoffe dienen, die aufgrund ihrer Vielfalt ein vielversprechendes Reservoir für neue Wirkstoffe darstellen. Hierbei sollen sowohl Einzelsubstanzen aus kleineren Naturstoffsammlungen und Substanzbibliotheken gescreent werden, als auch Substanzgemische in Form von Pflanzenextrakten hinsichtlich ihrer anti-HIV Wirkung untersucht und charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

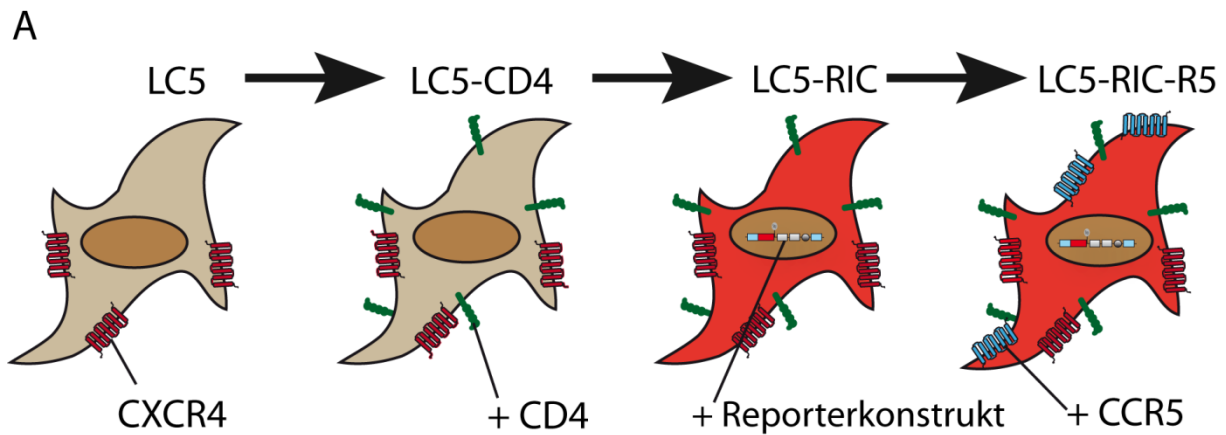
### 2.1 Material

#### 2.1.1 Eukaryotische Zelllinien und Zellen

##### 2.1.1.1 Herleitung der LC5-RIC Zelllinie von der parentalen HeLa Zelllinie LC5

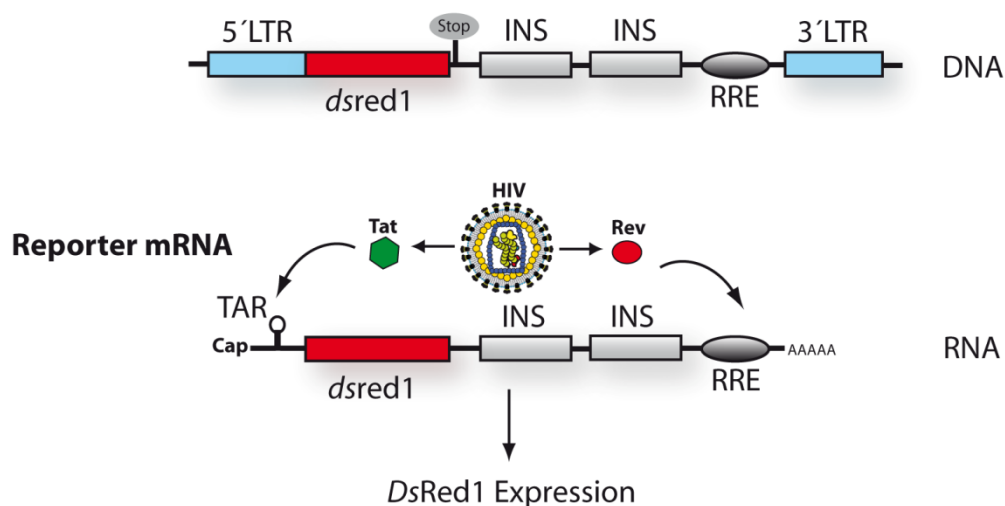
Die HIV Indikator Zelllinie LC5-RIC (wobei RIC für *Red Infected Cells* – rot-infizierte Zellen steht) stammt von einer parentalen HeLa Zelllinie LC5 ab (Mellert et al. 1990) der die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 (CD184) auf der Zelloberfläche bereits eigen war. Diese Zelllinie wurde mit einem Gen transduziert (LC5-CD4), das die stabile Expression des CD4 Oberflächenrezeptors und eine Geneticin-Resistenz vermitteln sollte (Wachinger et al. 1998). Um nun einen Indikator für die HIV-Infektion zu kreieren, wurde in die LC5-CD4 Zelllinie das Reporterkonstrukt pLRed(2xINS)R mit dem Hygromycin B Resistenzgen (Wolff et al. 2006) eingebracht, welches für das rot-fluoreszierende Protein *DsRed1* kodiert (Kremb et al. 2010). Dessen Expression wird durch die transkriptionsregulierende Aktivität des HIV Proteins Tat und der post-transkriptionellen Aktivität des HIV Proteins Rev aktiviert und reguliert, die zu den frühen Produkten der HIV Expression nach der Infektion gehören (Abbildung 10A; Abbildung 12).

Abbildung 10 (nächste Seite): Schematische Darstellung der Generierung der LC5-RIC Zellen und das verwendete Reporterkonstrukt. (A) Die Herstellung der Zelllinien LC5-CD4 und LC5-RIC wurde am HelmholtzZentrum München (ehemals Gesellschaft für Strahlenforschung; GSF) von Dr. Andrea Kleinschmidt (LC5-CD4) und Dr. Stephan Kremb (LC5-RIC) unter Verwendung eines von Dr. Horst Wolff entwickelten Reportergens durchgeführt. Die Modifizierung zu LC5-RIC-R5 geschah während der Anfertigung dieser Arbeit. (B) Oben: Das Tat- und Rev-abhängige Reportergen in den LC5-RIC Zellen. Das stabil integrierte Reportergen beinhaltet die 5' HIV LTR (blau) zur Tat-induzierbaren Transkription, Sequenzen die für das rot fluoreszierende Protein *DsRed1* kodieren (rot) und von HIV-1 stammende Sequenzen für die Rev-abhängige Expression (grau). Letztere bestehen aus inhibitorischen Sequenzen (INS), aus dem HIV-1 gag-Gen (p17/p24 Region) und dem *Rev-Response-Element* (RRE) aus dem HIV-1 env-Gen. Infektion der Zellen mit HIV verursacht die Produktion von Tat und Rev, die in der frühen Phase der HIV Replikation durch die basale Promotoraktivität der LTR initiiert wird. Unten: Die Bindung von Tat an die trans-aktivierende Region (TAR) zur Verstärkung der Transkription und Rev an das RRE der Reporter- mRNAs induziert die Expression von *DsRed1*.



B

### integriertes Reporterkonstrukt



Die LC5-RIC Zellen besaßen zu Beginn dieser Arbeit nur die Oberflächenrezeptoren CD4 und CXCR4. Infolge dessen war es nicht möglich Viren mit einem Tropismus für den alternativen Korezeptor CCR5 (CD195) einzusetzen, da diese nicht an CXCR4 binden und somit nicht in die Zelle eindringen können. Im Laufe dieser Arbeit wurde deswegen in die LC5-RIC Zellen zusätzlich ein Gen zur stabilen Expression des Chemokinrezeptors CCR5 eingebracht (LC5-RIC-R5), um auch Viren mit entsprechendem R5-Tropismus verwenden zu können. Diese Arbeit wurde von Dr. Stephan Kremb und Ingrid Hülsmeier durchgeführt.

#### 2.1.1.2 Verwendete Zellen und Zelllinien

LC5-CD4: Durch das Einbringen des Gens für den Oberflächenrezeptor CD4 (Wachinger 1998) durch HIV-infizierbare HeLa-Zelllinie (LC5). Diese Zellen tragen den HIV-Korezeptor CXCR4 natürlicherweise.

- LC5-RIC: Eine LC5-CD4 Zelllinie, in die das HIV-Reporterkonstrukt pLRed(2xINS)R stabil eingebracht wurde, um die Infektion durch HIV über die Expression eines rot-fluoreszierenden Proteins sichtbar zu machen (Kreymb 2010).
- LC5-RIC-R5: LC5-RIC Zelllinie, erweitert durch das stabile Einbringen eines Gens zur Expression des HIV-Korezeptors CCR5 auf der Zelloberfläche um die Zellen für eine Infektion mit CCR5-tropen Viren empfänglich zu machen.
- KE37.1: Humane T-Lymphom Zelllinie.
- KE37.1<sub>III</sub>B Persistent mit HIV-1<sub>III</sub>B infizierte KE37.1 Zelllinie (Willer et al. 1992), die zur Produktion von Viren genutzt wird.
- J-Lat: J-Lat Full-length clone 8.4 ist eine latent HIV-infizierte T-Zelllinie, deren HIV-Provirus mit einem GFP markiert ist. Die GFP-Transkription kann hierbei repräsentativ um für die Reaktivierung der HIV-Transkription quantifiziert werden (Jordan et al. 2003).
- PBMCs „Peripheral Blood Mononuclear Cells“ zu Deutsch Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, am Institut isoliert aus Buffy-Coats, um HIV-Inhibitoren in primären Zellen zu testen.

## 2.1.2 Medien und Lösungen für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

### 2.1.2.1 Zellkulturmedium für adhärent wachsende Zellen (HeLa, LC5-CD4, LC5-RIC, LC5-RIC-R5 und HEK-293T)

DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) mit GlutaMAX<sup>TM</sup>-I (L-Analyl-L-Glutamin), Pyruvat und 4,5 g/l Glucose (alle von Gibco, Karlsruhe). Zugegeben wurden 10% inaktiviertes fötales Kälberserum (FKS) (bei 56°C 1 Std. Hitze inaktiviert) und 1% Antibiotikum/Antimykotikum (Anti/Anti). Die Zelllinien LC5-CD4, LC5-RIC und LC5-RIC-R5 wurden zusätzlich mit 0,74 mg/ml Geneticin (G418; PAA laboratories, Paching, Austria) (nicht für LC5-CD4) für das Reporterkonstrukt und 0,125 mg/ml Hygromycin B (PAA) für CD4 unter Selektion gehalten. Bei der farblosen Variante ohne pH-Indikator musste 1% Natriumpyruvat gesondert zugegeben werden.

### 2.1.2.2 Zellkulturmedium für Suspensionszellen (humane T-Lymphom-Zelllinien J-Lat, KE37.1 und KE37.1-HIV-1<sub>III</sub>B)

VLE RPMI 1640 (Very Low Endotoxin Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium, GIBCO, Karlsruhe) 1% Anti/Anti, 10% FKS.

### 2.1.2.3 Zellkulturmedium für PBMCs (Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts)

VLE RPMI 1640 Medium mit 2 g/l NaHCO<sub>3</sub> und Glutamin (Biochrom AG, Berlin). Zugegeben wurden 20% inaktiviertes FKS und 1% Antibiotikum/Antimykotikum.

### 2.1.2.4 Einfriermedium für eukaryotische Zellen

DMEM oder VLE RPMI 1640 Zellkulturmedium mit 20% inaktiviertem FKS, 1% Antibiotikum/Antimykotikum und 10% DMSO.

### 2.1.3 Puffer und spezielle Lösungen

Name	Zusammensetzung
MTT-Stammlösung (für 25 ml)	25 mg MTT-Tetrazolium (Sigma) 5 ml PBS
MTT-Färbelösung (für 100 ml)	10% MTT-Stammlösung in DMEM
MTT-Lyselösung (für 100 ml)	10 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 99,4 ml DMSO 0,6 ml Essigsäure
Dünnschicht-Chromatographie-Laufmittel (für 100 ml)	90 ml Aceton 10 ml H <sub>2</sub> O
PBS (Phosphat gepufferte Saline)	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 9,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2 H <sub>2</sub> O 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4

### 2.1.4 Reagenzien und Lösungsmittel

#### 2.1.4.1 Lösungsmittel

Name	Hersteller/Lieferant
DMSO LC-MS Chromasolv®	Sigma, Deisenhofen
Methanol (MeOH) LC-MS Chromasolv®	
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	
Ameisensäure LC-MS Chromasolv®	Sigma, Deisenhofen
Wasser LC-MS Chromasolv®	
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Hexan	
Aceton	Merck, Darmstadt

#### 2.1.4.2 Allgemeine Reagenzien und Chemikalien

Name	Hersteller/Lieferant
Antibiotika-Antimykotika-Lösung (Anti-Anti) 10000 units/ml Penicillin G; 10000 units/ml Streptomycin; 25 µg/ml Amphotericin B	Gibco, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
FACS Flow-, Clean- und Rinse-Lösung	BD Biosciences, Heidelberg



FuGene™ HD Transfektionslösung	Roche Diagnostics, Mannheim
Geneticin G418	Invitrogen, Karlsruhe
Hygromycin B	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat 100 mM (100X)	Gibco, Karlsruhe
Paraformaldehyd eingesetzt als 2% in PBS	Sigma, Deisenhofen
SeaKem® LE Agarose	FMC Bio Products, Rockland, USA
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA Lösung (0,05 %-ge Lösung)	Invitrogen, Karlsruhe

#### 2.1.4.3 HIV Referenzsubstanzen

Name	Lieferant
Azidothymidin (AZT)	NIH AIDS Reagent Program
Efavirenz (EFV)	
Griffithsin (GRFT)	
Raltegravir (RAL)	
118-D-24	
Flavopiridol (FLV)	
Enfuviritid (T-20)	
Saquinavir (SQV)	
Darunavir (DRV)	Arun K. Gosh, Universität Purdue; NIH AIDS Reagent Program

#### 2.1.4.4 Pflanzenmaterial und Phytopharmaka

Name	Hersteller/Lieferant
Pelargonium sidoides getrocknete Wurzel	Amarelo Ingredients; <a href="http://www.Amarelo24.de">www.Amarelo24.de</a>
Pelargonium sidoides lebende Pflanzen	Rühlemann's Kräuter & Duftpflanzen; <a href="http://www.kraeuter-und-duftpflanzen.de">www.kraeuter-und-duftpflanzen.de</a>
Umckaloabo®	W. Spitzner Arzneimittelfabrik GmbH; Apostel Apotheke München Ingolstädter Str. 111A
Echinacea Liquidum	Ratiopharm GmbH; Apostel Apotheke München Ingolstädter Str. 111A
Boswellia serrata	Biotikon, Deutschland
Pueraria lobata	Atlantis-Pharm, Niederlande

#### 2.1.4.5 Substanzbibliotheken

Name	Hersteller/Lieferant
LOPAC <sup>1280</sup> 1280 pharmakologisch aktive Substanzen	Sigma-Aldrich, Deutschland
AnalytiCon 800 Naturstoffe	AnalytiCon Discovery, Deutschland
Specs 400 Naturstoffe	Specs, Niederlande

### 2.1.4.6 Antikörper

Antikörper		BestNr.:	LotNr.:	Verdünnung für Färbung
IgG	APC Mouse IgG <sub>2a</sub> , BD Pharmingen	555576	49264	1:200
CD4	APC Mouse anti-human CD4, BD Pharmingen	555349	38592	1:25
CXCR4	APC Mouse anti-human CD184, BD Pharmingen	555976	46363	1:200
CCR5	APC Mouse anti-human CD195, BD Pharmingen	556903	57765	1:25
HIV gag-p24	KC57-FITC, Beckman-Coulter, Fullerton			

### 2.1.5 Plasmide

#### HIV-1 Volllänge Genom

- pLAI.2  
enthält das vollständige Genom des X4-tropen HIV-1<sub>LAI</sub> zur Produktion von replikationskompetentem Virus (Peden et al. 1991). (NIH Lot Number: 3050749)
- pNL(AD8)  
enthält das vollständige Genom des R5-tropen HIV-1<sub>AD8</sub>. Durch Ersetzen eines 1,7-kBp in der gp120-kodierenden Region des X4-tropen pNL4-3 mit dem entsprechenden Fragment aus pAD8-1 resultierte der R5-trope Klon pNL(AD8). Man erhält replikationskompetenten Virus (Freed et al. 1995). (NIH Lot Number: 3070021)

#### HIV-1 env-defekte Genome

- pNL4-3Δenv  
enthält das HIV-1<sub>NL4-3</sub> Provirus-Genom mit defektem Glykoprotein (Stop-Codon im env-Gen). Wird verwendet zur Komplementierung mit verschiedenen HIV-1 env-Genen zu einem pseudotypisierten, infektiösen Virus mit den gewünschten Oberflächenproteinen gp120/gp41. (University of Massachusetts Medical School – [www.umassmed.edu](http://www.umassmed.edu))
- pSG3Δenv  
enthält die Sequenz des X4-tropen HIV-1<sub>SG3.1</sub> mit einer Insertionsmutation (CTAG) im env-Gen die zum Stop der Translation der Env-Proteine führt. Die Synthese eines

funktionellen Env-Proteins wird somit verhindert. Zur Herstellung env-pseudotypisierter Viren mit dem Glykoprotein des vesikulären Stomatitis Virus (Wei et al. 2003). (NIH Lot Number: 11051)

### HIV-1 env-Plasmide

- pAD8env  
kodiert das HIV-1<sub>AD8</sub> Glykoprotein. Zur Komplementierung des pNL4-3Δenv zu einem infektiösem Virus. (University of Massachusetts Medical School – [www.umassmed.edu](http://www.umassmed.edu))
- pJRFLenv  
kodiert das HIV-1<sub>JRFL</sub> Glykoprotein. HIV-1<sub>JRFL</sub> ist ein R5-troper Stamm. Zur Komplementierung des pNL4-3Δenv zu einem infektiösem Virus. (University of Massachusetts Medical School – [www.umassmed.edu](http://www.umassmed.edu))

### Sonstige Plasmide

- pMD2.G  
kodiert für das Oberflächen-Glykoprotein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV). VSV gehört zur Familie der Rhabdoviridae und ist für eine breite Palette an Zelltypen infektiös. Der Eintritt in die Zellen erfolgt über eine Glykoprotein-induzierte Endozytose (Tronolab, Ecole polytechnique Federale de Lausanne, Schweiz).
- pMSCVPuro/CCR5  
kodiert für den Oberflächenrezeptor CCR5. CCR5 ist essentiell zur Infektion von Zellen mit einem CCR5-tropen Virus (Jones et al. 2007). Das Plasmid wurde benutzt, um LC5-RIC Zellen stabil mit dem CCR5 Rezeptor zu transduzieren. Das Plasmid pMSCVPuro sowie das lentivirale Expressionssystem pHIT60 wurden von Olaf Kutsch zur Verfügung gestellt (University of Alabama, Birmingham) und die Transduktion der Zellen von Dr. Stephan Kremb und Frau Ingrid Hülsmeier durchgeführt.

### 2.1.6 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller/Lieferant
4titude Frame Star 480 RT-PCR Platte	Surrey, UK
6-, 12-, 24-, 96-Loch (Well) Zellkulturplatten (Standard)	Nunc International, Wiesbaden
96-Loch Zellkulturplatten $\mu$ -clear Boden, Wand schwarz	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Loch Zellkulturplatten 4titude, Wand schwarz	4titude; UK
96-Loch Zellkulturplatten BD Falcon, Wand transparent	BD Biosciences, Heidelberg
96-Loch Zellkulturplatten Costar CellBind, Wand transparent	Corning Inc., USA
96-Loch Zellkulturplatten Costar EIA/RIA, Wand transparent	Corning Inc. USA
96-Loch Zellkulturplatten Nunc, Wand + Boden schwarz	Nunc International, Wiesbaden
96-Loch Zellkulturplatten Nunc, Wand + Boden weiß	Nunc International, Wiesbaden
96-Loch Zellkulturplatten OrangeSci, Wand transparent	Orange Scientific; USA
Combitips 1-10 ml für Handystep	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon® tubes 15 und 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
HIV-1 p24 ELISA Kit	Advanced BioScience Laboratories
Kieselgel 60 Dünnschichtchromatographieplatten	Merck, Darmstadt
Nunc Cryo Tube™	Nunc International, Wiesbaden
Nunc Solo Flask T25, T75, T175 Zellkulturflaschen	Nunc International, Wiesbaden
Qiaquick RNeasy Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SPE-Säule 1 mg HLB	Waters, Milford, MA
SPE-Säulen 1mg, 100 mg C2, C8, C18 Varian Bond-Elute	Agilent Technologies, Böblingen Deutschland
Spritzen 5, 10, 20 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Spritzenfilter 0,22 und 0,45 $\mu$ m Porengröße	NeoLab, München
SuperScript First Strand Synthesis System für RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
UPLC-Säule Kinetex Phenyl PFP UPLC column (2,1 x 150 mm, 1,7 $\mu$ m)	Waters, Milford, MA
Zell-Zählkammer (Fast Read 106)	Madaus Diagnostics, Köln

### 2.1.7 Infektiöse Virusüberstände

Die Überstände für HIV-1<sub>IIIB</sub> aus den persistent infizierten KE37.1-IIIB wurden 48 Stunden nach Einstellen der Zelldichte auf  $8 \times 10^5$  Zellen/ml abgenommen, 5 Minuten bei 1500 Upm zentrifugiert und direkt eingesetzt.

HIV-1<sub>LAI</sub>, HIV-1<sub>AD8</sub> HIV-1<sub>JRFL</sub> und HIV-1<sub>VSVG</sub> wurden durch Transfektion der entsprechenden Plasmide und gegebenenfalls der zugehörigen env-Plasmide in HEK 293T Zellen hergestellt.

Primäres Virusisolat wurde aus Serumproben isoliert, die von Bernhard Hemmer, (Klinikum Rechts der Isar, München) zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben wurden auf LC5-RIC-Zellen gegeben und die so behandelten Zellkulturen über 2 Wochen kultiviert. Nachdem ein Großteil der Zellen den HIV-Reporter *DsRed1* produzierten, wurden die Zellen geerntet und in 6-Well Zellkulturplatten umgesetzt und expandiert. Die Überstände wurden über mehrere

Tage geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Sequenzanalysen des nef-Gens des geernteten Virus bestätigten die Authentizität des neuen Virusisolates. Diese Arbeiten wurden von Ingrid Hülsmeier und Dr. Stephan Kremb durchgeführt (Kreml 2010).

### 2.1.8 Spezielle Geräte Mikrotiter-Plattenleser

Tecan Infinite M200 (Monochromator)	Tecan, Österreich
Fluoroscant Ascent CF (Filtergerät)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Biorad Microplate Reader 680	Biorad, München

### FACS-Gerät

BD FACSCalibur (siehe 2.2.16)	BD Biosciences Heidelberg:
-------------------------------	----------------------------

Exzitationslaser 488 nm, 15 mW  
 Fluoreszenzdetektion:  
 FL-1 (BP 530/30)  
 FL-2 (BP 585/30)  
 FL-3 (LP 650)  
 FL-4 (LP 670)

### Pipetten, Pipettierhilfen,

Eppendorf Pipettenset "Research"	Eppendorf, Hamburg
HandyStep Electronic	Brand, Deutschland
Liquidator <sup>96</sup> Benchtop Liquid Handling Device	Mettler-Toledo GmbH, Giessen

### Fluoreszenzmikroskope

Olympus IX-81	Olympus, Deutschland
Zeiss Axiovert 200M	Carl Zeiss AG, Jena

AxioCam, gekühlte CCD Kamera  
 Inkubationskammer  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , Luftbefeuchtung  
 Fluoreszenz von einer HBO 103 W/2 Quecksilberlampe

#### Filtersätze:

Red „00“ - Extinktion: 530-585 FT 600	Emission: LP 615
CFP „47“ - Extinktion: 436/20 FT 455	Emission: BP 480/40
YFP „46“ - Extinktion: 500/20 FT 515	Emission: BP 535/30

#### Objektive:

Plan Neofluar 10x, Numerische Apertur: 0,3, Phase1, Luftimmersion  
 LD Aplanachromat 20x, Numerische Apertur: 0,4, Phase2, Luftimmersion  
 LD Aplanachromat 40x, Numerische Apertur: 0,6, Phase2, Luftimmersion  
 Plan Neofluar 40x, Numerische Apertur: 1,3, Phase3, Ölimmersion  
 Plan Aplanachromat 63x, Numerische Apertur: 1,4, Phase3, Ölimmersion

#### Steuerung/Auswertung:

Microsoft PC Fujitsu Siemens mit Carl Zeiss Axiovision 7.2

**Analytische Geräte**

ACQUITY UPLC PDA, FLR

Waters, Deutschland

maXis Q-TOF-MS

Bruker Daltonis GmbH, Bremen

Apex FT-ICR-MS

Bruker Daltonis GmbH, Bremen

**Sonstige Geräte**

Pulverisette 23 Schwingmühle

Fritsch, Oberstein

Concentrator 5301

Eppendorf AG, Hamburg

LightCycler 480

Roche, Mannheim

Tischzentrifuge SPROUT

Heathrow Scientific, Illinois USA

Tischzentrifuge 1K15

Sigma, Deisenhofen

Multispeed Vortex

Kisker Biotech, Steinfurt

Ultraschallbad Elmasonic S-10

Elma, Singen

Feinwaage Mettler AC100

Mettler-Toledo GmbH, Giessen,

**2.1.9 Spezielle Software**

Adobe Acrobat Pro 9

Adobe Systems, USA

Adobe Illustrator CS3

Adobe Systems, USA

Adobe Photoshop CS3

Adobe Systems USA

Axiovision 7.2

Carl Zeiss, Jena

Data Analysis 3.4 (MS-Auswertung)

Bruker Daltonis GmbH, Bremen

Google Scholar, Literaturrecherche

<http://scholar.google.de/>

GraphPad Prism 4

GraphPad Software, USA

Light Cycler 480 Software

Roche Diagnostics, Mannheim

MassTRIX (MS-Auswertung)

HelmholtzZentrum München

Microsoft Office 2003; 2007

Microsoft, USA

NCBI-PubMed, Literaturrecherche

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Tecan iControl

Tecan, Österreich

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur für humane Zelllinien und Isolate

Alle adhärenz wachsenden Zelllinien wurden in T-75 oder T-185 Zellkulturflaschen von Nunc, Deutschland kultiviert. Die Suspensionszellen KE73.1 und KE37.1<sub>III B</sub> wurden nach dem Auftauen zur Expansion erst in T-25 Flaschen mit 20% FKS, danach in T-75 Flaschen vertikal kultiviert. LC5-Zelllinien wurden nach dem Auftauen ebenfalls in 20% FKS-haltigem Medium gehalten und nach der ersten Passage in 10% FKS-haltigem Medium. Die Selektion der verschiedenen LC5-Zelllinien auf CD4- und CCR5-positiven Zellen erfolgte durch die Zugabe von Geneticin G418, Reporterkonstrukt-positive Zellen wurden durch zusätzliche Zugabe von Hygromycin B selektiert. Die Selektion wurde nach dem Auftauen für mindestens 1 Woche aufrechterhalten, bis die FACS-Analysen zur Quantifizierung der Expression der entsprechenden Faktoren durchgeführt wurden. Bevor Infektionsexperimente durchgeführt wurden, wurden die Zellen für mindestens 48 Stunden in Selektionsantibiotikum-freiem Medium gehalten. Die Zellen wurden über maximal 10 Passagen verwendet. In nachfolgender Tabelle sind die Zellkulturmedien für die verwendeten Zelllinien und primären Zellen zusammengefasst. Die latent infizierten T-Zellen „J-Lat Full-length clone 8.4“ (Jordan 2003) wurden analog der KE37.1 in RPMI gehalten.

Zelllinien/Zellen	Medium	Mediumzusätze	Selektionsantibiotika
LC5-CD4	DMEM	10% FKS, 1% AA, 1% Natriumpyruvat	Geneticin 0,74 mg/ml
LC5-RIC	DMEM	10% FKS, 1% AA, 1% Natriumpyruvat	Geneticin 0,74 mg/ml, Hygromycin B 0,125 mg/ml
LC5-RIC-R5	DMEM	10% FKS, 1% AA, 1% Natriumpyruvat	
HEK-293T	DMEM	10% FKS, 1% AA, 1% Natriumpyruvat	
PBMC	RPMI	10% FKS, 1% AA, 1% Natriumpyruvat	
KIII/KE37.1	RPMI	10% FKS, 1% AA, 1% Natriumpyruvat	
J-Lat Klon 8.4	RPMI	10% FKS, 1% AA, 1% Natriumpyruvat	

### 2.2.2 Die Standard Anordnung des EASY-HIT Tests

LC5-RIC oder LC5-RIC-R5 Zellen werden mit 15 ml PBS gewaschen um FKS-Rückstände zu entfernen. Danach werden die Zellen durch Zugabe von 1 ml (T75 Zellkulturflasche) oder 2,5 ml (T185 Zellkulturflasche) Trypsin-EDTA (GIBCO; 1X) vom Flaschenboden gelöst und in 25 ml DMEM Vollmedium (10% FKS) aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren.  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro ml werden in die entsprechenden Wells einer 96-Well Platte ( $100 \mu\text{l/well} = 1 \cdot 10^4$  Zellen) oder anderen Gefäßen in entsprechend angepassten Volumina ausgesät. Das Medium wird 24 Stunden nach Aussaat abgenommen und  $100 \mu\text{l}$  der jeweiligen Testsubstanzen auf die Zellen übertragen. Dazu wurden die zu testenden Substanzen in gewünschter Konzentration in Zellkulturmedium verdünnt, nach Bedarf in einer 96-Well Platte vorgelegt und dann auf die Testplatte übertragen.  $20 \mu\text{l}$  der zuvor entsprechend der gewünschten Konzentration (Menge an Virus, die innerhalb von 48 Stunden nach Infektion

eine etwa 100-fache Induktion der Reporterexpression über dem Hintergrund bewirkt), in angewärmtem Medium verdünnten oder im Fall des HIV-1<sub>KIII</sub> unverdünnten Viruslösung wurden zuletzt auf die Zellen pipettiert. Das Endvolumen in jedem Well einer 96-Well Platte betrug 120 µl. Die Reihen A und H sowie die Spalte 1 wurde nicht zur Datenerhebung genutzt. Spalte 12 B-G diente als Negativkontrolle (nur Zellen, kein Virus, 0% Infektion) und Spalte 11 B-G als Positivkontrolle (nur Zellen und Virus, 100% Infektion). Nach 48-stündiger Inkubation wurden, falls gewünscht, 20 µl des Überstandes eines jeden Wells auf 24 Stunden zuvor frisch ausgesäte Zellen gegeben um die Menge an freigesetztem, infektiösen Virus in den Überstand zu messen. Zur Messung der Rotfluoreszenz wurde das Medium restlos abgenommen und die Fluoreszenz bei 544 nm Anregung und 596 nm Emission im Tecan Infinite M200 Plattenleser bzw. bei den Filterwellenlängen 544/590 nm im Thermo-Fisher Fluoroscan Ascent Plattenleser gemessen. Die Ergebnisse wurden in Microsoft Excel auf die jeweiligen Positiv- und Negativkontrollen normalisiert. Dazu wurden zuerst die Mittelwerte der Positiv- (100% Infektion) und Negativkontrollen (0% Infektion) ermittelt. Dann wurde der Mittelwert der Negativkontrolle (als Hintergrund) von allen anderen Werten inkl. dem der Positivkontrolle subtrahiert. Die so erhaltenen Werte wurden durch den Mittelwert der Positivkontrolle dividiert. Replikate wurden gemittelt und Standardabweichungen bestimmt. Die so erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten in Prozent wurden nun zur weiteren Auswertung wie zum Beispiel Erhebung der IC<sub>50</sub> und LD<sub>50</sub>-Werte nach GraphPad Prism 4.0 übertragen. Kurvenfits wurden mit der mathematischen Gleichung für sigmoidale Dosis-Wirkungsrelation mit variabler Steigung und der Einschränkung Top = 100 und Bottom = 0 durchgeführt. Als interner Qualitätsstandard wurde ein Determinationskoeffizient  $R^2 \geq 0,9$  vorausgesetzt. Zur Ermittlung der Signifikanzen wurde bei der Auswertung der Kurven unter der Rubrik „Vergleich“ die IC<sub>50</sub>-Werte verschiedener Kurven mit dem F-Test verglichen.

### **2.2.3 Der MTT-Test zur Messung der Zellvitalität**

Zur Messung der Metabolismusrate eukaryotischer Zellen als Indikator für die Vitalität der jeweiligen Zellpopulation wurde der MTT-Test eingesetzt. Nach der Fluoreszenzmessung wurden 100 µl MTT-Färbelösung (siehe 2.1.3) in jedes Well pipettiert und die Platten für weitere 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Färbelösung wurde danach entfernt und die Zellen durch Zugabe von 100 µl Lyselösung (siehe 2.1.3) und vorsichtiges Rütteln lysiert. Die Absorption jedes Wells wurde im Plattenleser bei einer Testwellenlänge von 530 und einer Referenzwellenlänge von 670 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte in Microsoft Excel und GraphPad Prism 4.0. Normalisiert wurde hierbei auf die Positivkontrolle (100% Infektion).



### 2.2.4 Validierungsexperimente nach den Vorgaben des NCGC

Für die Ermittlung der Z'- und CV-Werte wurden LC5-RIC Zellen in 96-Well Platten in versetzten Reihen mit entweder 20 µl Virusüberstand HIV-1<sub>LAI</sub> (maximales Signal: Max), HIV-1<sub>LAI</sub> mit 100 nM Azidothymidin (AZT) (mittleres Signal: Mitt; hier ~ 37% Infektion) oder gar nicht infiziert (minimales Signal: Min). Die Experimente wurden an 3 verschiedenen Tagen (Expt. 1-3) mit jeweils 3 96-Well Platten durchgeführt, die jeweils nach alternierender Reihenfolge Max-Mitt-Min behandelt wurden. Dabei begannen eine Platte von links nach rechts mit Max, dann Mitt und die dritte mit Min, dann wieder von vorne. Aus den drei Platten eines Experimentes wurden die jeweiligen Mittelwerte für Max, Mitt und Min errechnet und die Validierungsparameter ermittelt.

Die CV-Werte wurden nach der Formel

$$\frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}}$$

die Z'-Werte nach der Formel

$$\frac{\text{Mittelwert Max} - \text{Mittelwert Min}}{\text{Standardabweichung Max} + \text{Standardabweichung Min}}$$

und das Signal-Fenster (SW) nach der Formel

$$\frac{\text{Mittelwert Max} - \text{Mittelwert Min}}{\text{Standardabweichung Max} + \text{Standardabweichung Min}}$$

berechnet. Für die Berechnung von S/B (Signal zu Hintergrund) wurden jeweils die Mittelwerte der Max-Signale durch die Mittelwerte der Min-Signale dividiert. Stabw steht hier für Standardabweichung, MW für Mittelwert und n für die Anzahl der Datenpunkte. Die Formeln und das Setup der Assays stammen aus dem Handbuch (Lilly 2008).

### 2.2.5 Time-Of-Addition Assay - TOA

LC5-RIC Zellen wurden wie in der Standard Anordnung in 96-Well Platten ausgesät und infiziert. Die Zugabe der zu testenden Substanzen erfolgte in bestimmten Zeitintervallen nach der Viruszugabe, beginnend mit 0, also der zeitgleichen Zugabe von Virusüberstand und Substanz. Die Konzentrationen der Testsubstanzen betragen mind. 2 x IC<sub>50</sub> oder höher, wenn die Zytotoxizität der Substanzen dies zuließ. Das Endvolumen betrug hier 120 µl, die Substanzzugabe erfolgte in Volumen zu 10 – 20 µl. Der Überstandsübertrag für Schritt 2, die Messung der Rotfluoreszenz und der MTT-Test erfolgten wiederum nach 48 Stunden. Die

Messung des zweiten Schrittes erfolgte 72 Stunden nach dem Übertrag des Überstandes von Schritt 1 auf die frischen Zellen.

### **2.2.6 PBMC Infektionsassay**

PBMCs wurden nach dem Protokoll für Isolation von PBMCs aus peripherem Blut und kordialem Blut (Current protocols in immunology; 7.1.1 – 7.1.8 April 2009; Supplement 85) aus Buffy-Coats (Trennschicht zwischen Erythrozyten und Blutplasma nach Zentrifugation von Vollblut; enthält hauptsächlich Leukozyten und Thrombozyten; Deutsches Rotes Kreuz) isoliert. Eine Stimulation mit 50 Einheiten/ml RPMI-Zellkulturmedium Interleukin-2 (Sigma) erfolgte für 72 Stunden vor der Infektion. Danach wurden  $5 \cdot 10^5$  PBMCs/Well in 96-Well Platten ausgesät. Die Behandlung und Infektion erfolgte analog der Standard Anordnung des EASY-HIT Tests. Es wurden jeweils nach 48, 72 und 96 Stunden 20  $\mu$ l des Überstandes auf LC5-RIC Zellen in 96-Well Platten übertragen. Je nach Bedarf wurde die entsprechende Menge IL-2 haltiges Medium nach jeder Überstands-Abnahme wieder aufgefüllt. Die Messung der Fluoreszenz der LC5-RIC Zellen erfolgte jeweils 48 Stunden nach Übertragung des Überstandes. 140 Stunden nach Infektion wurde mit den PBMCs ein MTT-Test durchgeführt. Zu jeder vollständigen Medium-Abnahme wurden die PBMCs kurz in der Plattenzentrifuge zentrifugiert (1500 Upm, 1,5 Minuten). Um zu überprüfen ob die PBMCs mit HIV infiziert waren, wurde genomische DNA extrahiert und die provirale DNA darin quantifiziert (Daten nicht gezeigt).

### **2.2.7 RNA-Isolierung aus humanen Zellen**

Die Gesamt-RNA aus J-Lat Full Length clone 8.4-Zellen wurde mit dem Qiaquick RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen. Dabei wurden  $5 \times 10^5$  Zellen entsprechend dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Anschließend wurde die Konzentration bestimmt und die gewonnene RNA bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.2.8 Reverse Transkription**

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit dem SuperScript First Strand Synthesis System für RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe) den Angaben des Herstellers folgend. Dazu wurden 500 ng RNA zuerst mit DNase I (Promega, Madison, USA) in einem finalen Endvolumen von 10  $\mu$ l verdaut und anschließend 7  $\mu$ l dieser verdauten RNA in einem finalen Endvolumen von 20  $\mu$ l unter Verwendung von Random-Hexamer-Primern in einer RT-Reaktion umgeschrieben. Der laut Herstellerangabe optionale Verdau der RNA/DNA-Heteroduplexe mit RNase H erfolgte ausnahmslos.

### **2.2.9 Real-Time PCR**

Eine Möglichkeit um die Mengen von einem RNA-Ausgangsmaterial quantitativ zu bestimmen ist die Real-Time-PCR. Bei dieser Methode wird der Amplifikationsverlauf eines

Templates über die Zeit verfolgt, indem die Fluoreszenz gemessen wird, die von dem Farbstoff SYBR Green abgegeben wird, nachdem er sich an die kleine Furche doppelsträngiger DNA angelagert hat. Anschließend wird der CP-Wert errechnet und es kann auf die Menge des Ausgangsmaterials zurück geschlossen werden. Der CP-Wert gibt den „*crossing point*“ an, den Zyklus, an dem ein festgelegter Schwellenwert an Amplifikat erreicht wurde. Je höher der CP-Wert, desto weniger Template war im Ausgangsmaterial.

Basierend auf der Veröffentlichung von Radonic et al. wurde das House-Keeping-Gen RNA-Polymerase II (RPII) als Standard gewählt (Radonic et al. 2004). Ein Fragment der RNA-Polymerase II wird über die Primer RPIIs und RPIIas amplifiziert (siehe 2.2.10). Das heißt, dieses Primerpaar wurde mit in die Analyse aufgenommen und später der CP-Wert der Probe (HIV-1 Transkripte) auf den CP-Wert von RPII standardisiert, indem das Ratio der HIV-1 Transkripte auf RPII errechnet wurde. Anschließend wurde das Ratio der behandelten zur nicht-behandelten Probe errechnet ( $= 2^{-\Delta\Delta CP}$  mit  $\Delta\Delta CP = \Delta CP_{\text{behandelt}} - \Delta CP_{\text{unbehandelt}}$  und  $\Delta CP = CP_{\text{HIV}} - CP_{\text{RPII}}$ ) (Pfaffl 2001).

### 2.2.10 LightCycler-Ansatz und Amplifikations-Programm

Es wurde für alle Ansätze der LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) verwendet und 18  $\mu\text{l}$  des folgenden Master-Mixes in die Wells der Frame Star 480 96-Well-Platte vorgelegt und 2  $\mu\text{l}$  der revers transkribierten RNA (cDNA) zupipettiert. Dieses Experiment erfolgte unter Anleitung von Dr. Manja Meggendorfer.

Ansatz:

1  $\mu\text{l}$  5'-Primer (10  $\mu\text{M}$  Stocklösung)

1  $\mu\text{l}$  3'-Primer (10  $\mu\text{M}$  Stocklösung)

10  $\mu\text{l}$  SYBR Green I Master

6  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

verwendete Primer:

RPIIs: GCACCACGTCCAATGACAT

RPIIas: GTGCGGCTGCTTCCATAA

HIV-1 Transkripte (GFP)-for: ACGTAAACGGCCACAAGTTC

HIV-1 Transkripte (GFP)-rev: AAGTCGTGCTGCTTCATGTG

Die Amplifikation und Quantifizierung erfolgte mit folgendem experimentellen Programm im LightCycler 480 (Roche, Mannheim):

Schritt	Temperatur	Zeit	Steigung Temperatur	Zyklusanzahl	Akquisitions-Modus
<b>Denaturierung</b>	95°C	10 Min.	4,4°C/Sek.	1	keiner
<b>Amplifikation</b>	95°C	10 Sek.	4,4°C/Sek.	40	keiner
	60°C	5 Sek.	2,2°C/Sek.	40	keiner
	72°C	10 Sek.	4,4°C/Sek.	40	single
<b>Schmelzkurve</b>	95°C	1 Sek.	4,4°C/Sek.	1	Keiner
	65°C	15 Sek.	2,2°C/Sek.	1	Keiner
	95°C	0 Sek.	0,11°C/Sek.	1	kontinuierlich
<b>Kühlung</b>	40°C	30 Sek.	2,2°C/Sek.	1	Keiner

### 2.2.11 Viruspräparation in KE37.1<sub>III</sub>B Zellen

Die persistent infizierten KE37.1<sub>III</sub>B-Zellen werden 48 Stunden vor Gebrauch auf  $8 \cdot 10^5$  Zellen pro ml RPMI eingestellt. Zur Infektion der LC5-RIC Zellen wird der KE37.1-Überstand abgenommen, 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und 20 µl des Virus-haltigen Überstandes (~ 2-3E7 HIV RNA-Kopien, ermittelt durch Dieter Hoffmann, Institut für Virologie TUM, Abteilung Diagnostik, Klinikum Rechts der Isar, München per Real-Time PCR mit dem Kit „RealTime HIV-1“ von Abbott, Wiesbaden) pro Well auf die LC5-RIC Zellen gegeben.

### 2.2.12 Viruspräparation in HEK-293T Zellen und Titration mit den LC5-RIC Zellen

Für die Produktion von HIV-1<sub>LAI</sub>, -AD8, -JRFL, -VSVG wurden  $2 \cdot 10^5$  HEK 293T Zellen pro Well einer 6-Well Platte in 2 ml/Well ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen mit 1 µg DNA der entsprechenden Plasmide transfiziert (bei der Präparation der VSVG-pseudotypisierten Partikel wurden je Plasmid nur 500 ng eingesetzt). Dazu wurden die Plasmide mit 3 µl FuGene/µg DNA in FKS-freiem DMEM für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Well wurden 200 µl Transfektionsansatz (Plasmid und FuGene in Medium) vorsichtig tropfenweise hinzupipettiert. Nach 48 Stunden wird pro Well 1 ml frisches DMEM zugegeben um die Virusausbeute zu erhöhen. 24 Stunden später wird der Überstand abgenommen, bei 2000 g ab zentrifugiert und nach Aliquotierung in gewünschte Volumina bei -80°C eingefroren. Nach Auftauen eines Aliquots für 3 Stunden bei 37°C werden 1, 5, 10, 20, 30 und 40 µl davon im Triplikat auf LC5-RIC Zellen gegeben und 48 Stunden später die Fluoreszenz gemessen. Parallel wird in dem gleichen Aliquot die Menge an viralem p24-Protein mittels p24<sup>Gag</sup> ELISA (Enzyme linked immuno absorbant Assay) bestimmt. Die Menge an infektiösem Virus kann nun näherungsweise bestimmt werden. Ausgehend von 10000 viralen Partikeln pro Pikogramm p24-Protein und 100 infektiösen Einheiten pro 1000 Partikeln erhält man also etwa 1000 infektiöse Partikel pro Pikogramm (pg) p24 nach der Herleitung <http://www.sigmaaldrich.com/sigma-aldrich/areas-of-interest/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/learning-center/titer-by-p24-assay.html>. Die einzusetzende Menge

HIV wurde nun anhand der Verknüpfung zwischen Fluoreszenzdaten und p24-Menge für jede Präparation neu ermittelt. Kriterium war hierbei, dass bei der eingesetzten Virusmenge mindestens eine etwa 100-fache Induktion des Reportersignals nach 48 Stunden messbar war.

### **2.2.13 p24 ELISA**

Zur Quantifizierung der Virusmenge in den Überständen HIV-1-infizierter und -transfizierter Zellen wurde ein HIV-1 p24 ELISA durchgeführt. Dazu wurde die Menge an p24 in Verdünnungen der jeweiligen zellfreien Überstände von 1:100 bis 1:100000 sowie in Verdünnungen des mitgelieferten p24 Standards bestimmt und anhand einer p24-Eichgerade quantifiziert. Alle Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers Advanced BioScience Laboratories, Inc. durchgeführt. Die Absorptionsmessung bei 450 nm erfolgte im Tecan Infinite M200 Plattenleser.

### **2.2.14 Antikörperfärbungen CD4, CXCR4 und CCR5**

LC5-RIC oder LC5-RIC-R5 wurden nach Abnahme des Mediums mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst und in DMEM aufgenommen. Nach Auszählen der Zellen am Mikroskop wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei 1500 Upm für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch vorsichtiges auf- und abpipettieren in 500 µl PBS mit dem entsprechenden Antikörper gegen CD4, CXCR4, CCR5 oder dem Kontrollantikörper gegen IgG resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde in Dunkelheit. Danach wurden die Zellen nach erneutem Pelletieren bei 1500 Upm für 5 Minuten in 500 µl PBS aufgenommen und die FACS-Analyse durchgeführt.

### **2.2.15 Detektion von zytoplasmatischem HIV p24 mittels Immunfluoreszenz**

Um eine Infektion von Zellen über den Gehalt an produziertem HIV gag-p24 zu messen, wurden Antikörperfärbungen des intrazellulären gag-p24 durchgeführt und die so gefärbten, infizierten Zellen im FACS quantifiziert. Hierzu wurden LC5-RIC Zellen in 6-Well Platten ausgesät und mit HIV-1<sub>IIIIB</sub> aus KE37.1-Überstand infiziert. Unterschiedliche Zeitpunkte nach der Infektion wurden etwa  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro Probe geerntet. Die Zellen wurden nun bei 1500 Upm zentrifugiert und das Pellet in 1 ml 2%igem Paraformaldehyd in PBS resuspendiert, um sie zu fixieren. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut bei 1500 Upm zentrifugiert und das Pellet in 1 ml 1%igem Saponin in PBS resuspendiert um die Zellen zu permeabilisieren. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 1500 Upm und das Pellet wurde in 1 ml 1% BSA / 0,1% Saponin in PBS resuspendiert um unspezifische Epitope zu blocken. Nach wiederholtem Zentrifugieren bei 1500 Upm wurde das Pellet in 100 µl einer 1:100 Verdünnung des gag-p24 Antikörpers aufgenommen und für 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach 2 weiteren

Waschschritten durch Pelletieren für 5 Minuten bei 1500 Upm und Resuspendieren mit 500 µl PBS wird das Pellet in 500 µl PBS aufgenommen und die FACS-Analyse durchgeführt.

### 2.2.16 FACS Analysen

Die FACS-Analysen für die Oberflächenrezeptorfärbung sowie das Gag-staining wurden mit einem Facscalibur von Becton Dickinson durchgeführt. Pro Färbung bzw. Kontrolle wurden 50000 – 100000 Zellen gemessen. Die jeweiligen Parameter sind in nachfolgender Tabelle angegeben.

Färbung	Farbstoff	Detektions bei			gemessene Zellzahl
CD4/CXCR4/CCR5 - AK	APC gelabelt (Allophycocyanin)	Exzitation	645nm	FL-4	50.000
		Emission	660nm		
gag (p24)	FITC gelabelt (Fluoreszeinisothiozyanat)	Ex.	495nm	FL-1	50.000
		Em.	519nm		
DsRed	dsRED Monomer	Ex.	557nm	FL-3	100.000
		Em.	592nm		
	dsRED2 (RFP)	Ex.	563nm		
		Em.	582nm		

### 2.2.17 Handhabung und Extraktion von Pflanzenmaterial

#### 2.2.17.1 EPs 7630® (Umckaloabo®)

Einige ml Umckaloabo® wurden eingedampft (Eppendorf Concentrator) und im entsprechenden Volumen Wasser wieder aufgenommen, um den in Umckaloabo® enthaltenen Ethanol zu entfernen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.17.2 Extraktion der getrockneten Wurzeln von *Pelargonium sidoides*

Die getrockneten Wurzeln von *Pelargonium sidoides* (PS) wurden in einer Schwingmühle (Pulverisette) gemahlen. Dazu wurde die 15 ml fassende Mahlkammer bis zur Hälfte mit den etwa 4-6 mm großen Wurzelstücken gefüllt und 3 Edelstahlkugeln (Ø 10 mm) dazugegeben. Die Wurzeln wurden bei einer Frequenz von 50 Schwingungen/s für 15 Minuten gemahlen um eine Körnung von etwa 20 µm zu erhalten (lt. Handbuch Hersteller). Das erhaltene Pulver wurde zu 200 mg/ml in Wasser aufgenommen. Die Extraktion bei Raumtemperatur mit Wasser oder beigesetzten Lösungsmitteln erfolgte durch 15 minütiges Vortexen bei 3500 Upm, gefolgt von 15 Minuten im Ultraschallbad. Danach wurde das Gemisch bei 14k Upm für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,22 µm-Filter steril filtriert. Zur Extraktion bei 100°C wurde Wurzelpulver zu 200 mg/ml für 10 Minuten in H<sub>2</sub>O gekocht, danach 20 Minuten bei 14k Upm zentrifugiert und der Überstand steril filtriert. Die Bestimmung des gelösten Trockengewichtes erfolgte durch eindampfen (Eppendorf Concentrator) von 3 mal 500 µl in vorher leer gewogenen 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen und Bildung des Mittelwertes der ermittelten Einzelgewichte. Zur flüssigflüssig Extraktion wurden 3 ml des fertigen Extraktes mit je 3 ml Hexan oder Chloroform in einem 15 ml Falcon-Tube für 2 Minuten geschüttelt, bei 4k Upm zentrifugiert und die Phasen

getrennt ab-pipettiert. Diese Schritte wurden noch ein zweites Mal wiederholt. Die resultierenden Fraktionen wurden bei 60°C unter Vakuum zur Trockene eingedampft und im entsprechenden Volumen reinen Wassers resuspendiert. Die Lagerung aller Extrakte erfolgte bei -20°C.

### **2.2.17.3 Extraktion der Wurzeln der frischen Pflanze *Pelargonium sidoides***

Zur Extraktion der frischen Wurzeln wurden die Pflanzen (zum Zeitpunkt der Lieferung etwa 15 cm) kultiviert bis sie Blüten trugen (siehe Abbildung 28) um die Identität der Pflanze als *Pelargonium sidoides* zu bestätigen. Die Pflanze wurde von der Erde befreit und die Wurzeln mit Wasser gespült. Vor dem Schnitt folgte ein weiterer kurzer Waschschrift mit Ethanol. Die klein geschnittenen Wurzelstücke wurden nun in der Schwingmühle gemahlen, in Wasser aufgenommen, gekocht und der Überstand abzentrifugiert, steril filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.2.17.4 *Echinacea Liquidum* (Ratiopharm)**

*Echinacea Liquidum* (Phytomedizin aus *Echinacea purpurea*) wurde entsprechend Umckaloabo® eingedampft und in Wasser resuspendiert (s.o.) um den enthaltenen Ethanol zu entfernen, bevor es zu den Zellen gegeben wurde.

### **2.2.18 Dünnschichtchromatographie**

Zur Reinigung der Dünnschichtplatten (Kieselgel60-10x10 cm, Merck) von etwaigen Verunreinigungen wurden diese in die zuvor mit dem jeweiligen Laufmittel atmosphärisch gesättigte Kammer mit ca. 0,5 cm Füllhöhe Methanol (MeOH) gestellt und ca. 10 Minuten gewartet, bis die Laufmittelfront die obere Kante der Platte erreicht hatte. Danach wurde die Platte unter dem Abzug getrocknet und der Vorgang wiederholt. Nach 3-maligem Waschen mit MeOH wurde noch einmal mit dem eigentlichen Laufmittel gewaschen. Nach dem Trocknen der gewaschenen und konditionierten Platte wurde PS im Abstand von 1 cm von den Seiten und 2 cm von unten mit einer 10 µl Pipette in 1 µl Spots aufgetragen. Nach Trocknung der Auftragspunkte wurde die Platte in die Laufkammer gestellt, der Deckel geschlossen und etwa 15 Minuten gewartet bis die Laufmittelfront etwa 0,5 cm (markiert durch einen Strich) vom oberen Rand entfernt war. Die Platte wurde entnommen, unter dem Abzug getrocknet und fluoreszierende oder verfärbte Banden mit einer Labor UV-Lampe bei 366 und 254 nm detektiert und mit Bleistift markiert. Die Banden und die dazwischenliegenden Bereiche wurden mit einem Spatel vorsichtig abgekratzt, die Replikate jeweils vereinigt und in 250 µl Wasser aufgenommen. Nach 10-minütigem vortexen wurden die Fraktionen 20 Minuten bei 14k Upm zentrifugiert, die Überstände abgenommen und zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

### 2.2.19 Festphasenextraktion „Solid Phase Extraction“ (SPE)

Das wässrige Rohextrakt von *Pelargonium sidoides* ist hochkonzentriert und sehr komplex in seiner Zusammensetzung. Diese Eigenschaften können eine flüssigchromatographische Trennung erheblich erschweren bzw. stören. Also entschieden wir das Extrakt per SPE zu equilibrieren und von Salzen und Verunreinigungen zu befreien, sowie Konzentrationen von Substanzen, die im Überschuss vorhanden sind zu verringern. Dazu wurden Extraktionen mit insgesamt 6 verschiedenen SPE-Säulenmaterialien durchgeführt, um die geeignetste zu ermitteln.

#### HLB-Protokoll (Säulen von Waters; Milford, USA):

- |                   |                           |
|-------------------|---------------------------|
| 1: Equilibrieren: | 1 ml MeOH                 |
|                   | 1ml H <sub>2</sub> O      |
| 2: Laden:         | 100 µl Extrakt (40 mg/ml) |
| 3: Waschen:       | 1 ml 5% MeOH              |
| 4: Elution:       | 1 ml MeOH                 |

#### Varian-Protokoll (Säulen von Agilent; Böblingen, Deutschland):

- |                   |                           |
|-------------------|---------------------------|
| 1: Equilibrieren: | 1 ml MeOH                 |
|                   | 1ml 2% Ameisensäure       |
| 2: Laden:         | 100 µl Extrakt (40 mg/ml) |
| 3: Waschen:       | 1 ml 2% Ameisensäure      |
| 4: Elution:       | 1 ml MeOH                 |

Das Eluat, der Durchfluss des Ladeschrittes mit dem Extrakt und der Durchfluss des Waschschrattes wurden gesammelt, eingedampft und in H<sub>2</sub>O/MeOH 80/20 aufgenommen und in UPLC-zertifizierte Fläschchen übertragen. Eine kleine Probe (10 µl) jeder Fraktion wurde in der UPLC untersucht, der Rest eingedampft und in je 100 µl reinem Wasser aufgenommen. Die Aktivität aller so erhaltenen Fraktionen wurde im EASY-HIT System bestimmt und mit dem jeweiligen Chromatogramm verglichen. Das aktivste Eluat bei geringstem Materialverlust in Lade- und Waschdurchlauf mit der besten chromatographischen Trennbarkeit war hier das Eluat der Bond Elute C8-Säule von Varian.

Zur Vorbereitung auf die Fraktionierung des PS-Rohextraktes wurde es per SPE mit einer Varian Bond Elute C8-Säule vorbehandelt. Das o.g. Protokoll für Varian-Säulen wurde wie folgt abgewandelt: Die Ladekonzentration des Extraktes betrug 10 mg/ml. Die Elution erfolgte in 2 Schritten mit je 500 µl MeOH. Je 1 ml Eluat wurde eingedampft und in 250 µl H<sub>2</sub>O/MeOH 80/20 resuspendiert. Bis zur Injektion in die UPLC wurden die Proben bei -20°C eingefroren.



### 2.2.20 UPLC/Q-TOF Analyse

Die Probenanalyse erfolgte mit einem Aquity UPLC System von Waters, gekoppelt mit einem maXis Q-TOF Massenspektrometer von Bruker Daltonics, ausgerüstet mit einer Elektrospray Ionenquelle (ESI). Die Kapillar- und Spray-Schildspannung wurden auf 4500 Volt und 4000 Volt eingestellt. Die Trockengastemperatur betrug 250°C mit einer Flussrate von 8 L/Min. Während der NanoMate-Applikation änderten sich Kapillar und Schildspannung zu respektive 100 Volt und 30 Volt, Trockengastemperatur und –Flussrate auf 80°C und 2 L/Min.

Die aufgenommenen Spektren wurden extern nach Arginin-Clustern (5 mg/L in MeOH) kalibriert. Kalibrationsfehler im relevanten Massebereich betragen unter 0,3 ppm. Die Akquisition der Daten erfolgte mit der Kontrollsoftware micrOTOF control V. 3.0, SR2 von Bruker Daltonics. Datenhandling erfolgte mit der Software Data Analysis V. 4.0 SP3, ebenfalls von Bruker Daltonics. Die Spektren wurden in „continuum“ und „centroid“ Modus aufgenommen. Der Bereich betrug 50-1000 m/z mit einer Spektren-Scan-Rate von 1 Hz bei einem gleitenden Durchschnitt von 2.

Die chromatographische Analyse wurde mit einer Kinetex Pheny-PPP UPLC-Säule durchgeführt. Puffer A2 enthielt H<sub>2</sub>O/MeOH/Ameisensäure 95/5/0,1, Puffer B2 MeOH. Die Flussrate betrug 300 µl/Min. Der hierbei angelegte Gradient ist im Folgenden dargestellt:

<b>Zeit in Min.</b>	<b>Flussrate (ml/min)</b>	<b>Puffer A2 %</b>	<b>Puffer B2 %</b>	<b>Steigung</b>
<b>0</b>	0,3	100	0	6
<b>7</b>	0,3	50	50	6
<b>8</b>	0,3	0	100	6
<b>8,50</b>	0,3	0	100	6
<b>8,51</b>	0,3	100	0	6
<b>10,00</b>	0,3	100	0	6

Die Temperatur des Säulenofens betrug 60°C und die des Samplemanagers 15°C. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl und es wurden 8 Injektionen hintereinander durchgeführt, um das Fraktionsvolumen zu steigern. Die Injektionsparameter für die UPLC (Nomenklatur in Englisch) lauteten (nächste Seite):

Parameter	Wert
Loop volume	10µl
Injection volume	10 µl
Injection type	Full Loop
Type of the weak wash	H <sub>2</sub> O/AcN: 9/1
Volume of the weak wash	3000µl
Type of the strong wash	AcN/ MeOH/iProH 6/3/1
Volume of the strong wash	1000µl
Syringe draw rate	100µl/min
Needle Placement (from bottom)	3mm
Air gaps: pre-aspirate	4 µl
post- aspirate	4 µl

Nach dem Verlassen der UPLC-Säule, wurde die Probe mit einem TriVersa NanoMate Fraktions-Sammler, gekoppelt an ein Chip-Elektrospray System positiv ionisiert und gleichzeitig in 37 Fraktionen gesammelt. Die Festlegung der Fraktionen erfolgte visuell anhand der aus dem 200 – 400 nm Totalchromatogramm extrahierten Chromatogramme des Extraktes bei 330 und 289 nm. Die NanoMate-Fraktionsaufteilung ist im Folgenden dargestellt:

Segmentnummer	Segmentdauer (Minuten)	Fraktionsbreite (Sekunden)	Anzahl Gesammelter Fraktionen
1	1 - 2,05	20	3
2	2,05 - 3	20	3
3	3 - 3,6	10	4
4	3,6 – 4,1	12	3
5	4,1 – 4,7	18	2
6	4,7 - 5,2	12	3
7	5,2 – 5,8	18	2
8	5,8 – 6,2	12	2
9	6,2 – 6,9	6	7
10	6,9 – 7,2	20	1
11	7,2 – 7,7	12	2
12	7,7 - 8,6	20	3

Ein Set Fraktionen aus 4 Injektionen wurde eingedampft, in 500 µl DMEM / Fraktion Zellkulturmedium aufgenommen und im EASY-HIT System auf anti-HIV Aktivität getestet. Alle Fraktionen wurden parallel 1:1000 in MeOH verdünnt und im FT-ICR-MS analysiert.

### 2.2.21 FT-ICR-MS

Die hochauflösenden Massenspektren wurden mit einem APEX Qe Fourier-Transformation Ionen-Cyklotron-Resonanz Massenspektrometer (FT-ICR-MS) von Bruker aufgenommen. Die Proben wurden mit einem Auto-Sampler injiziert. Die Spektren wurden extern über Cluster von Arginin (2,5 mg/L in MeOH) und intern über eine Fettsäuren-Liste im negativ-Modus kalibriert. Kalibrationsfehler im relevanten Massenbereich betragen immer unter 100 ppb.

FT-ICR-MS Parameter:

Parameter	Werte
<b>Acquisition Mass control</b>	TD (Acquisition): 2M TD (Tune/Display): 1M Low Mass : 122.86 m/z High Mass: 1000 m/z
<b>API Source</b>	Polarity: ESI <sup>-</sup> Capillary: 4000V End Plate Offset: -500 V
<b>Source Gas Tune</b>	Dry Gas Flow: 2.5 L/min Dry Gas Temperature: 200 C° Nebulizer Gas Flow: 1.3 L/min
<b>Accumulation</b>	Average spectra: 300 Source Acceleration: 0.001 sec Ion Accumulation Time: 0.500 sec TOF: 0.650 ms
<b>Analyzer</b>	Side Kick: 5V Side Kick Offset: 5V Sweep Exitation Power: 18 % Front Trap Plate: -0.600 V Back Trap Plate: -0.800 V Analyzer Entrance: 10 V

Arginin-Kalibrationstabelle der Spektren im negativen Ionisationsmodus:

Referenz m/z	Fehler [ppm]
<b>199,17035</b>	-0,003
<b>227,20165</b>	0,006
<b>255,23295</b>	0,005
<b>283,26425</b>	0,001
<b>311,29555</b>	0,022
<b>367,35815</b>	0,015
<b>Standardabweichung</b>	0,015

Akquisition und Handling der Daten erfolgte mit der Software Data Analysis V. 4.0 von Bruker Daltonics. Peaks, die Intensitäten über dem Signal/Hintergrund-Ration von  $4,5 \times 10^6$  aufwiesen, wurden exportiert. Die Daten wurden danach mithilfe einer „in-house“ Software durch das Alignment aller Peaks mit einem maximal erlaubten Fehler von 1 ppm in eine Matrix gespeichert. Die Annotierung der Massen mit Intensitäten über  $2E7$  und maximaler, gleichzeitiger Detektion in 5 Fraktionen wurden an MassTRIX übermittelt ([www.masstrix.org](http://www.masstrix.org)). Dieser Webserver ordnet zu jeder gemessenen Masse potentielle Annotationen aus den Datenbanken KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org/>) und HMDB zu. Die finale Interpretation der Annotationen erfolgte manuell.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 EASY-HIT – Etablierung und Validierung eines Zell-basierten Reportersystems zur Identifizierung von Inhibitoren multipler Zielstrukturen im HIV-1 Replikationszyklus

Um Inhibitoren gegen alle Schritte des HIV Replikationszyklus zu identifizieren, war es nötig ein entsprechend vielseitiges und einfach handzuhabendes Testsystem zu etablieren. Hierzu entwickelten wir ein zellbasiertes Reportersystem bei dem die HIV-Indikation auf einem HIV-1 Rev- und Tat-Protein abhängigen Reporterkonstrukt basiert (Abbildung 10B), welches nach erfolgreicher Infektion mit HIV-1 das rot-fluoreszierende Protein *DsRed1* exprimiert. Diese Rotfluoreszenz ist im Fluoreszenzplattenleser messbar und in ihrer Intensität direkt proportional zur Stärke der HIV-Infektion der entsprechenden Zellpopulation. Dieses System wurde im Dezember 2010 veröffentlicht (Kreimb 2010). Meine Aufgabe hierbei war die Planung und Durchführung der Etablierung und Validierung der Reporterzellen LC5-RIC hin zu einem Hochdurchsatz-fähigen HIV-Testsystem, sowie die Adaption der Time-of-Addition Methodik für das EASY-HIT System zur näheren Aufklärung der Zielstrukturen von Inhibitoren im HIV Replikationszyklus. Im Anschluss beschreibe ich eine Fallstudie, bei der ich mithilfe des EASY-HIT Systems die anti-HIV Wirkung eines Pflanzenextraktes identifiziert und charakterisiert habe.

##### 3.1.1 Charakterisierung der HIV-Indikator Zelllinie LC5-RIC

###### 3.1.1.1 *Untersuchung der Expression von HIV-Rezeptor und Korezeptoren auf der Zelloberfläche*

Wie bereits erwähnt, wird die Suszeptibilität für eine Infektion humaner Zellen mit HIV durch die Expression der Oberflächenrezeptoren CD4 und CXCR4 bzw. CCR5 gewährleistet. Zum Zwecke der Qualitätssicherung wurde eine regelmäßige Überprüfung der aktuellen Zellkultur auf die Expression dieser Oberflächenrezeptoren eingeführt. Wie in Abbildung 11 dargestellt, ist die Expression der Rezeptoren CD4, CXCR4 bzw. CCR5 in den LC5-RIC und LC5-RIC-R5 Zellen sehr stabil und erreicht auch nach 3 Wochen in Kultur noch immer  $\geq 90\%$ . Diese Stabilität wird durch die Zugabe der Selektionsantibiotika Geneticin (G418) für CD4 und CCR5 bei der Kultivierung und Passagierung der Zellen erreicht.

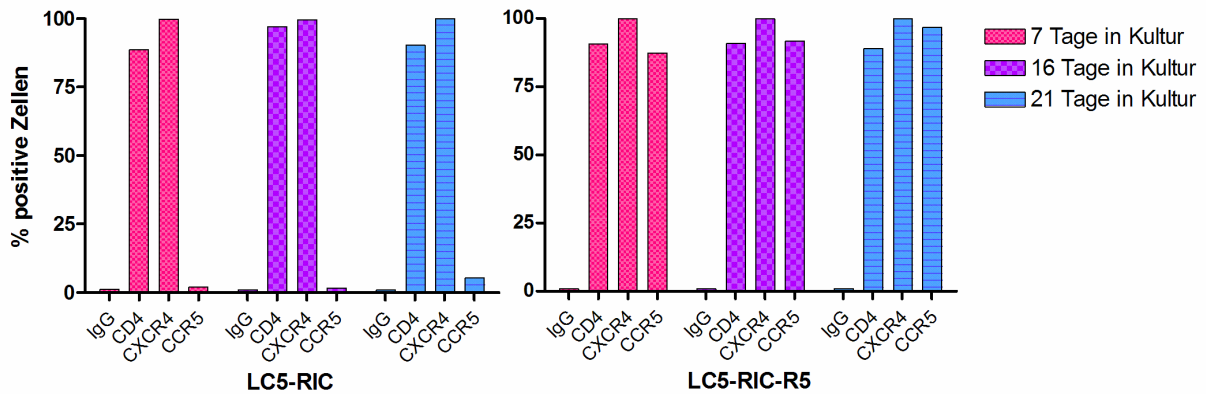


Abbildung 11: Auswertung der Oberflächenrezeptor-Antikörperfärbung der LC5-RIC und LC5-RIC-R5 Zelllinien. Dargestellt sind jeweils die für die verschiedenen Oberflächenrezeptoren CD4-, CXCR4- und CCR5-positiven Zellen relativ zur gesamten, im Durchflusszytometer gemessenen Zellzahl. Links sind die Ergebnisse für die LC5-RIC Zelllinie, rechts die Ergebnisse für die LC5-RIC-R5 Ziellinie aufgetragen. Es wurden Messungen am Tag 7, 16 und 21 nach Auftauen der Zellen durchgeführt. Als Kontrolle diente IgG.

### 3.1.1.2 Expression des DsRed1 Reporterproteins in HIV-infizierten LC5-RIC Zellen

Ein weiterer wichtiger Punkt der zu gewährleisten war, ist die gleichmäßige *DsRed1*-Expression der adhärennten LC5-RIC Zellen. Träte die Infektion bzw. *DsRed1*-Expression beispielsweise in lokalen Clustern auf, würde eine punktuelle Messung mit manchen Geräten zu hohen Standardabweichungen oder gar zu falsch-positiven Ergebnissen (Inhibition wegen fehlender Fluoreszenz) führen, wenn der anregende bzw. emittierende Lichtstrahl eben diese Cluster verfehlen würde. Faktoren wie die eingesetzte Zellzahl sowie die HIV-Suszeptibilität der LC5-RIC Zellen wurden also dahingehend optimiert, ein über die ganze Fläche des entsprechenden Plattenformates gleichmäßig konstantes Signal zu erhalten. Abbildung 12 zeigt, wie gleichmäßig sich das Fluoreszenzsignal (hier etwa 30 Stunden nach HIV-Zugabe) über das gesamte Well einer 96-Well Platte verteilt.

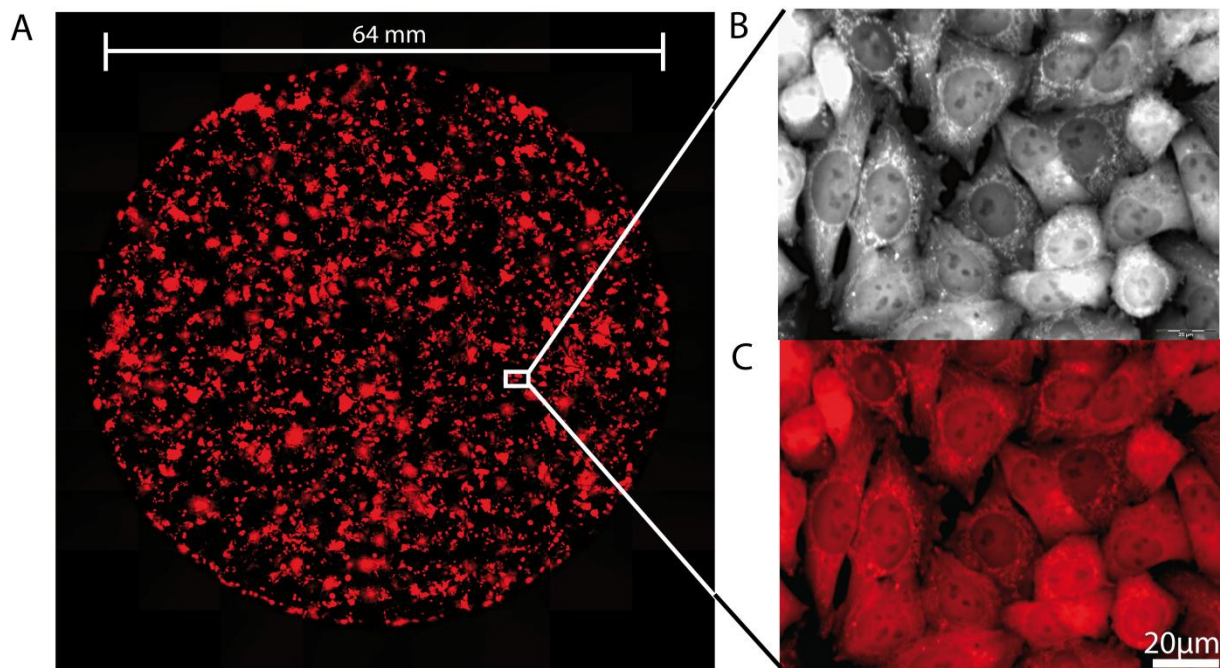


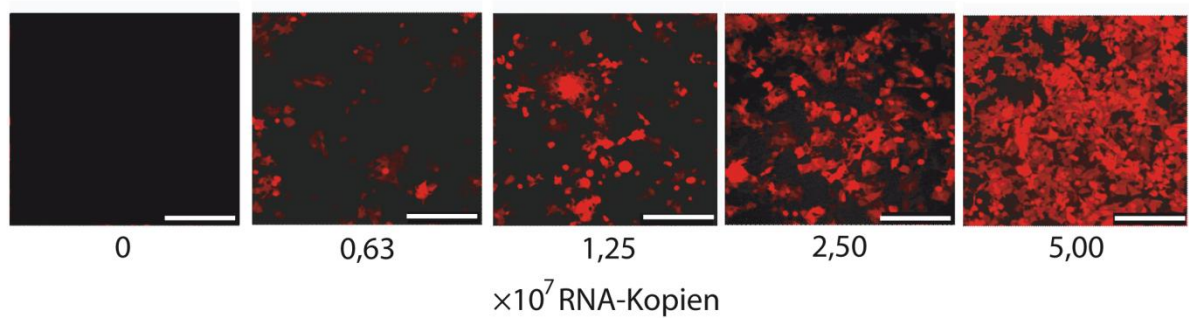
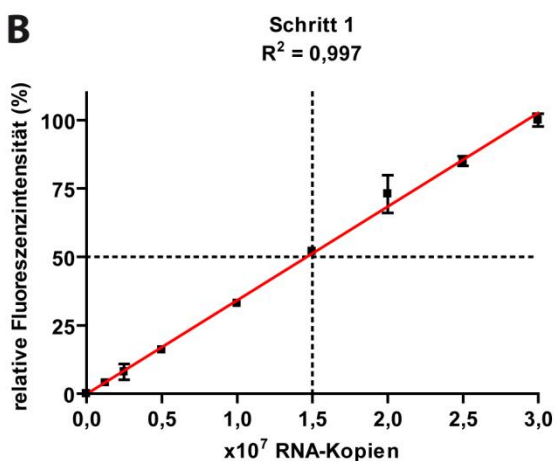
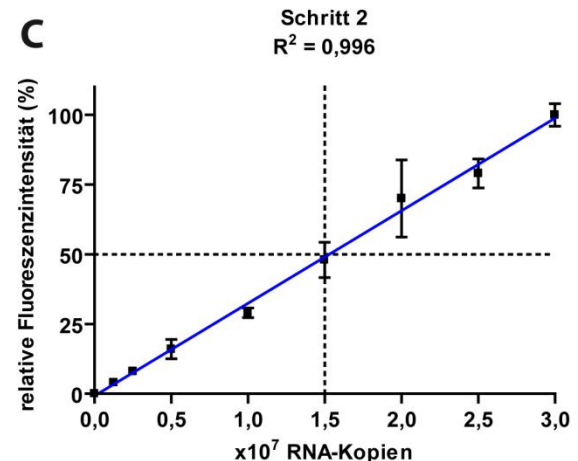
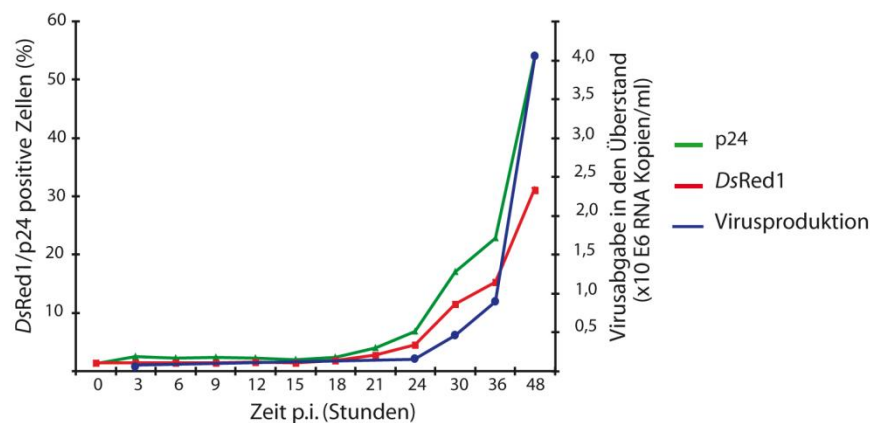
Abbildung 12: Mikroskopische Darstellung infizierter LC5-RIC Zellen. (A) Gesamtaufnahme eines Wells einer 96-Well Platte ca. 30 Stunden nach der Infektion mit 20 µl Virusüberstand aus den persistent infizierten KE37.1<sub>III</sub>B Zellen. (B,C) Nahaufnahme der infizierten Zellen. In A und C pseudokoloriert rot, in B Fluoreszenzkanal schwarz/weiß.

### **3.1.1.3 Qualitative und quantitative Charakterisierung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Infektionsstärke**

Um nun zu testen, welchen quantitativen Einfluss die Menge an Virus ausübt die man zur Infektion einsetzt, wurden lineare Verdünnungen verschiedener Virusmengen von HIV-1<sub>III</sub>B zu den Zellen gegeben und 48 Stunden später eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung durchgeführt. Wie in Abbildung 13A zu sehen, steigt die Anzahl der fluoreszierenden Zellen beziehungsweise die Intensität der Fluoreszenz zusammen mit zunehmender, eingesetzter Virusmenge. Eine Messung der Fluoreszenzintensität eines analog durchgeführten Experiments im Plattenleser bestätigte eine lineare Korrelation der Fluoreszenzintensitäten mit der eingesetzten Virusmenge. Dieser Anstieg ist nicht nur für eine primäre, direkte Infektion der Zellen zu beobachten (Abbildung 13B), sondern spiegelt sich in der Produktion neuer infektiöser Viren wieder. Dies wurde durch den Übertrag des Überstandes der primär infizierten Zellen aus Experiment B auf frische Zellen ermittelt. Deren Fluoreszenz wurde dann weitere 72 Stunden später wiederum gemessen (Abbildung 13C). Um diese Korrelation weiter zu bestätigen, wurden intrazelluläre Parameter der HIV-Infektion (HIV-Gag p24 und DsRed1) sowie die Menge an freigesetztem Virus in den Überstand der HIV-infizierten Zellkulturen (Anzahl von HIV RNA-Kopien) über die Zeit gemessen. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 13D dargestellt und bestätigt die gute Korrelation von Reporterexpression, p24-Bildung und Freisetzung von Virusnachkommenschaft in den Überstand. Zusammengefasst sprechen die Charakteristiken der LC5-RIC Zellen bezüglich

Infizierbarkeit, Reporterexpression und Produktion neuer, infektiöser Viren für eine gute Eignung der Zellen zum direkten Nachweis und Quantifizierung einer Infektion mit HIV-1.

Abbildung 13: (nächste Seite) Untersuchung des quantitativen Zusammenhangs der HIV Infektion mit der Expression von *DsRed1* in den Reporterzellen LC5-RIC. (A) HIV-abhängige Rotfluoreszenz in LC5-RIC Kulturen. LC5-RIC Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät und verschiedenen Mengen Virus ausgesetzt (virale RNA-Kopien angezeigt). Die einzelnen Kulturen wurden 48 Stunden später mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Maßstabsbalken 200  $\mu\text{m}$ ). (B) Lineare Korrelation zwischen Fluoreszenzsignal-Intensitäten infizierter LC5-RIC Zellen und der Menge an eingesetztem Virus. Die Signalintensitäten wurden 48 Stunden nach Infektion der Zellen mit HIV-1<sub>III</sub>B in einer 96-Well Platte mit einem Fluoreszenz Plattenleser gemessen. Alle Werte wurden an den höchsten Werten (höchste Virusmenge = 100%) normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 6 Wells  $\pm$  Standardabweichung. (C) Quantifizierung der Abgabe infektiösen Titers von infizierten LC5-RIC Kulturen. 20  $\mu\text{l}$  des Überstandes der primär infizierten Zellen aus (Abbildung 13B) wurden auf sekundäre Kulturen übertragen und nach 72 Stunden wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Werte wurden analog der primären Platte ausgewertet. (D) Zeitliche Korrelation der Signalintensitäten und Virusproduktion in LC5-RIC Zellen in 6-Well Platten. Die Menge an *DsRed1*- und HIV Gag p24-positiven Zellen wurde diverse Zeitpunkte nach Zugabe des Virus mittels Durchfluss-Zytometrie (FACS) bestimmt. Die Menge an viralen RNAs in den Überständen wurde mittels standardisierter quantitativer RT-PCR bestimmt. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus 3 Replikaten.

**A****B****C****D**

In einem weiteren Experiment zur näheren Charakterisierung der Zelllinie LC5-RIC wurde gezeigt, dass bei weiter steigender, eingesetzter Virusmenge (HIV-1<sub>LAI</sub>) ein Plateau der Fluoreszenzintensität erreicht wird (Abbildung 14, oben). Auch die Vitalität der LC5-RIC Zellen sinkt mit steigender Virusmenge (Abbildung 14, unten). Je nach eingesetztem Virusstamm variiert diese Vitalitätsabnahme. Zum Beispiel zeigte sich der Stamm HIV-1<sub>NL4.3</sub> als aggressiver und zytotoxischer als HIV-1<sub>LAI</sub> (Daten nicht gezeigt), was ihn für etwaige Langzeitversuche eher disqualifizierte. Generell verringert sich die Vitalität infizierter Zellen gegenüber nicht-infizierten um etwa 10-20% (Daten nicht gezeigt). Die Virusmenge für Infektionsexperimente wurde nachfolgend so gewählt, dass sich das Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt der Messung noch in der ansteigenden Phase befand, um etwaige Sättigungs-



oder Aktivierungseffekte zu detektieren und dass die Zellvitalität um nicht mehr als 10% absinkt.

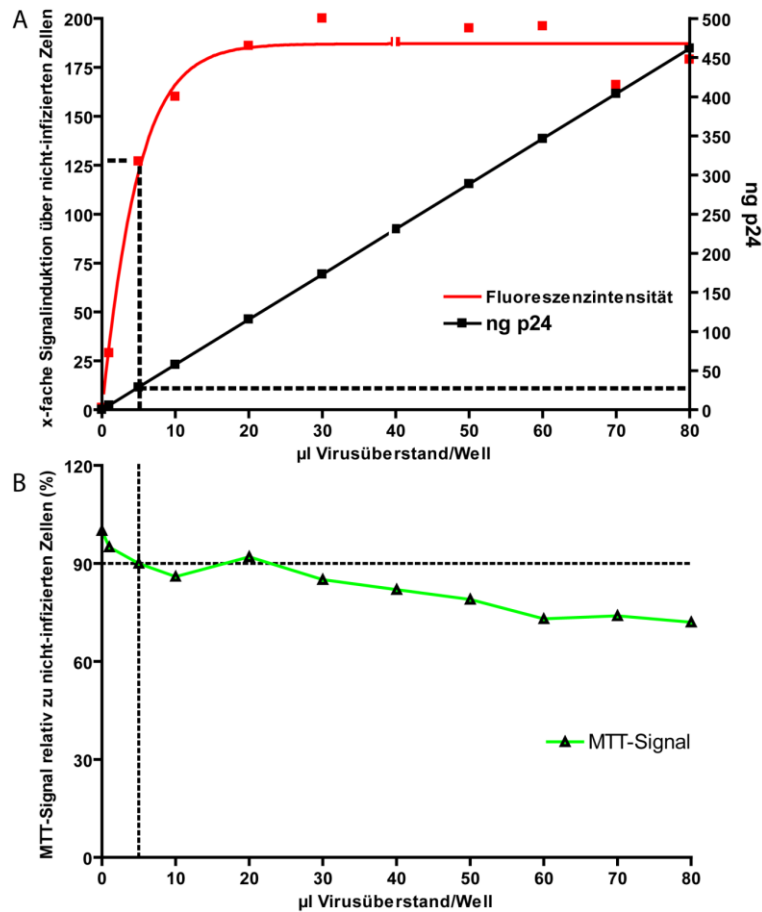


Abbildung 14: Titration einer HIV-1<sub>LAI</sub>Viruspräparation in den LC5-RIC Zellen. Oben: Mit linear steigender Virusmenge (HIV-1<sub>LAI</sub>, schwarze Linie, angegeben in µl Virusüberstand auf der X-Achse und in ng p24 (ermittelt mit p24 ELISA) auf der rechten Y-Achse) steigt die Fluoreszenzintensität (rote Linie) exponentiell an, bis sie ein Plateau erreicht: Unten: Kurz nach dem Erreichen des Fluoreszenzplateaus im oberen Teil nimmt die Vitalität (grüne Linie) der Zellen auf unter 90% bis 70% hin ab. Die gestrichelten Linien (Oben und Unten) zeigen an, welche Virusmenge der vorliegenden Präparation für die folgenden Experimente gewählt wurde (5 µl/Well ≈ 25 pg p24). Alle Datenpunkte entsprechen einem Mittel aus 5 Infektionsansätzen.

In Fluoreszenz-basierten Reporterzellsystemen existiert weit verbreitet das Problem der Hintergrundfluoreszenz. Ausgelöst wird diese meist durch unspezifische, basale Expression der jeweiligen Reporterproteine mangels genügender Restriktion. Um diesen Effekt in unserem System zu untersuchen, wurden infizierte und nicht-infizierte LC5-RIC Zellen mit ihrer parentalen Zelllinie LC5-CD4, welche kein Reporter gen besitzt, verglichen. Das Ergebnis (Abbildung 15) zeigt, dass nicht-infizierte LC5-RIC Zellen eine ähnlich niedrige Rotfluoreszenz erzeugen, wie die Ausgangszelllinie LC5-CD4 ohne Reporter gen. Dagegen lag die gemessene Intensität der infizierten LC5-RIC Zellen hier etwa 100-fach über der von nicht-infizierten Zellen. Dieses Ergebnis belegt, dass die Expression des Reporter gens strikt von der HIV-Infektion abhängt. Da also keine Hintergrundfluoreszenz der LC5-RIC Zellen nachweisbar war, kann das Signal nicht-infizierter Zellen gleich Null gesetzt werden.

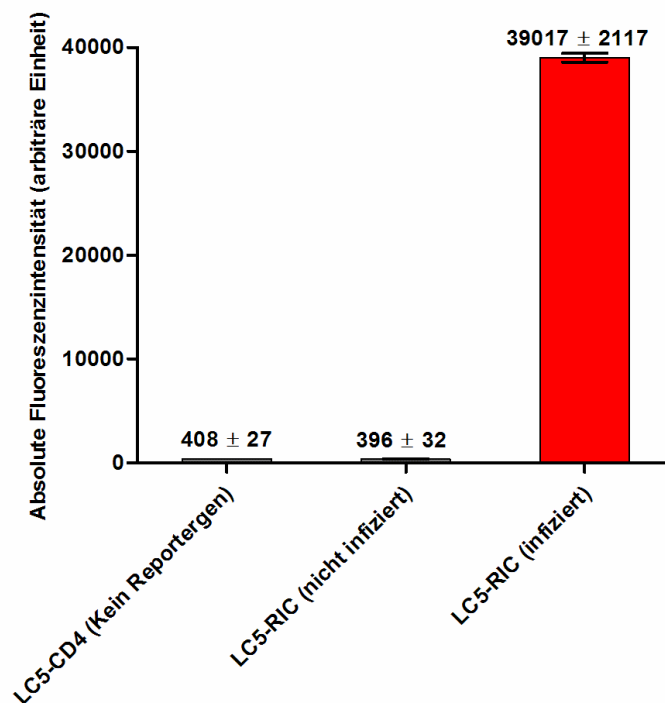


Abbildung 15: Messung der DsRed1 Hintergrund-Expression in den LC5-RIC Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie LC5-CD4 ohne Reporter gen. Es wurden LC5-CD4 in eine und LC5-RIC in zwei 96-Well Platten ausgesät und nach Standardprotokoll infiziert. Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenzintensitäten der gesamten Platten als Mittelwert aus 60 Wells mit Standardabweichung. Das Signal der infizierten LC5-RIC Zellen liegt mit einer Intensität von 39017 etwa 100-fach über der Intensität der nicht-infizierten LC5-RIC Zellen, als auch der reporterlosen LC5-CD4 Zellen.

### 3.1.2 Entwicklung eines Assay-Aufbaus und -Ablaufs zur standardisierten Testung auf anti-HIV Aktivität.

#### 3.1.2.1 Optimierung der Rahmenbedingungen

Alle Daten, die mit einem lebenden, biologischen System wie die LC5-RIC Zellen erhoben werden sind gewissen Varianzen unterworfen. Wesentlich für die Varianzen sind die Handhabung der Zellen und die eingesetzten Hilfsmittel und Materialien. Eine Optimierung der Randbedingungen hielt ich somit unbedingt für nötig.

Um zu testen welche 96-Well Platten sich für das EASY-HIT System am besten eignen, wurden LC5-RIC Zellen in 8 Mikrotiterplatten verschiedener Hersteller und verschiedener Bauart eingesät und mit den gleichen Mengen HIV-1<sub>LAI</sub> infiziert (Abbildung 16).

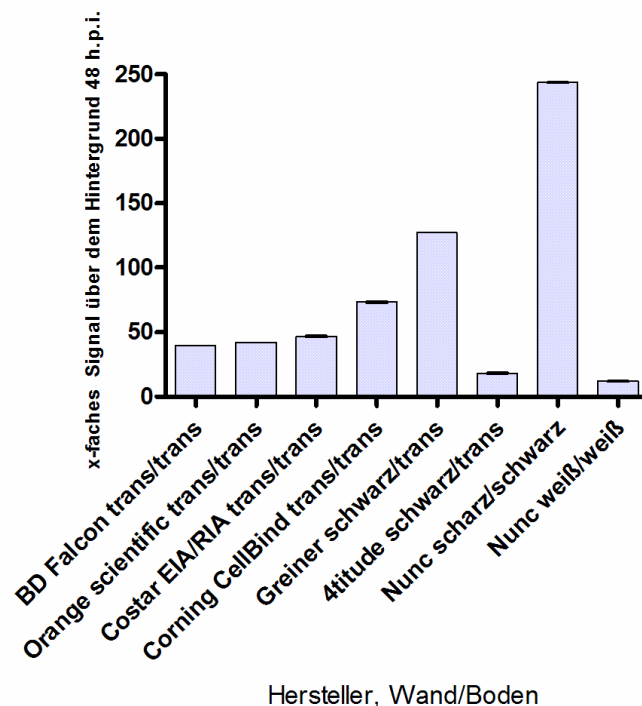


Abbildung 16: Der Vergleich verschiedener 96-Well Platten verschiedener Hersteller. Y-Achse: X-faches Signal über dem Hintergrund (nicht infizierte Zellen). Alle Platten wurden zum gleichen Zeitpunkt mit LC5-RIC Zellen der gleichen Ausgangskultur belegt und mit der gleichen Menge desselben Virusisolates einer Präparation von HIV-1<sub>LAI</sub> infiziert. Die Messung wurde 48 Stunden nach Infektion durchgeführt. (Trans = transparent) Trans/trans, schwarz/trans, schwarz/schwarz und weiß/weiß gibt jeweils die Wand/Boden-Beschaffenheit der Wells an. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte aus den Signalen von 60 Wells.

Nach 48 Stunden produzierten die Zellen in der Platte von Nunc mit schwarzen Wänden und schwarzem Boden (Nunc Schwarz/schwarz) das stärkste Signal mit über 240-facher Induktion gegenüber nicht infizierten Zellen. Allerdings eignen sich diese Platten mit solidem Boden generell nicht für die Durchführung weiterer, Optik-basierter Untersuchungen mit inversen Mikroskopen. Auch Tests wie der absorptionsabhängige MTT-Test zur Bestimmung

der Zellvitalität bei dem ein transparenter Boden benötigt wird können nicht durchgeführt werden. Bei den Platten mit transparentem Boden erzielten die Zellen in der Platte von Greiner BioOne mit schwarzen Wänden (Greiner schwarz/trans) mit etwa 130-facher Signalinduktion über dem Hintergrund das beste Ergebnis. Von den volltransparenten Platten stellte sich nur die Platte Corning Cellbind von Costar als geeignet heraus, wenn auch mit 73-facher Induktion noch deutlich unter dem Ergebnis mit den Greiner-Platten.

Nun sollte der geeignetste Zeitpunkt für die Messung der Fluoreszenz nach der Infektion (hours post infection; h.p.i.) bestimmt werden. Dazu wurden LC5-RIC Zellen in eine Mikrotiterplatte (96-Loch) ausgesät und mit der in Abbildung 14 bestimmten Menge HIV-1<sub>LAI</sub> infiziert. Die Fluoreszenzintensität wurde zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72, 96, 120 und 168 h.p.i. gemessen (Abbildung 17). 24 Stunden h.p.i. konnte nur eine 2-fache Induktion des Signals über dem Hintergrund gemessen werden. 48 Stunden h.p.i. lag das Signal bereits 222-fach über dem der nicht-infizierten Zellen. Diese 111-fache Zunahme des Signals innerhalb von 24 Stunden wurde bei den späteren nachfolgenden Zeitpunkten nicht mehr erreicht. Zusammen mit der Tatsache, dass sich 48 Stunden nach Infektion bereits genügend neu produziertes Virus im Überstand befand um eine weitere Zellpopulation zu infizieren (siehe Abbildung 13C und D) stellt 48 h.p.i. somit einen geeigneten Zeitpunkt zur Messung dar.

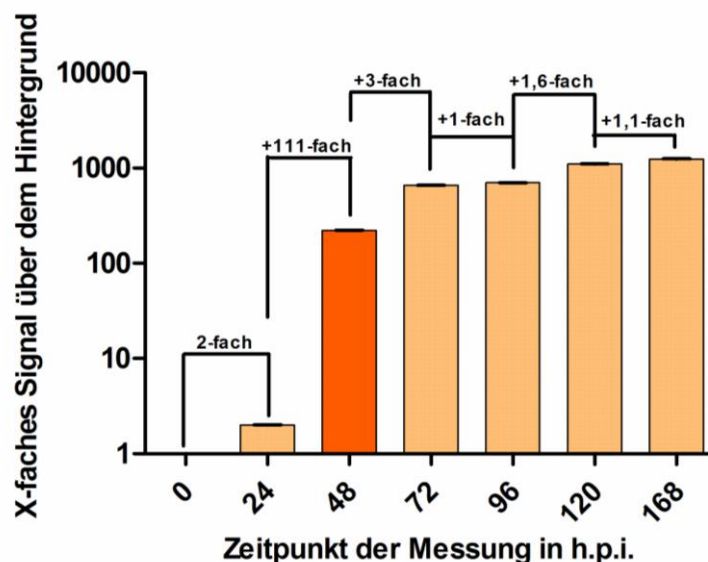


Abbildung 17: Festlegung des geeigneten Zeitpunktes zur Messung der Fluoreszenz nach der Infektion. LC5-RIC Zellen in einer Platte wurden infiziert und nach 24, 48, 72, 96, 120 und 168 Stunden gemessen. Auf der y-Achse ist die x-fache Signalintensität über dem Hintergrund (nicht infizierte Zellen) angegeben, auf der x-Achse die Zeitpunkte der Messung in Stunden nach der Infektion (h.p.i.). Zusätzlich sind die jeweiligen Zunahmen des Signals gegenüber des vorherigen Wertes als +x-fach angegeben. Die dargestellten Daten der x-fachen Induktion des Signals über dem Hintergrund sind Mittelwerte aus je 60 Wells mit Standardabweichungen (im Verhältnis so klein, dass sie nicht zu sehen sind).

### 3.1.2.2 Validierung nach statistischen Parametern zur Assay-Entwicklung

Um die Robustheit und Verlässlichkeit des Testsystems nach allgemeingültigen Kriterien in der Wirkstoffforschung zu verifizieren, wurde eine Validierung des EASY-HIT Systems nach den Richtlinien des *National Institutes of Health Chemical Genomics Centers* (NCGC) durchgeführt und ausgewertet (siehe 2.2.4). Die Ergebnisse dieser Validierung sind in Tabelle 4 dargestellt. CV-Werte (Koeffizient der Variation, „Coefficient of Variation“) dienen der Bestimmung der Zuverlässigkeit eines Signals bezüglich dessen Varianz der Standardabweichung (Stabw) innerhalb eines Experimentes, sowie in zeitlich getrennten Replikaten. Die hierbei beachteten Faktoren sind maximale, mittlere und niedrigste Signalintensität und Anzahl der Datenpunkte (n) eines Triplikat-Experimentes, das zusätzlich mindestens an 3 verschiedenen Tagen wiederholt wird. Der Z'-Faktor dient hierbei der Beurteilung der Signalqualität und -dynamik in Abhängigkeit von Signalintensität des höchsten und niedrigsten Signals, Standardabweichung und Anzahl der Datenpunkte. Signal zu Hintergrund (S/B) und der Signalebereich (Signal-Window; SW) geben Aufschluss über die maximal messbare, generelle Induzierbarkeit des Signals und somit über den Bereich, innerhalb dessen zum Beispiel Dosis-Abhängigkeiten beobachtet werden können. Zusätzlich wurde untersucht, ob die bei Zellsystemen häufig beobachteten „Drift- und Edge“-Effekte auftreten, bei denen entweder ein Signal zum Beispiel in den äußersten Wells signifikant über oder unter dem mittleren Signal der inneren Kavitäten liegt (Edge) oder die Intensität zum Beispiel von links nach rechts auf einer Platte zu- oder abnimmt (Drift). Solche Effekte können jedoch durch die analoge Befüllung der Rand-Wells mit der gleichen Menge Medium oder Lösungsmittel eliminiert werden.

Tabelle 4: Validierung der Eignung des LC5-RIC Systems für die Testung von anti-HIV Wirkstoffen nach den Richtlinien des NCGC. CV, Koeffizient der Variation; SW, Signal-Fenster; S/B, Signal zu Hintergrund. Max = maximales Signal (Zellen infiziert, nicht mit Inhibitor behandelt), Mitt = mittleres Signal (Zellen behandelt mit 100 nM AZT, etwa 37% Infektion), Min = minimales Signal (Zellen nicht infiziert). Die dargestellten Werte für jedes Experiment (Expt 1 – 3) stellen jeweils Mittelwerte von 60 Wells  $\pm$  Standardabweichung aus je 3 Platten dar. Jedes Experiment wurde an einem anderen Tag durchgeführt. Zusätzlich sind die analog berechneten Daten für den Screen der LOPAC<sup>1280</sup> Substanzbibliothek dargestellt, der in Kapitel 3.1.2.3 beschrieben wird. Dort wurden für jeden Schritt 48 96-Well Platten benützt. NB, nicht bestimmt.

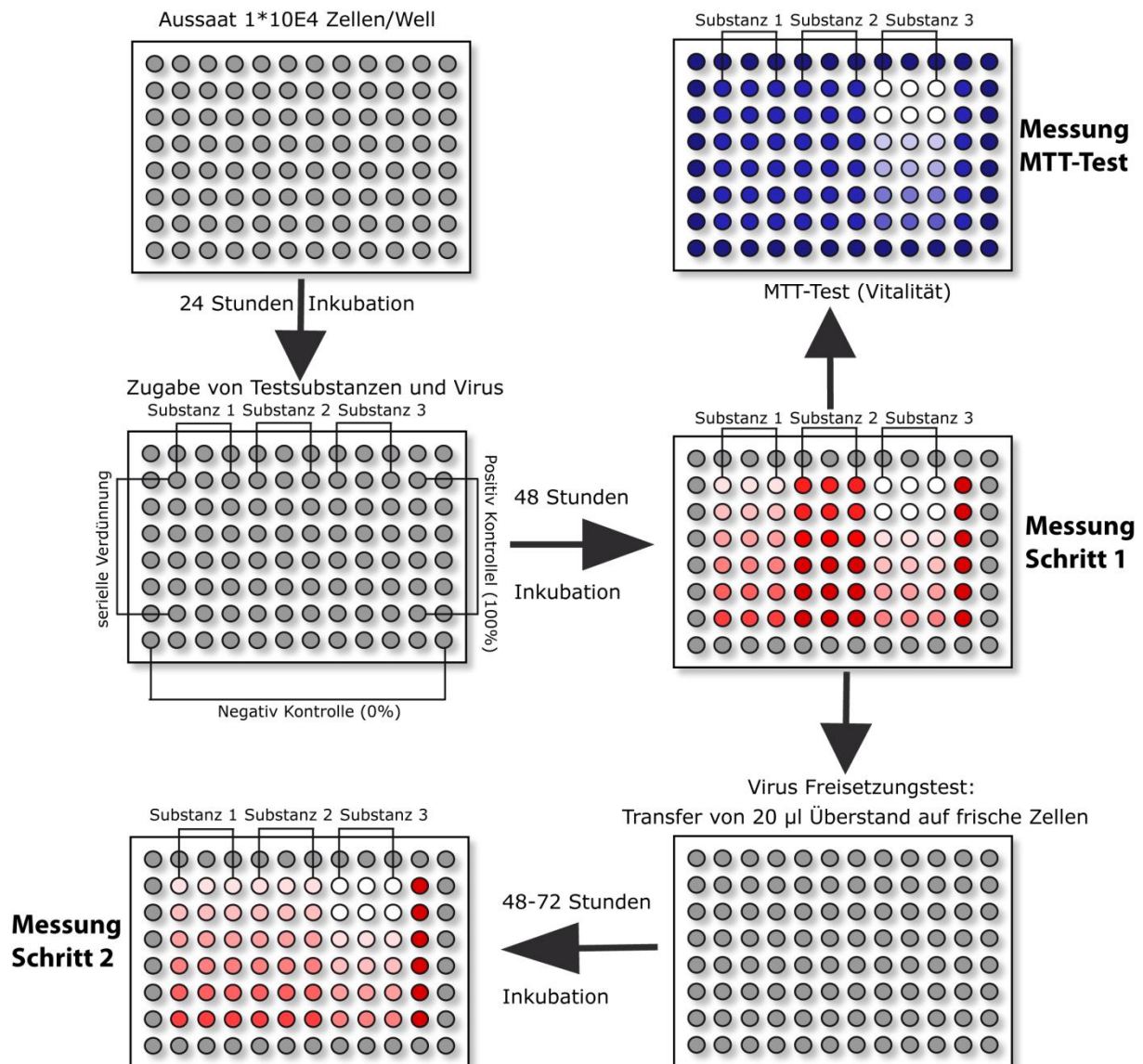
Assay Parameter	Validations-Experimente				LOPAC <sup>1280</sup> Bibliothek Screen		NCGC Akzeptanz-Kriterium
	Expt 1	Expt 2	Expt 3	MW	Schritt 1	Schritt 2	
<b>CV Max (%)</b>	0.88 $\pm$ 0.12	1.09 $\pm$ 0.30	1.12 $\pm$ 0.15	<b>1.03 <math>\pm</math> 0.21</b>	2.07 $\pm$ 0.59	2.06 $\pm$ 0.60	
<b>CV Mitt (%)</b>	1.84 $\pm$ 0.30	1.68 $\pm$ 0.20	1.23 $\pm$ 0.15	<b>1.59 <math>\pm</math> 0.34</b>	NB	NB	<b><math>\leq 20</math> (%)</b>
<b>CV Min (%)</b>	1.84 $\pm$ 0.25	1.88 $\pm$ 0.25	1.61 $\pm$ 0.37	<b>1.78 <math>\pm</math> 0.29</b>	11.85 $\pm$ 4.01	6.00 $\pm$ 1.84	
<b>Z'</b>	0.97 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.00	<b>0.97 <math>\pm</math> 0.01</b>	0.94 $\pm$ 0.02	0.94 $\pm$ 0.02	<b><math>\geq 0.4</math></b>
<b>SW</b>	105 $\pm$ 7.56	86.13 $\pm$ 18.61	90.83 $\pm$ 7.08	<b>93.99 <math>\pm</math> 13.63</b>	49 $\pm$ 17	50 $\pm$ 17	<b><math>\geq 2</math></b>
<b>S/B (x-fach)</b>	95 $\pm$ 3	62 $\pm$ 6	57 $\pm$ 4	<b>71 <math>\pm</math> 19</b>	157 $\pm$ 24	330 $\pm$ 33	-

Wie in Tabelle 4 gezeigt, lagen alle errechneten Werte weit über den Akzeptanzkriterien des NCGC für ein Screening-geeignetes Assay. Die mittleren CV-Werte für Max, Mitt und Min aus drei Tagen lagen zwischen 1,03 und 1,78% (Sollwert  $\leq 20\%$ ). Das bedeutet, dass die Standardabweichungen verschiedener, gemittelter Signalintensitäten von gleichzeitig sowie von zeitlich getrennt durchgeführten Replikaten keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses zeigen. Der mittlere  $Z'$ -Wert für alle Platten und Experimente ( $n=9$ ) lag bei  $0,97 \pm 0,01$  (Sollwert  $\geq 0,4$ ; der maximal erreichbare  $Z'$ -Wert liegt bei 1,0). Das Signalfenster (SW) betrug zwischen 86,13 und 105 bei einem Sollwert von  $\geq 2$ , das Verhältnis von Signal zu Hintergrund (S/B) zwischen 57 und 95. Zusammengefasst belegen diese Parameter die Zuverlässigkeit und hervorragende Eignung der LC5-RIC Zellen zur HIV-Inhibitor Suche.

Unter Berücksichtigung aller oben genannter Fakten ergibt sich die in Abbildung 18 dargestellte Standard Anordnung für den EASY-HIT Test (EASY-HIT, an **Exploratory Assay SY**stem for the discovery of **HIV Inhibi**Tors).

LC5-RIC Zellen werden 24 Stunden nach Einsaat in Mikrotiterplatten für 48 Stunden mit Testsubstanzen und Viruspräparationen inkubiert. Die Effekte der Testsubstanzen auf die Infektion werden in zwei Schritten bestimmt. Im ersten Schritt wird der Einfluss der Testsubstanzen auf die Expression des HIV-Reportergens bestimmt, indem das rote Fluoreszenzsignal der behandelten Zellen gemessen wird. Im zweiten Schritt wird der Einfluss der Testsubstanzen auf die Produktion von infektiösem Virus bestimmt. Hierzu werden Aliquots (20  $\mu$ l) des Überstandes der behandelten Zellen auf frische LC5-RIC Zellen übertragen und 72 Stunden später die Fluoreszenzsignale gemessen. Der Einfluss der Testsubstanzen auf die Vitalität der primär infizierten Zellen (Schritt 1) wird mit dem MTT-Test bestimmt. Dies dient einerseits der Feststellung der Feststellung einer eventuell vorhandenen letalen Dosis, andererseits der Eliminierung falsch positiver Ergebnisse.

Abbildung 18: (nächste Seite) Die Standard Anordnung des EASY-HIT Tests. Graue Kreise symbolisieren Wells in denen sich LC5-RIC ohne HIV befinden. Rote Kreise stellen die Rotfluoreszenz infizierter LC5-RIC Zellen dar. Je Intensiver die Infektion, desto dunkler das Rot. Blaue Kreise indizieren gelöstes MTT-Formazan nach Lyse der Zellen. Je dunkler das Blau, desto vitaler sind die Zellen. Im ersten Schritt wird die Wirkung von Testsubstanzen auf die primäre Infektion der LC5-RIC Zellen bestimmt. 24 Stunden nach Aussaat von  $1 \cdot 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l pro Well wird das Medium abgenommen und mit verschiedenen Verdünnungen der zu testenden Substanzen ersetzt. Danach werden 20  $\mu$ l Viruslösung hinzu pipettiert und nach 48 Stunden Inkubation das Medium entfernt und das rote Fluoreszenzsignal von jeder Zellkultur gemessen. Im zweiten Schritt wird die Menge an infektiösem Virus im Zellkulturüberstand der primär behandelten Zellen bestimmt. Dazu werden 20  $\mu$ l des Überstandes der primär behandelten Zellen auf frische Zellen gegeben (Schritt 2). Nach weiteren 72 Stunden wird das Medium der Platte „Schritt 2“ abgenommen und wieder eine Messung durchgeführt. Zur Bestimmung der Vitalität der primär behandelten Zellen wird MTT-Färbelösung, gelöst in Medium zu den Zellen gegeben und die Platte für weitere 2 Stunden inkubiert. Nach der Abnahme der Färbelösung werden 100  $\mu$ l Lyselösung zu den Zellen gegeben und die Absorption des dadurch freigesetzten, blau-violetten Formazans gemessen.



Die Ergebnisse aus Schritt 1 und 2 korrelieren bei Inhibition der HIV-Replikation in deren früher Phase also Eintritt (Eintritt), Reverse Transkription (RT), Integration (IN) und Transkription. Inhibitoren, die erst in der späten Phase des HIV-Replikationszyklus wirken (z.B. Protease) zeigen in erster Linie in Schritt 2 eine Reduktion der Fluoreszenz. Um diesen Effekt der Unterscheidung zwischen Inhibitoren der frühen und späten Phase zu veranschaulichen ist ein Experiment nach oben beschriebener Anordnung für einige bekannte Referenzinhibitoren exemplarisch durchgeführt worden und die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

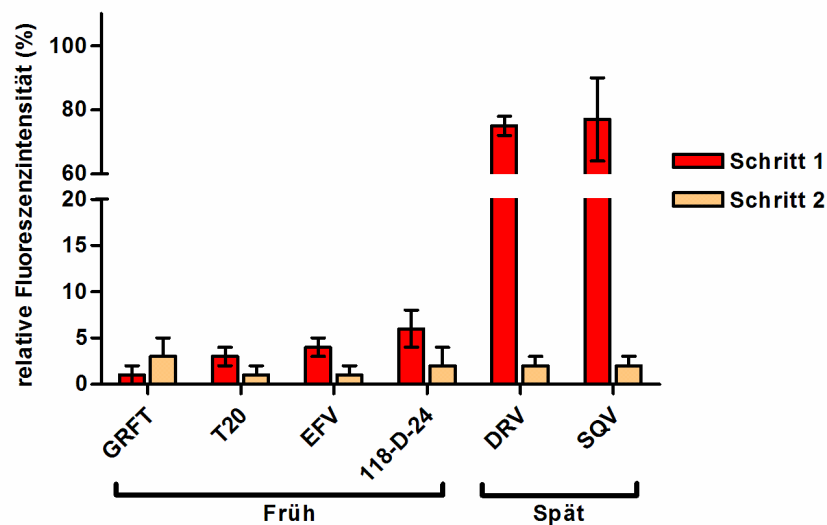


Abbildung 19: Unterscheidung von HIV Inhibitoren die in der frühen, bzw. späten Phase der HIV Replikation wirken durch ihre Effekte auf die Fluoreszenzsignale im ersten und zweiten Schritt des EASY-HIT Tests. Dargestellt sind die im EASY-HIT System beobachteten Effekte verschiedener HIV-Inhibitoren, die entweder in der frühen Phase (Eintritt, Reverse Transkription und Integration) oder der späten Phase (Reifung) der HIV-Replikation wirken. Alle Ergebnisse sind ein Mittel aus jeweils 3 Replikaten mit Standardabweichungen.

Mit diesem Test-Aufbau wurden nun zur weiteren Validierung die  $IC_{50}$ -Werte (Konzentration eines Stoffes, bei dem 50% Inhibition der Infektion eintritt) von mehreren Referenzinhibitoren bestimmt. Dabei handelt es sich sowohl um zugelassene HIV-Medikamente, als auch experimentelle Substanzen. Inhibitoren der frühen HIV Replikationsphase waren der experimentelle Anlagerungsinhibitor Griffithsin (GRFT; ein Algenlektin), der zugelassene Fusionsinhibitor T-20 (Peptid; abgeleitet vom HIV-1 Glykoprotein gp41), die Inhibitoren der reversen Transkriptase (RT) Azidothymidin (AZT; Nukleosidischer RT-Inhibitor; NRTI) und Efavirenz (EFV; Nicht-Nukleosidischer RT-Inhibitor; NNRTI), Raltegravir (RAL; zugelassener Integrase Inhibitor) und 118-D-24 (experimenteller Integrase Inhibitor) und Flavopiridol (FLV; Transkriptioninhibitor; Kinaseinhibitor) ausgewählt. Für die späte Phase wurden der peptidische Proteaseinhibitor (pPi) Saquinavir (SQV) und der nicht-peptidische Pi Darunavir (DRV) gewählt. Die Wirkung dieser Substanzen wurde mit Experimenten mit verschiedenen Virusisolaten (HIV-1<sub>III</sub>B aus der persistent infizierten Zelllinie KE37.1-IIIIB und einem primären, klinischen HIV-Isolat) nach dem oben beschriebenen Testverfahren untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die gute Korrelation der im EASY-HIT System ermittelten Werte mit publizierten Werten für T-Zellen (PBMC, humane T-Zell Linien) ist ein weiterer Beweis für die hervorragende Eignung des EASY-HIT Systems zur Wirkstoffforschung und zur Evaluation von Inhibitoren, die die verschiedenen Schritte im HIV-Replikationszyklus hemmen.



Tabelle 5: Antivirale Aktivitäten bekannter HIV Inhibitoren verschiedener Klassen im EASY-HIT System. CEM-SS, humane T4-lymphoblastoide Zelllinie; MT-4/2, humane T-Zell Leukämie Zelllinien; PM-1, humane T-Zell Lymphom Zelllinie. Die dargestellten Werte für die im EASY-HIT System ermittelten IC<sub>50</sub>-Konzentrationen sind jeweils Mittelwerte aus 3 Experimenten. \*Die Werte für 118-D-24 sind in µM angegeben. NB, nicht bestimmt. <sub>1</sub>(Mori 2005), <sub>2</sub>(Ketas et al. 2003), <sub>3</sub>(Nakata et al. 2007), <sub>4</sub>(Hazan et al. 2005), <sub>5</sub>(Bar-Magen et al. 2009), <sub>6</sub>(Svarovskaia et al. 2004), <sub>7</sub>(Heredia et al. 2005), <sub>8</sub>(Nakata 2007), <sub>9</sub>(Koh et al. 2003).

Phase	Klasse	Wirkstoff	EASY-HIT			
			HIV-1 <sub>III B</sub>	Primäres HIV-Isolat	Publizierte Werte	
			IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)	Zelllinie
Früh	Eintritts Inhibitor	GRFT	0.15 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.043 - 0.63	CEM-SS; PBMC <sub>1</sub>
	Eintritts Inhibitor	T20	4.58 ± 0.46	14.70 ± 2.34	0.4 – 190	PBMC <sub>2</sub>
	NRTI	AZT	146.00 ± 22.00	NB.	15 - 390	PBMC <sub>3</sub>
	NNRTI	EFV	0.08 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.8 - 1.4	MT-4 <sub>4</sub>
	Integration	RAL	134.00 ± 72.80	NB	1.2 – 24	PBMC <sub>5</sub>
	Integration	118-D-24*	4.37 ± 1.15	5.04 ± 0.5	7	CEM-SS <sub>6</sub>
	Transkription	FLV	17.17 ± 1.63	NB	< 12	PM-1 <sub>7</sub>
Spät	PI	SQV	2.96 ± 0.10	2.79 ± 0.27	8.0 - 220	PBMC <sub>8</sub>
	PI	DRV	3.54 ± 0.10	NB	3 <sup>o</sup>	MT-2 <sub>9</sub>

### 3.1.2.3 Validierung des EASY-HIT Systems für das Screening von größeren Substanzbibliotheken

Um nun zu Überprüfen, ob sich EASY-HIT auch zum Screen von Bibliotheken kleiner Einzelsubstanzen (sogenannten. „small-molecules“ mit einem Molekulargewicht < ~ 800) eignet, wurde die LOPAC<sup>1280</sup> Bibliothek von Sigma-Aldrich Deutschland mit 1280 pharmakologisch aktiven Substanzen ausgewählt.

Alle Substanzen wurden im dreifach-Ansatz bei einer einheitlichen Konzentration von 10 µM auf anti-HIV Aktivität getestet. Die statistischen Parameter Z', CV, SW und S/B dieses Screens (Testung einer größeren Menge Substanzen bei einer einheitlichen Konzentration) sind in Tabelle 4 gezeigt. Zur Auswertung wurden nur die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung des zweiten Schrittes benutzt, da man davon ausgehen kann, dass jegliche Inhibition der HIV-Replikation grundsätzlich zur Verminderung der Menge an freigesetztem Virus führt. In Abbildung 20 wurde für jede Substanz die relative Fluoreszenzintensität (Infektion) gegen das relative Signal des MTT-Tests (Vitalität) der primären Platten aufgetragen. Die Ausschlusskriterien für die Identifikation aktiver Substanzen (Cut-Off) lag bei einer Infektion (Fluoreszenzintensität) ≤ 26% (≤ 3\* Standardabweichung aller HIV-exponierten Zellen nach (Jones et al.)) im Vergleich zu HIV-infizierten, unbehandelten Zellen (100%) und bei einer gleichzeitigen Vitalität der Zellen von > 90%. Dies ist der von mir festgelegte Wert für eine Reduktion der Vitalität, bei der der

Einfluss etwaiger toxischer Effekte auf die infektionsabhängige Fluoreszenz vernachlässigbar ist, da ein solcher Effekt alleine keine Reduktion der Fluoreszenz auf  $\leq 26\%$  bewirken würde. 10 Substanzen erfüllten diese Kriterien. Drei dieser Substanzen entpuppten sich als die bereits zugelassenen HIV-1 RT-Inhibitoren AZT, Stavudin (d4T) und Zalcitabin (ddC). 5 weitere Substanzen waren bereits in der NIAID *Division for AIDS HIV/OI/Therapeutics* Datenbank (<http://chemdb.niaid.nih.gov>) als aktiv gegen HIV gelistet. 2 Substanzen waren bis dato noch nicht als HIV Inhibitoren beschrieben worden. Somit ergibt sich für diesen Screen eine Hit-Rate von 0,16% wenn man nur die 2 neu gefundenen Inhibitoren berücksichtigt. Diese Ergebnisse belegen die exzellente Eignung des EASY-HIT zum Screen größerer Substanzbibliotheken.

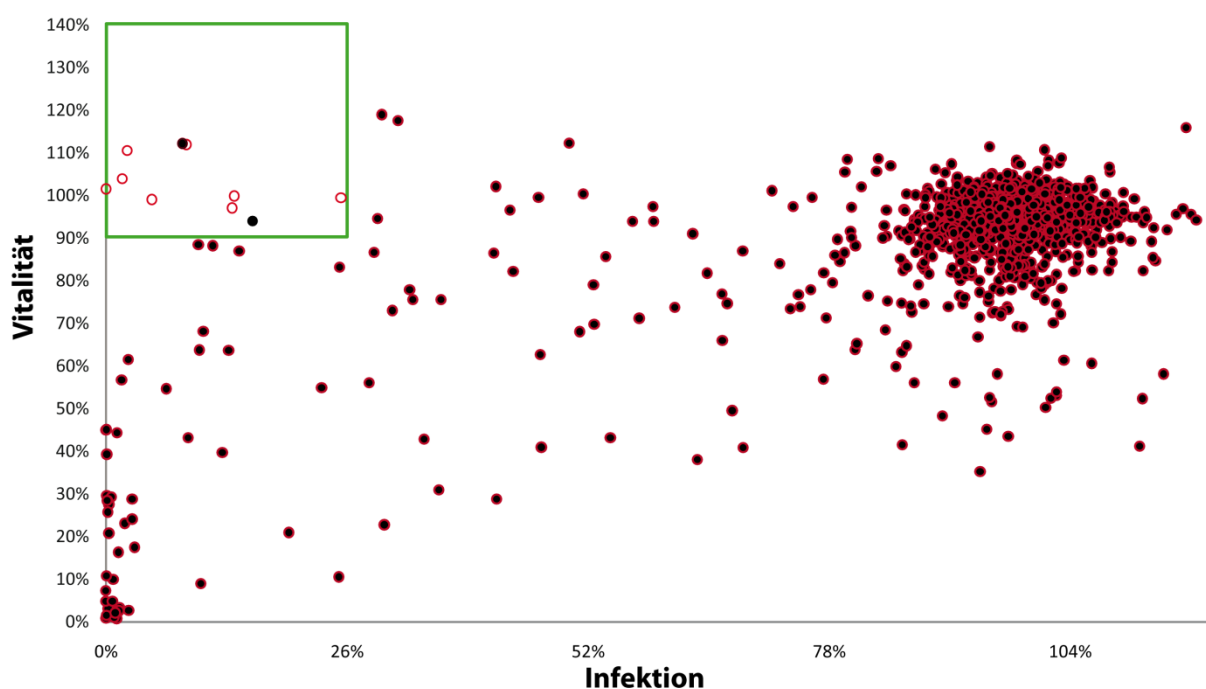


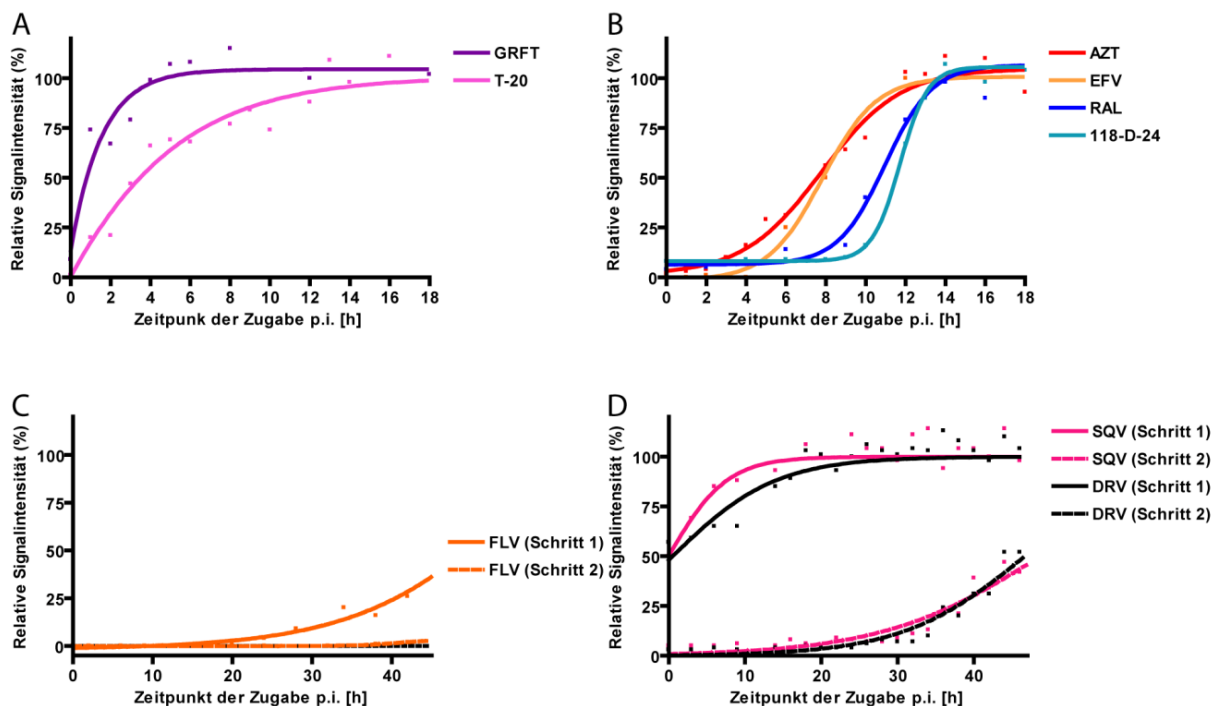
Abbildung 20: Ergebnis des Screens der LOPAC<sup>1280</sup> Bibliothek mit 1280 pharmakologisch aktiven Substanzen im EASY-HIT System. Durchgeführt wurde der Screen im 3-fach Ansatz. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse des Schrittes 2 (Infektion, X-Achse) gegen die Vitalität der Zellen (Y-Achse), jeweils als Mittelwert aus 3 Replikaten. Die Konzentration jeder Substanz betrug 10  $\mu\text{M}$ . Das grüne Viereck markiert die Substanzen, die die gewählten Kriterien für inhibitorische Aktivität erfüllen ( $\leq 26\%$  Infektion und  $\geq 90\%$  Vitalität in Schritt 1)

### 3.1.3 Das „Time-Of-Addition Assay“ zur Einordnung der Wirkungsweise neuer anti-HIV aktiver Substanzen in den HIV-Replikationszyklus

Um nun nicht nur eine Unterscheidung zwischen früher und später Phase des HIV-Replikationszyklus treffen zu können sondern auch einzelne Schritte innerhalb dieser Phasen identifizieren zu können entwickelte ich ein sogenanntes „Time-Of-Addition Assay“ (TOA) für das EASY-HIT System.

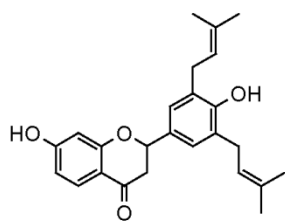
Hierzu werden verschieden wirkende Referenzinhibitoren an bestimmten Zeitpunkten (z.B. stündlich) nach der Infektion in total-inhibierender Konzentration (mindestens 2-3-mal  $IC_{50}$ , sofern die Toxizität dies zulässt) zu den Zellen gegeben. Ist nun - zumindest im EASY-HIT System - zum Beispiel der virale Eintritt in die Zelle etwa 5 Stunden nach der Virus-Zugabe bereits teilweise oder vollständig abgeschlossen, würde die Zugabe eines Eintritt-Inhibitors zu diesem Zeitpunkt eine stark abgeschwächte oder gar keine Wirkung mehr zeigen. Somit ergibt sich für jede Inhibitor-Klasse ein spezifisches TOA-Profil mit eigenen Aktivitäts-Zeitfenstern, innerhalb welcher der entsprechende Prozess inhibiert werden kann. Auch Zeitpunkte analog den  $IC_{50}$ -Werten können für diese Art des Assays ermittelt werden bei denen die Inhibition wegen vorangeschrittenen Replikationsschritten nur 50% Inhibition erreichen kann (Abbildung 24). Abbildung 21 zeigt die Profile der verschiedenen Klassen von Referenz-Inhibitoren. Das TOA-Profil eines neuen Inhibitor-Kandidaten kann nun mit den Profilen der bekannten Inhibitoren verglichen werden, um Rückschlüsse auf seine Zielstruktur ziehen zu können.

Abbildung 21 (nächste Seite): Bestimmung sequenzieller Stadien der HIV Replikation durch einem *Time-Of-Addition* (Zeitpunkt der Zugabe; TOA) Assay mit HIV Inhibitoren bekannter Zielstrukturen. HIV Inhibitoren die den Eintritt in die Zielzellen (A), die Reverse Transkription und Integration in das Wirtsgenom (B), die Transkription (C) und die Reifung neuer infektiöser Partikel inhibieren, wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion (0 h.p.i.) den Zellen zugegeben (Konzentration  $\geq 2 \cdot IC_{50}$ ). Nach 48 Stunden wurden alle Platten gemessen. Für die in C und D dargestellten Ergebnisse wurde die Messung im Schritt 2 durchgeführt (gestrichelte Linien). Jeder Punkt entspricht einem Mittel aus mindestens 3 Werten. Die  $R^2$ -Werte (Güte des Fits; max. 1; intern festgelegter Wert  $\geq 0,9$ ) für jeden Kurven-Fit betragen  $\geq 0,95$ .

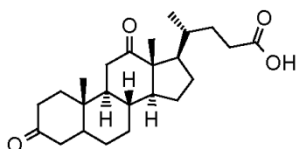


### 3.1.4 Identifikation neuer Substanzen mit anti-HIV Aktivität mithilfe des EASY-HIT Systems

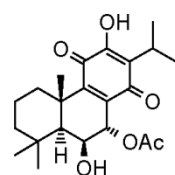
Mit Hilfe des EASY-HIT Systems konnten in einer ersten Anwendung aus einer 400 Substanzen umfassenden Naturstoffsammlung der Firma SPECS (Niederlande) 3 Substanzen identifiziert werden, die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht als HIV Inhibitoren beschrieben waren (Abbildung 22). Das Flavonoid Abyssinon IV zeigte Wirkung in Schritt 1, also der frühen Phase der HIV-Replikation mit einem  $IC_{50} = 2,3 \mu M$ , das Gallsäurederivat 3,12-Dioxocholansäure (3,12-DCA) zeigte unterschiedliche Wirkung in Schritt 1 und 2 mit einem  $IC_{50} = 2,3 \mu M$  (Schritt 2). Der  $IC_{50}$  von 3,12-DCA in Schritt 1 war nicht zu berechnen, da keine Totale Inhibition der Infektion zu beobachten war. Das Diterpen 7 $\alpha$ -Acetoxy-6 $\beta$ -Hydroxyroyleanon (ROY) zeigte seine Wirkung erst in Schritt 2 mit einem  $IC_{50} = 2 \mu M$ .



Abyssinon IV; Flavonoid  
 $IC_{50} = 2,3 \mu\text{M}$  (Schritt 1)



3,12-Dioxocholansäure; Gallsäurederivat  
 $IC_{50} = 1,8 \mu\text{M}$  (Schritt 2)



7a-Acetoxy-6b-Hydroxyroyleanon; Diterpen  
 $IC_{50} = 2 \mu\text{M}$  (Schritt 2)

Abbildung 22: 3 Substanzen mit bis dato unbekannter anti-HIV Aktivität aus einer 400 Substanzen umfassenden Naturstoffsammlung (Specs, Niederlande).  $IC_{50}$ -Bestimmungen wurden nach dem Standard Assay-Setup durchgeführt.

Abyssinon IV und 3,12-DCA zeigten gegenüber ROY eine stärkere Inhibition in Schritt 1 was nahelegt, dass diese zwei Substanzen Schritte in der frühen Phase des HIV-Replikationszyklus inhibieren, während ROY einen späten Prozess in der Reifung neuer infektiöser Partikel zu inhibieren scheint. Um dieses Verhalten näher zu charakterisieren wurde ein TOA-Profil für jedes Molekül erstellt (Abbildung 23). Abyssinon IV zeigte hierbei ein TOA-Profil, welches zeitlich zwischen reverser Transkription und Integration liegt. 3,12-DCA zeigt weder für Schritt 1 noch für Schritt 2 ein Profil, das mit einem der bekannten, flankierenden Inhibitoren der Integration und Reifung übereinstimmt. Das Profil von ROY zeigte sich praktisch deckungsgleich mit dem Profil des Proteaseinhibitors Darunavir.

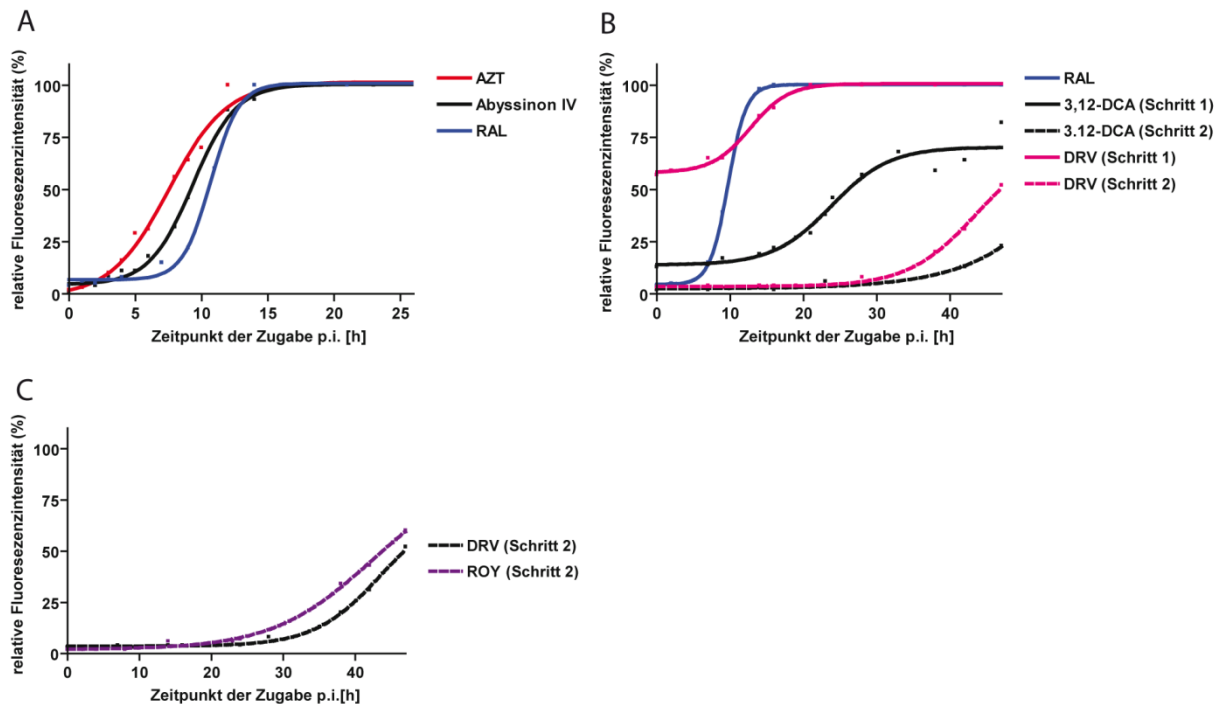


Abbildung 23 Vergleich der TOA-Profile der 3 neuen HIV-Inhibitoren Abyssinon IV, 3,12-DCA und ROY mit Referenzsubstanzen. (A) Das TOA-Profil von Abyssinon IV im Vergleich mit AZT für RT und RAL für Integrase. (B) 3,12-DCA im Vergleich mit den nächstgelegenen Referenzsubstanzen RAL für Integrase- und DRV für Protease-Inhibitoren. (C) ROY im Vergleich zu DRV. Die TOA-Profile der drei Substanzen Abyssinon IV, 3,12-DCA und ROY wurden analog der oben beschriebenen Methode für das TOA-Assay durchgeführt. Die Profile der Referenzsubstanzen wurden aus Abbildung 22 übernommen.

Eine andere Darstellungsweise verdeutlicht die Ergebnisse des TOA. Eine der  $IC_{50}$ -Berechnung analog durchgeführte Berechnung ergibt für jeden Inhibitor einen spezifischen Zeitpunkt „ $ET_{50}$ “ (*Effective Timepoint 50%*). Das ist derjenige Zeitpunkt nach HIV-Exposition der Zellen, an dem eine Zugabe des Inhibitors nur noch 50% Inhibition bewirkt. Betrachtet man für jeden dieser Werte nur das Konfidenzintervall als das Zeitfenster, innerhalb welchem der berechnete  $ET_{50}$  zu 95% Sicherheit liegt ( $K_{95}$ ), erhält man einen weiteren nützlichen Anhaltspunkt zur Zuordnung eines neuen Inhibitors. Diese Art der Interpretation ist in Abbildung 24 dargestellt. Abyssinon IV liegt hier mit einem  $K_{95}$  von 8,6 – 9,3 h.p.i. wiederum deutlich sichtbar zwischen RT (7,2 – 8,1 h.p.i.) und Integrase (10,0 – 11,8 h.p.i.), während zum Beispiel das  $K_{95}$  eines Extraktes von *Echinacea purpurea*, einem käuflichen Phytotherapeutikum gegen Erkältungskrankheiten das den Integrase-Inhibitor Cichoriensäure enthält (Lin et al. 1999) mit 9,9 – 11,3 h.p.i. relativ exakt dem Intervall der Integrase-Referenzinhibitoren entspricht. 3,12-DCA gleicht mit einem Intervall von 26,8 – 31,7 h.p.i. interessanterweise keinem der bekannten Referenzsubstanzen, die etwa 15 Stunden in beide Richtungen entfernt liegen. ROY hingegen liegt mit 43,0 – 44,8 h.p.i. sehr gut in dem Intervall der Proteaseinhibitoren DRV und SQV mit 44,2 – 49,5 h.p.i.

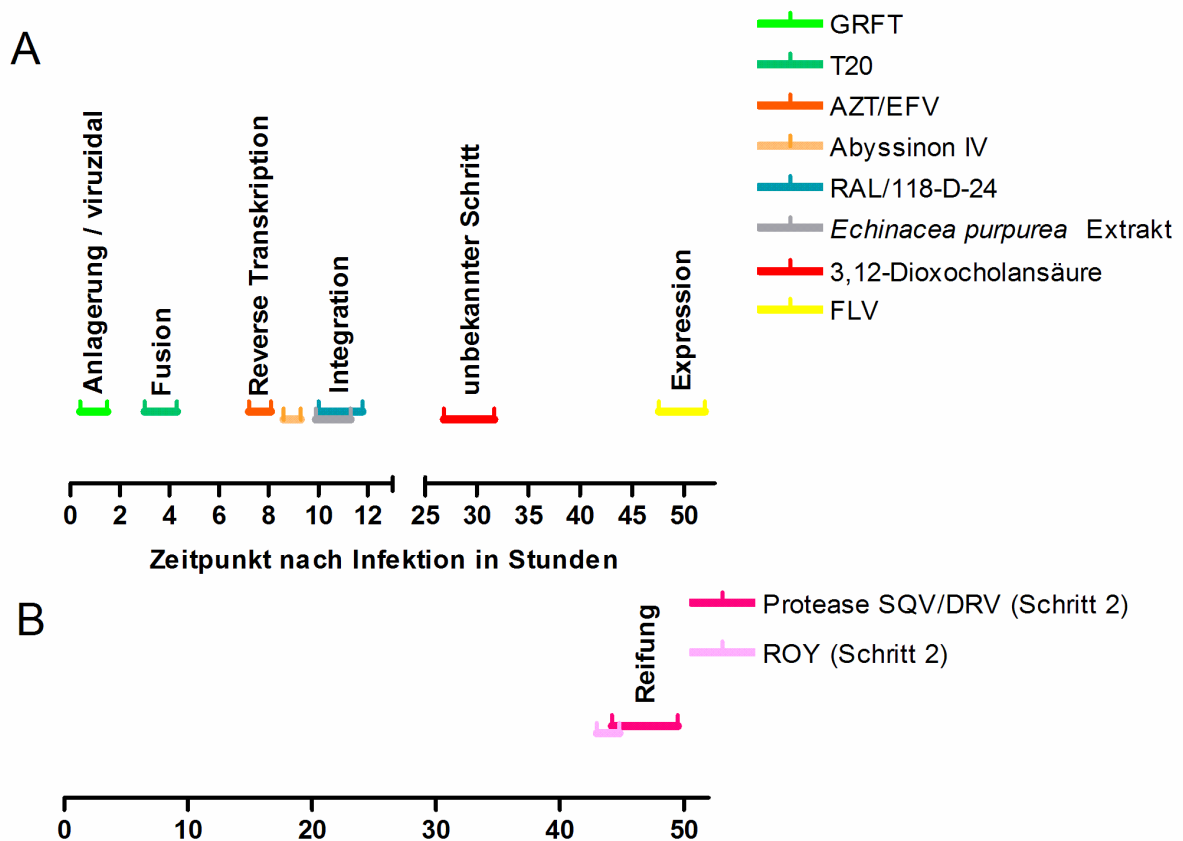


Abbildung 24: TOA der 3 neuen Substanzen im Vergleich mit den Referenzinhibitoren dargestellt als 95% Konfidenzintervall. Die farbigen Balken stellen den zeitlichen 95% Konfidenzintervall für die jeweiligen  $ET_{50}$ -Werte der einzelnen Referenzinhibitoren und der 3 neu gefundenen Substanzen Abyssinon IV, 3,12-DCA (A) und ROY (B). Die neuen Inhibitoren und *Echinacea purpurea* sind hier zur Erleichterung der Erkennung leicht versetzt dargestellt.

Eine weitere Substanzbibliothek von der Firma AnalytiCon Discovery (Deutschland) bestehend aus 800 Naturstoffen erbrachte nach einem Screen (Abbildung 25) der analog des o.g. Screens der LOPAC<sup>1280</sup> Bibliothek durchgeführt wurde, 8 Substanzen mit anti-HIV Aktivität, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht als solche beschrieben waren (Abbildung 27).

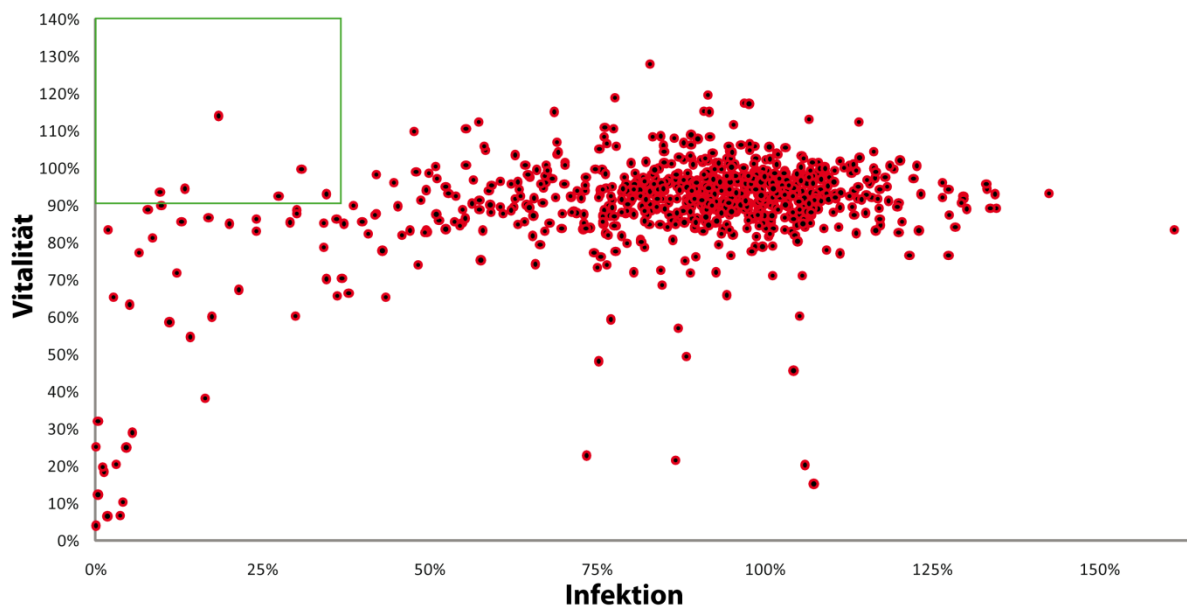


Abbildung 25: Ergebnis des Screens der 800 Naturstoffe umfassenden AnalytiCon Bibliothek. Dargestellt sind auf der X-Achse die Mittelwertwerte des 2. Schrittes aus je 3 Datenpunkten gegen die dazugehörigen MTT-Werte aus Schritt 1 auf der Y-Achse. Das grüne Viereck markiert das hier gewählte Cut-Off für Aktivität und Vitalität. 8 Substanzen lagen innerhalb oder am Rand dieses Fensters.

Insgesamt betrachtet zeigten 43 der 800 Substanzen eine Reduktion der Infektion in Schritt 2 um mindestens 50% bei gleichzeitiger Vitalität der Zellen in Schritt 1 von mindestens 80%. Davon zeigten 14 Substanzen erst in der späten Phase signifikante Aktivität (Reifung) und 29 in der frühen Phase (Eintritt bis Expression). 15 der 43 Substanzen zeigten eine Reduktion der Infektion von über 80% und 5 davon reduzierten die Zellvitalität um nicht mehr als 10% bei der eingesetzten Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$ . Zuzüglich einiger Substanzen die für mich, durch ihre enge Verwandtschaft zu bekannten anti-HIV aktiven Substanzen von Interesse waren und abzüglich der bereits als anti-HIV aktiv beschriebenen Substanzen blieben insgesamt 8 Substanzen zur weiteren Verifizierung übrig. NP-001743 (Violaceol I oder Ethericin A) konnte bei der  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung (Abbildung 26) nicht mehr verifiziert werden, da der toxische Effekt auf die Zellen zu groß war. Interessanterweise wies NP-006105 (3-(2-hydroxy-4-methoxy-6-methyl-phenoxy)-5-methyl-benzene-1,2-diol) nur eine schwache Toxizität auf, obwohl der strukturelle Unterschied zu NP-001743 nur in einer zusätzlichen Methoxygruppe am C4-Atom statt der Hydroxylgruppe an C2 und einer Verschiebung der Methylgruppe von C5 zu C6. Anzumerken bleibt, dass 6 Substanzen die Vitalität der Zellen auf unter 20% reduzierten.



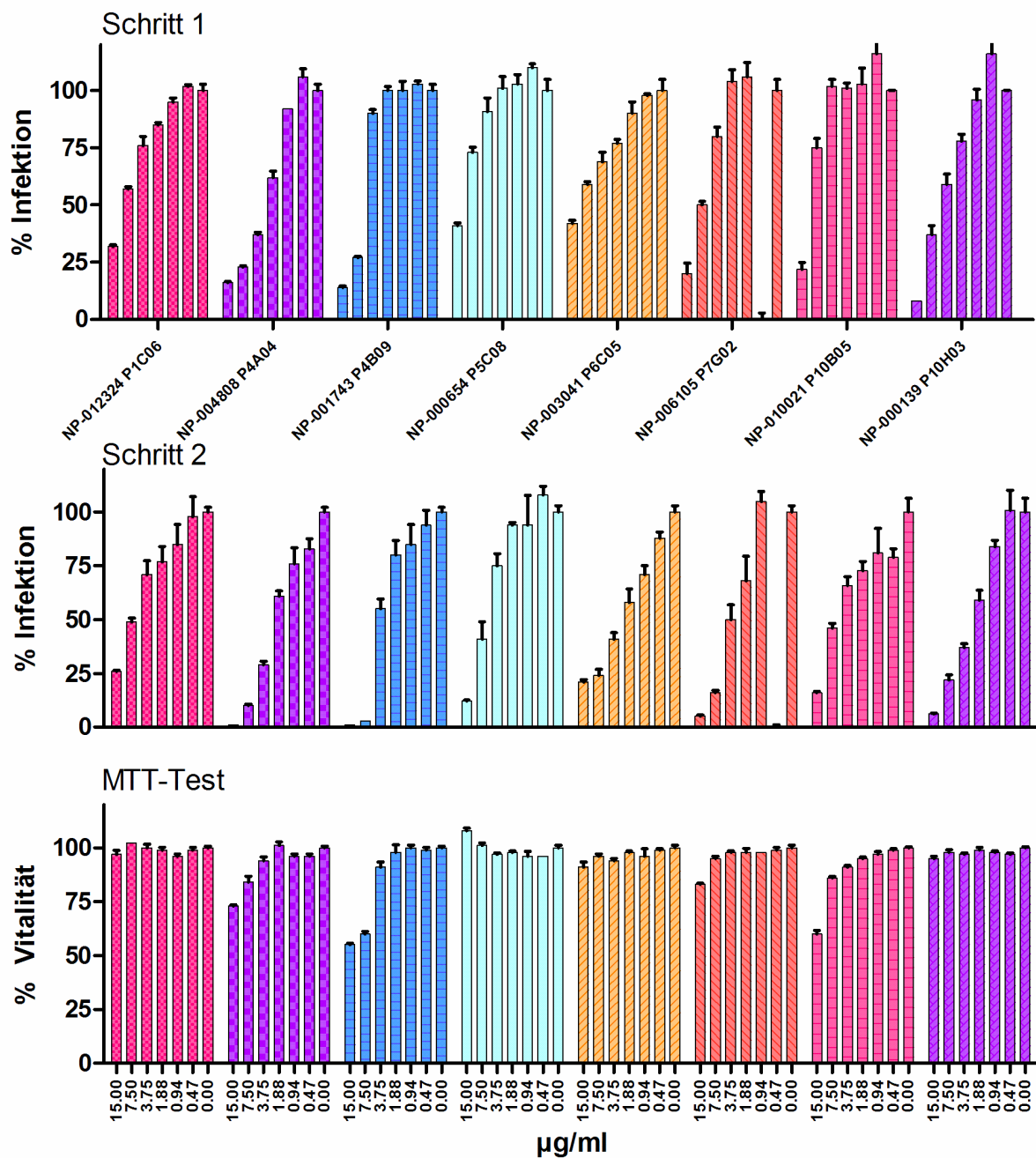
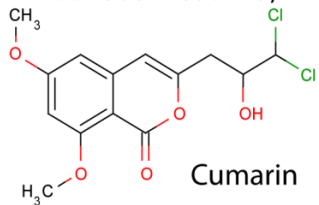
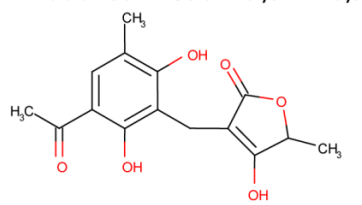
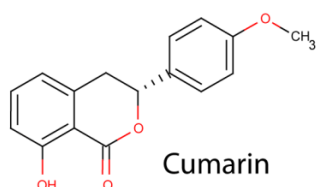
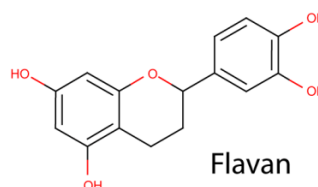
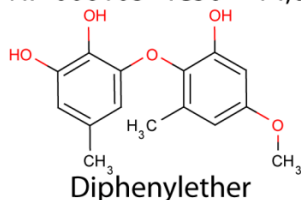


Abbildung 26: Rohdaten zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte der 8 neuen anti-HIV aktiven Substanzen, die in der AnalytiCon Bibliothek identifiziert wurden. Oben: Fluoreszenzintensitäten der LC5-RIC Zellen aus Schritt 1. Mitte: Fluoreszenzintensitäten der LC5-RIC Zellen aus Schritt 2. Unten: MTT-Test. X-Achsen: Schritt 1: Substanzname, MTT-Test : Konzentration in µg/ml. Y-Achsen: % Infektion für Schritt 1 und 2 relativ zu infizierten, unbehandelten Zellen, % Vitalität für Schritt 1 relativ zu infizierten, unbehandelten Zellen. Alle Daten repräsentieren einen Mittelwert aus 3 Replikaten. Der Wert für 0,47 µg/ml von NP-006105 für Schritt 2 fehlt wegen eines wahrscheinlichen Pipettierfehlers beim Übertrag des Virus-haltigen Mediums von Schritt 1 auf die neuen Zellen für Schritt 2.

NP-004808  $IC_{50} = 5,44 \pm 0,35 \mu M$ NP-000139  $IC_{50} = 9,54 \pm 0,99 \mu M$ NP-012324  $IC_{50} = 31,67 \pm 3,17 \mu M$ NP-000654  $IC_{50} = 20,95 \pm 1,61 \mu M$ NP-006105  $IC_{50} = 14,03 \pm 1,38 \mu M$ 

NP-001743

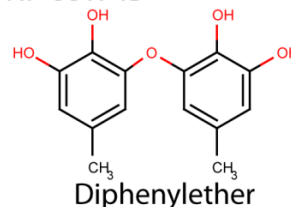
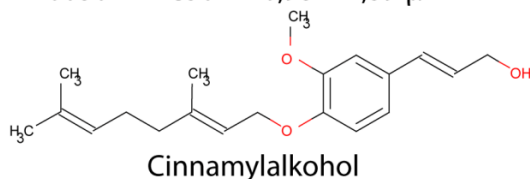
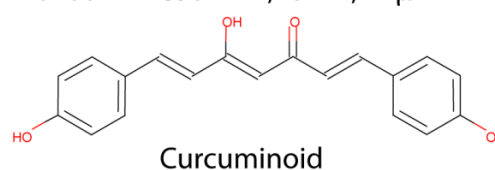
NP-003041  $IC_{50} = 10,93 \pm 1,39 \mu M$ NP-010021  $IC_{50} = 22,26 \pm 2,44 \mu M$ 

Abbildung 27: 8 Substanzen die beim Screen der 800 Naturstoffe umfassenden Bibliothek der Firma AnalytiCon Discovery identifiziert wurden.  $IC_{50}$ -Werte wurden nur von Schritt 2 ermittelt und dargestellt,  $n=3$ , die jeweilige Stoffgruppe ist unter den Molekülen angegeben.

Leider war es in der vorgegebenen Zeit nicht möglich, nähere Charakterisierungen der Substanzen durchzuführen. Insgesamt konnten jedoch mit dem EASY-HIT System während des Zeitraumes dieser Arbeit aus insgesamt 5980 getesteten Substanzen 14 Einzelsubstanzen (0,24 %) mit bisher noch nicht bekannter anti-HIV Aktivität identifiziert werden.

### **3.2 Inhaltsstoffe eines Extraktes getrockneter Wurzeln von *Pelargonium sidoides* hemmen die Infektion mit HIV-1 *in vitro***

#### **3.2.1 Der anti-HIV Effekt verschiedener, wässriger Extrakte der Wurzeln von *Pelargonium sidoides***

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Identifikation von Naturstoffen mit anti-HIV Wirkung lag, sollten neben den bereits beschriebenen Substanzbibliotheken auch Pflanzenextrakte verschiedener Art untersucht werden. Dabei wurden verschiedene Extrakte von höheren terrestrischen Pflanzen, traditionell genutzten Heilpflanzen und marinen Algen sowie auch diverse traditionell genutzte Heilpflanzen wie Pfefferminze, Salbei, Johanniskraut, Mistel sowie pflanzliche Arzneimittel wie Präparationen von zum Beispiel *Echinacea purpurea*, *Boswellia serrata* und *Pueraria lobata* untersucht. Neben einer ungerichteten, auf Diversität beruhenden Fokussierung wurden auch Pflanzen und Präparationen untersucht, die bereits in Zusammenhang mit Infektionskrankheiten Anwendung finden. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass die phytopharmazeutische Präparation EPs® 7630 (Umckaloabo®), ein Extrakt der Wurzeln der südafrikanischen Kaplandgeranie *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae), eine gute Hemmung der HIV Infektion im nicht-toxischen Bereich bewirkt. In der Literatur wurde bereits eine breite Vielfalt an anti-infektiösen Charakteristika dieser Pflanze beschrieben. So zum Beispiel gegen Gruppe A-Streptokokken (Janecki et al. 2011), *Mykobakterium tuberculosis* (Kolodziej et al. 2003; Seidel and Taylor 2004; Kim et al. 2009), *Leishmania donovani* (Thale et al. 2010), aber auch Herpesviren (Schnitzler et al. 2008) und eine Gruppe respiratorischer Viren (Michaelis et al. 2010). Diese anscheinend breit gefächerte Aktivität gegen die Erreger diverser Krankheiten machte eine genaue Charakterisierung der anti-HIV Aktivität umso interessanter. Vor allem vor dem Hintergrund, dass Präparationen der Wurzel von *Pelargonium sidoides* gerade in dem HIV-geplagten Süd-Afrika eine lange Tradition in der ethnomedizinischen Naturheilkunde besitzt (Brendler and van Wyk 2008).

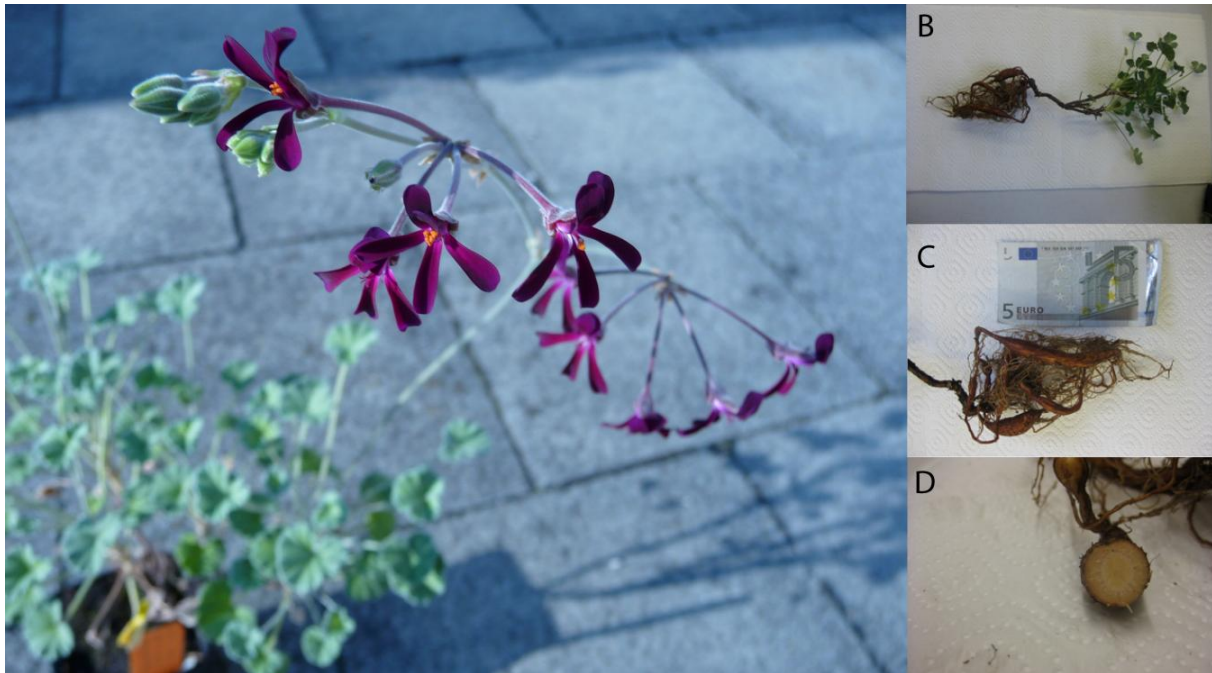


Abbildung 28: *Pelargonium sidoides* – die Kaplandgeranie. Etwa 1-jährige Pflanze. Die dargestellte Pflanze wurde zur Untersuchung der Aktivität eines Extraktes frischer Wurzeln benutzt. (A) Pflanze mit Blüten. (B) komplette Pflanze nach Reinigung mit Ethanol und H<sub>2</sub>O. (C), (D) Wurzel und holzige Wurzelknolle im Querschnitt. Zur späteren Extraktion wurden die gesamten Wurzeln benutzt.

Um als erstes nachzuweisen, dass die beobachtete Wirkung tatsächlich auf Metaboliten von *P. sidoides* beruht und nicht etwa auf chemischen Veränderungen oder Zusätzen während des Herstellungsprozesses, wurden lebende Pflanzen (Abbildung 28) sowie getrocknete Wurzeln besorgt, um eigene Extrakte herzustellen. Abbildung 29A zeigt, dass sowohl die Präparation aus frischen Wurzeln, sowie die aus getrockneten Wurzeln eine hemmende Aktivität auf HIV in der frühen Phase des HIV-Replikationszyklus (Schritt 1) zeigten, vergleichbar mit der Wirkung von Umckaloabo®. Für alle weiteren Experimente wurden wegen der hohen Verfügbarkeit Extrakte der getrockneten Wurzeln (PS) benützt. Für dieses Experiment dienen die IC<sub>50</sub>-Werte eher als Richtwerte, da die genaue Menge der Inhaltsstoffe in dem gelösten Extrakte nicht bestimmt wurde.

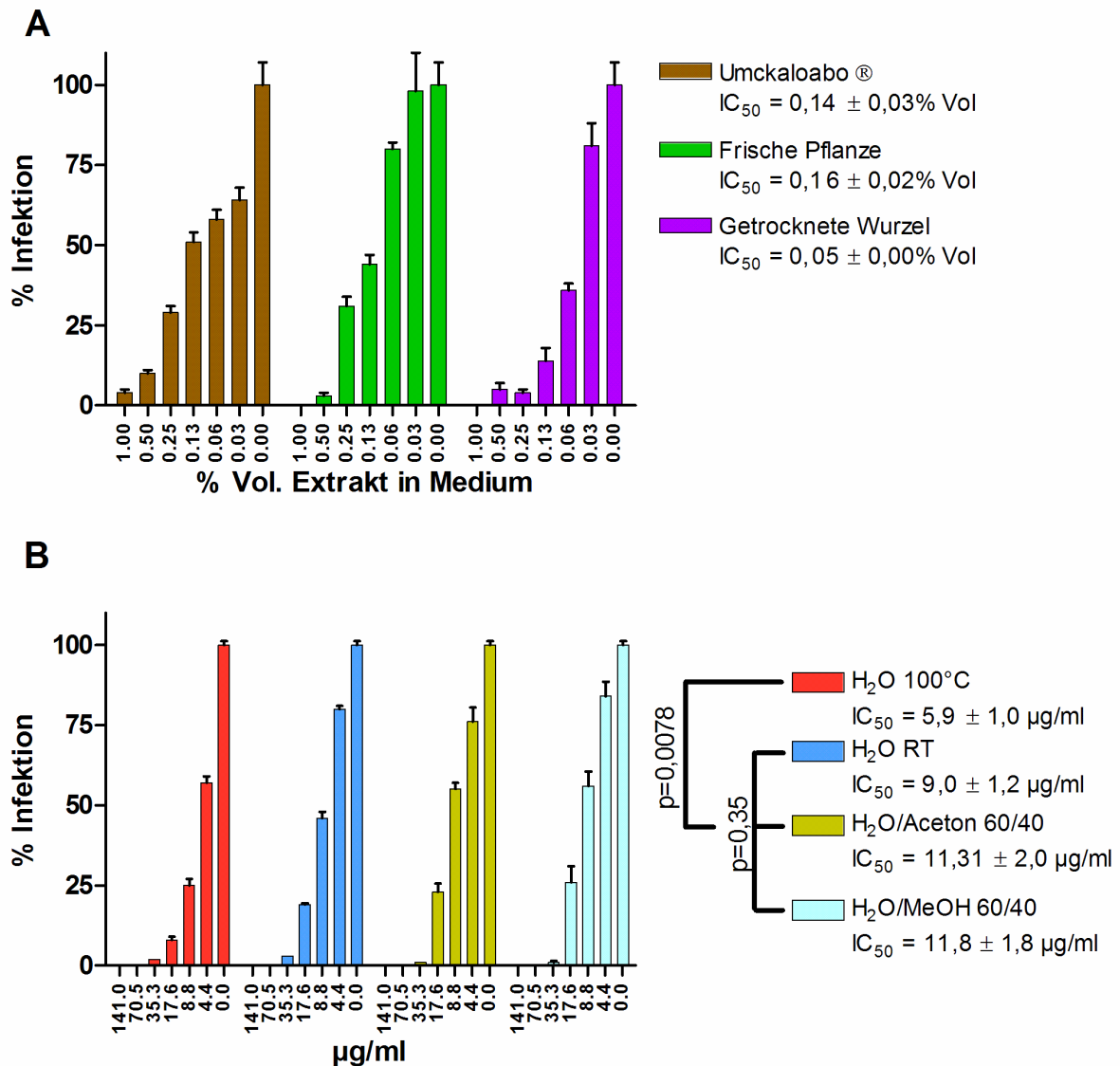


Abbildung 29: Anti-HIV Wirkung verschiedener Extrakte der Wurzeln von *Pelargonium sidoides*. Die X-Achsen geben die jeweilige Verdünnungsstufe der einzelnen Extrakte wieder, entweder in Volumenprozent von Extrakt in Medium (% Vol.) oder in µg/ml. Auf der Y-Achse ist die Stärke der Infektion in % relativ zu der Fluoreszenz-Signalintensität der infizierten, unbehandelten LC5-RIC Zellen (100% Infektion) aufgetragen. Alle dargestellten Daten sind Mittelwerte von 3 Datenpunkten mit Standardabweichung. Alle Daten wurden im Schritt 1 des EASY-HIT Systems ermittelt. (A) Anti-HIV Aktivität von Umckaloabo® (braun), dem Extrakt aus der frischen Wurzel von *Pelargonium sidoides* (grün) und von dem Extrakt der getrockneten Wurzel (violett) im EASY-HIT System. (B) Vergleich von Extrakten die bei 100 °C (rot), Raumtemperatur (blau), mit 40% Aceton (gelb) oder mit 40% MeOH (hellblau) als Auszugsmittel aus den getrockneten Wurzeln von *P. sidoides* hergestellt wurden. Die errechneten  $IC_{50}$ -Werte sind in µg/ml (Trockengewicht der gelösten Inhaltsstoffe) mit Standardabweichung und die Signifikanzen als p-Wert angegeben.

Um zu untersuchen ob sich die Aktivität des Extraktes steigern ließe wenn man verschiedenen klassisch in der Pflanzenextraktion genutzte Lösungsmittel zur Extraktion zusetzt, wurden Extraktionen der getrockneten Wurzeln von *P. sidoides* in Anwesenheit von 40 % Methanol (MeOH) oder 40% Aceton durchgeführt. Auch wurden hier die Extrakte bei

Raumtemperatur (RT) hergestellt. Die in Abbildung 29B gezeigten Daten weisen darauf hin, dass der Zusatz organischer Lösungsmittel zur Extraktion keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität im Vergleich zu reinem Wasser als Extraktionsmittel zeigt ( $p = 0,35$ ). Nur das Erhitzen auf  $100^{\circ}\text{C}$  während der Extraktion zeigt einen schwach signifikanten Einfluss auf die anti-HIV Aktivität der Extrakte im Vergleich zu bei Raumtemperatur hergestelltem Extrakt ( $p = 0,0078$ ). Eine flüssig-flüssig Extraktion zur Depletion von Alkaloiden, Lipiden und ätherischen Ölen durch manuelles Ausschütteln des wässrigen Rohextraktes mit Hexan (2x) und danach Chloroform (2x) wiesen zusätzlich zu o.g. Ergebnissen darauf hin, dass die aktive(n) Substanz(en) einen stark hydrophilen Charakter besitzt, da die Hexan- bzw. Chloroformphase keine, bzw. kaum anti-HIV Aktivität zeigten. Die schwache, inhibitorische Aktivität der Chloroform-Phase bei hohen Konzentrationen könnte durch Verschleppung einiger Tropfen  $\text{H}_2\text{O}$ -Phase zustande gekommen sein beim Trennen der Phasen durch manuelles Pipettieren.

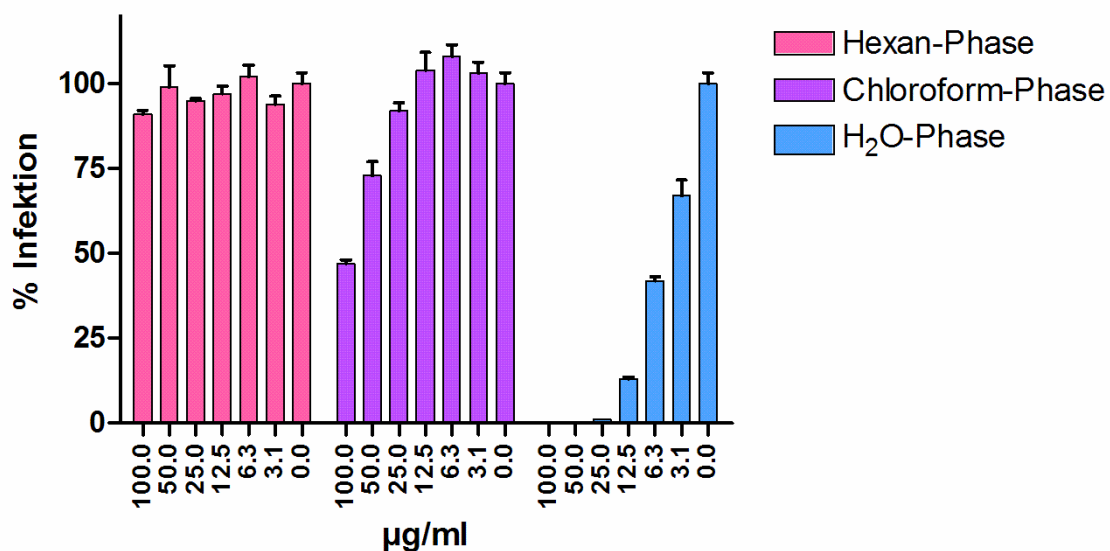


Abbildung 30: Aktivität der einzelnen Phasen einer flüssig-flüssig Extraktion von PS. Die einzelnen Phasen der flüssig-flüssig Extraktion wurden nach Eindampfen gewogen und in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen, bevor sie im EASY-HIT System getestet wurden. Die X-Achse zeigt die Konzentration des Extraktes in  $\mu\text{g/ml}$ , die Y-Achse die Infektion der LC5-RIC Zellen. Alle dargestellten Daten sind Mittelwerte aus 3 Replikaten.

Eine Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes für Schritt 1 und 2 sowie des  $\text{LD}_{50}$ -Wertes ergab, dass PS sowohl die Infektion in Schritt 1 verhindert, als auch die Produktion neuer Viren (Schritt 2). Der  $\text{LD}_{50}$  (Letale Dosis 50%; Wert, bei dem die Vitalität der Zellpopulation 50% beträgt) ergab einen Wert von  $558,2 \mu\text{g/ml}$ , was mit dem  $\text{IC}_{50}$  von  $9,15 \mu\text{g/ml}$  einen therapeutischen Index (Ti) von 61 ergibt. Das Ergebnis der Experimente ist in Abbildung 31 dargestellt.

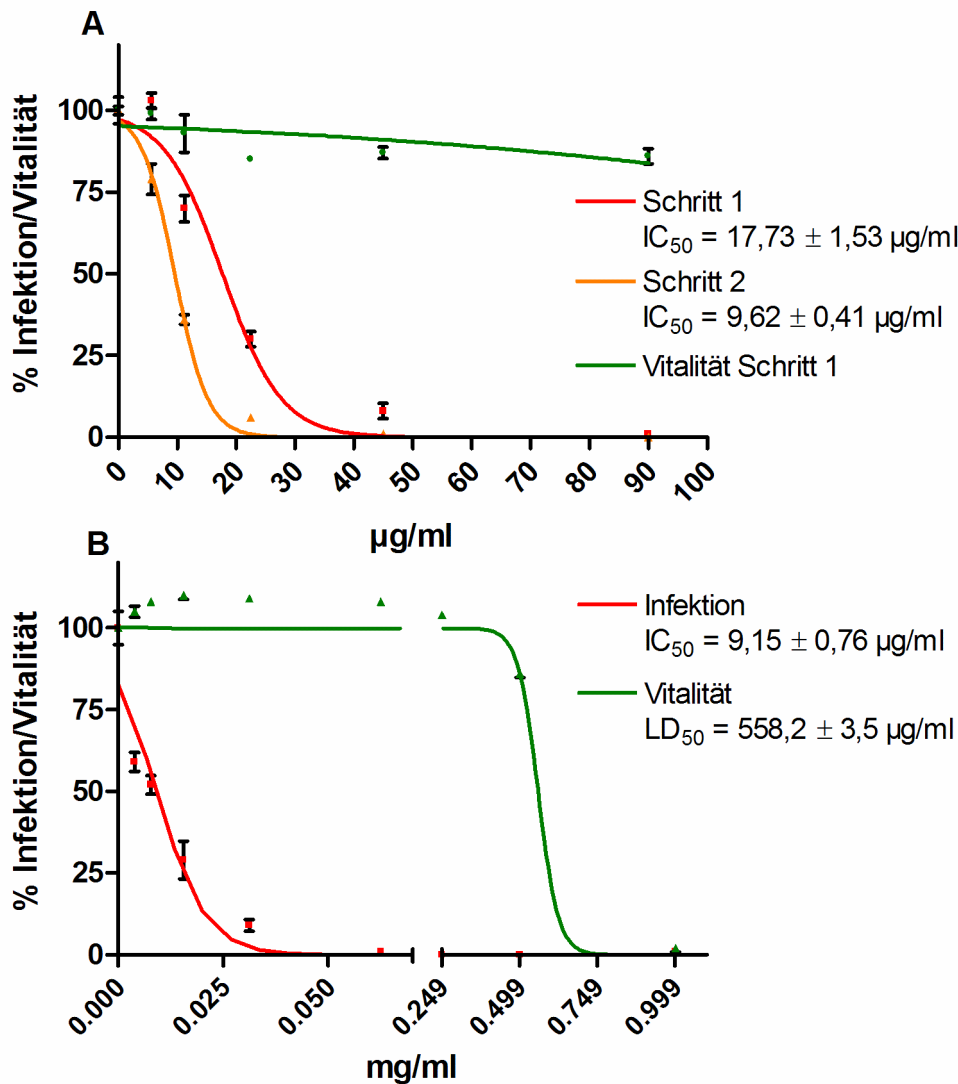


Abbildung 31: Ermittlung des  $IC_{50}$ -Wertes für Schritt 1 und 2 sowie des  $LD_{50}$ -Wertes für das Raumtemperatur-Extrakt von PS. Alle gezeigten Daten aus dem EASY-HIT System sind Mittelwerte aus Triplikaten. Die Experimente wurden nach dem Standard Assay-Setup durchgeführt. (A) Dargestellt ist die Ermittlung des  $IC_{50}$ -Wertes von PS für Schritt 1 (rot) und 2 (orange). Der Einfluss auf die Vitalität der behandelten Zellen wurde mit dem MTT-Test ermittelt. (B) Die Ermittlung des  $LD_{50}$ -Wertes.

### 3.2.2 Die anti-HIV Aktivität von PS verhindert die Anlagerung des Virus an die Zielzellen

Da der Standard EASY-HIT Test bereits darauf hinwies, dass die Inhibition der HIV-Infektion durch PS in der frühen Phase des HIV-Replikationszyklus stattfindet, wurde ein TOA durchgeführt um einzuengen, welcher Schritt im frühen HIV-Replikationszyklus gehemmt wird. Wie in Abbildung 32 zu sehen, glich das TOA-Profil von PS ( $ET_{50} = 1,74 \pm 0,05h$ ) in Steigung und Form dem Profil des Anlagerungsinhibitors GRFT ( $ET_{50} = 0,69 \pm 0,08h$ ) deutlicher, während zu dem Fusionsinhibitor T-20 ( $ET_{50} = 3,33 \pm 0,17h$ ) ein größerer Unterschied zu erkennen war. Keinesfalls aber scheint die RT betroffen zu sein, da ein entsprechendes TOA-Profil für AZT ( $ET_{50} = 7,44 \pm 0,26h$ ) erst nach 6 – 8 Stunden nach der

Infektion ein Nachlassen der Inhibition zeigen würde. Also scheint PS ähnlich GRFT den Eintritt des Virus in die Wirtszelle zu verhindern.

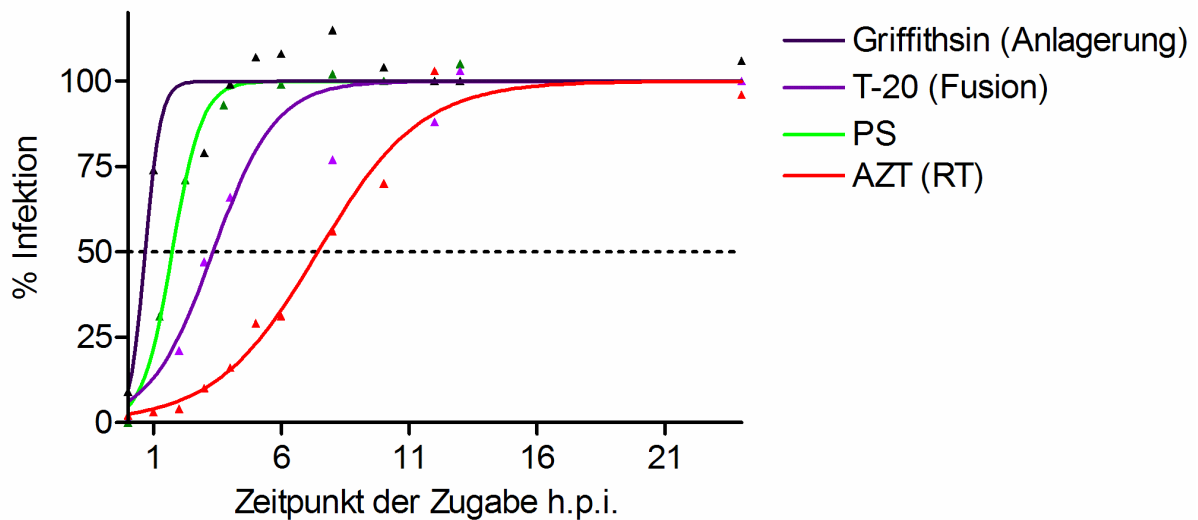


Abbildung 32: TOA-Profil von PS im Vergleich zu Griffithsin, T-20 und AZT. Dargestellt sind die TOA-Profile von Griffithsin (schwarze Linie), T-20 (violette Linie), AZT (rote Linie) und PS (grüne Linie). Alle Punkte sind Mittelwerte aus drei Datenpunkten.

### 3.2.2.1 Prä-Inkubationsexperimente um den Einfluss von PS auf die Zielzellen bzw. auf die Viruspartikel selbst zu untersuchen

Um nun herauszufinden ob der eigentliche Angriffspunkt von PS Virus- oder zelleigene Strukturen involviert, wurde ein Prä-Inkubationsexperiment durchgeführt. Hierzu wurde zum einen eine HIV-1<sub>LAI</sub> Viruslösung für 3 Stunden mit PS inkubiert, bevor das Gemisch auf die LC5-RIC Zellen gegeben wurde, um einen eventuellen Effekt am Viruspartikel sichtbar zu machen. Zum anderen wurden LC5-RIC Zellen für 3 Stunden mit PS vorbehandelt bevor Virus zugegeben wurde, um eventuelle Effekte an zellulären Strukturen zu erkennen. Als Kontrolle diente der Standardaufbau, bei dem PS und Virus zeitgleich zu den Zellen gegeben wurde. Das Ergebnis dieses Experiments (Abbildung 33) zeigte, dass eine Vorinkubation der Viruslösung mit PS eine signifikante Verringerung der Infektiosität des Virus bewirkt. Das äußerte sich durch eine 3,4-fache Verringerung ( $p < 0,0001$ ) des  $IC_{50}$ -Wertes im Vergleich zu den mit PS vorinkubierten Zellen oder zeitgleicher Zugabe von Virus und PS. Dies lässt darauf schließen, dass der inhibitorische Effekt zumindest anteilig auf einer Interaktion zwischen PS und viralen Strukturen beruht.



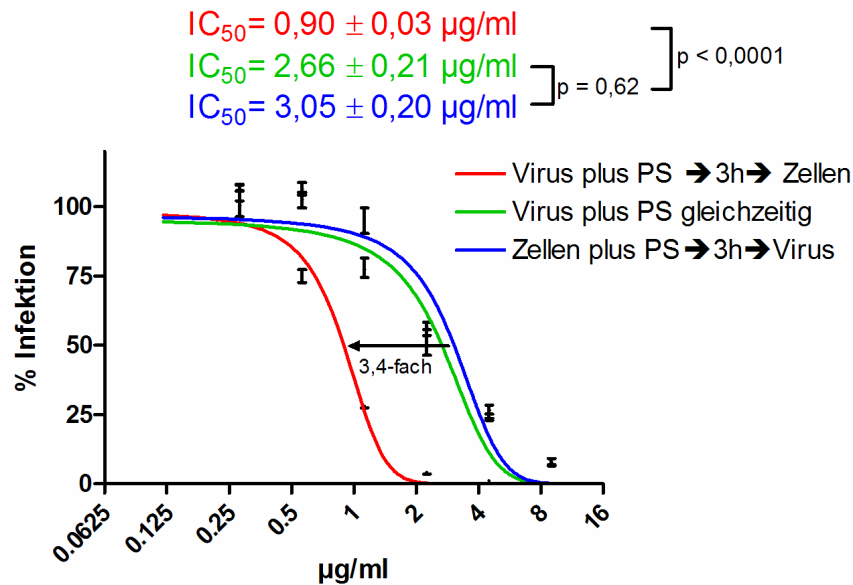


Abbildung 33: Prä-Inkubationsversuch zur Identifizierung der Zielstrukturen der Inhibition durch PS. Die 3-stündige Vorinkubation des Virus mit PS (rot) bewirkt eine 3,4-fache Verringerung des  $IC_{50}$  im Vergleich zu den Werten für Vorinkubation der Zellen (blau) oder gleichzeitige Zugabe von Virus und PS zu den Zellen (grün). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen gleichzeitiger Zugabe von PS und Virus zu den Zellen (grün) und der Prä-Inkubation der Zellen für 3 Stunden vor der Viruszugabe (blau) betrug  $p=0,62$ . Der Unterschied zwischen der Prä-Inkubation des Virus mit PS für 3 Stunden vor Zugabe zu den Zellen (rot) zeigte sich sehr signifikant ( $p<0,0001$ ). Die Signifikanzen sind neben den  $IC_{50}$ -Werten angegeben. Alle gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 Replikaten. Die hier verwendete Reporterzelllinie war LC5-RIC-R5.

### 3.2.2.2 Abhängigkeit der anti-HIV Aktivität von PS von den HIV-Rezeptoren auf den Zielzellen

Um herauszufinden ob der Mechanismus mit dem PS HIV inhibiert HIV-spezifisch ist oder nicht, wurde ein Infektionsversuch mit einem pseudotypisiertem Virus unternommen. Dazu wurde ein HIV-1 Virus dessen Glykoprotein defekt ist mit dem Glykoprotein des vesikulären Stomatitis Virus, kurz VSV komplementiert (HIV-1 $\Delta$ env<sub>VSV-G</sub>). Der  $IC_{50}$ -Wert für HIV-1<sub>LAI</sub> lag hier bei 12,37 µg/ml, der für die Inhibition von HIV-1 $\Delta$ env<sub>VSV-G</sub> mit 131,2 µg/ml etwa 10-fach darüber. Das in Abbildung 34 dargestellte Ergebnis zeigt, dass PS die Infektion der Zellen durch natives HIV deutlich besser inhibiert, als die Infektion durch das mit dem VSV-Glykoprotein pseudotypisierte Virus.

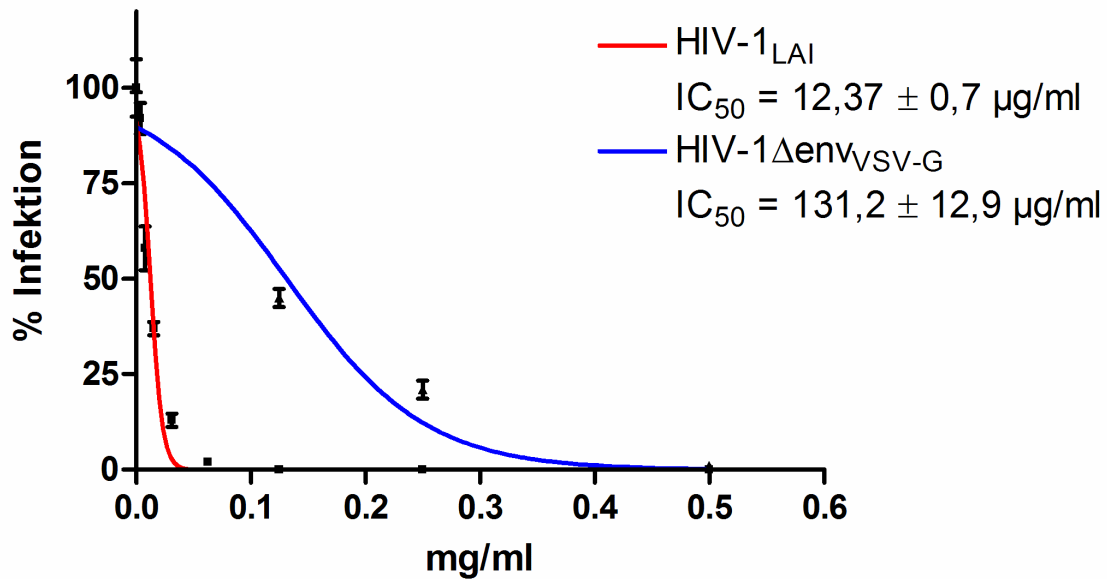


Abbildung 34: Effekt von PS auf die Infektion der LC5-RIC Zellen mit VSV-G pseudotypisiertem Virus. Dosis-abhängige Reduktion der Infektion mit HIV-1<sub>LAI</sub> (rote Linie) und HIV-1Δenv<sub>VSV-G</sub> (blaue Linie). Die LC5-RIC Zellen wurden für beide Viren in derselben Platte mit PS behandelt und je Virus 3 Reihen infiziert. Die Virusmenge wurde ausgehend von der jeweiligen Titration jeweils so gewählt, dass etwa 48 Stunden nach Infektion eine etwa 100-fache Signalinduktion über dem Hintergrund zu beobachten war. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte der Triplikate, Standardabweichungen unter 5% sind in der Abbildung nicht zu erkennen.

Sollte die beobachtete viruzidale Hemmung der Anlagerung von HIV an die Zellen auf einer Interaktion der inhibitorischen Substanz(en) in PS mit viralen Strukturen beruhen, die in der Korezeptorbindung an CXCR4 oder CCR5 involviert sind, sollte ein unterschiedlicher Effekt auf CCR5- und CXCR4-trope Viren zu beobachten sein. Um dies zu testen, wurde ein paralleler Infektionsversuch mit dem CXCR4-tropen HIV-1<sub>LAI</sub> (Ghezzi et al. 2000) dem CCR5-tropen HIV-1<sub>AD8</sub> (Lin et al. 2006) und dem mit dem JRFL-Glykoprotein pseudotypisierten, CCR5-tropen HIV-1<sub>JRFL</sub> (Vila-Coro et al. 2000) durchgeführt. Das Ergebnis (Abbildung 35) zeigt, dass sich die inhibitorischen Effekte ( $IC_{50}$ -LAI =  $1,8 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50}$ -AD8 =  $1,44 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$  und  $IC_{50}$ -JRFL =  $1,07 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ ) auf diese Viren nicht signifikant unterscheiden ( $p=0,13$ ). Eine Hemmung über die selektive Blockade oder anderweitige Interaktionen mit Korezeptorbindungsmotiven des Virus erscheint somit unwahrscheinlich, außer es handelt sich um eine stark unspezifische Bindung an die betreffenden Strukturen.

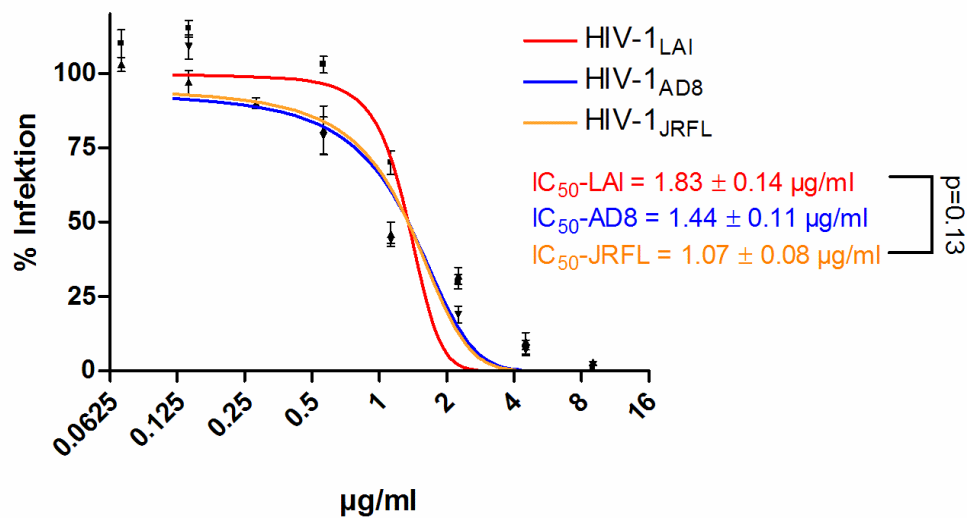
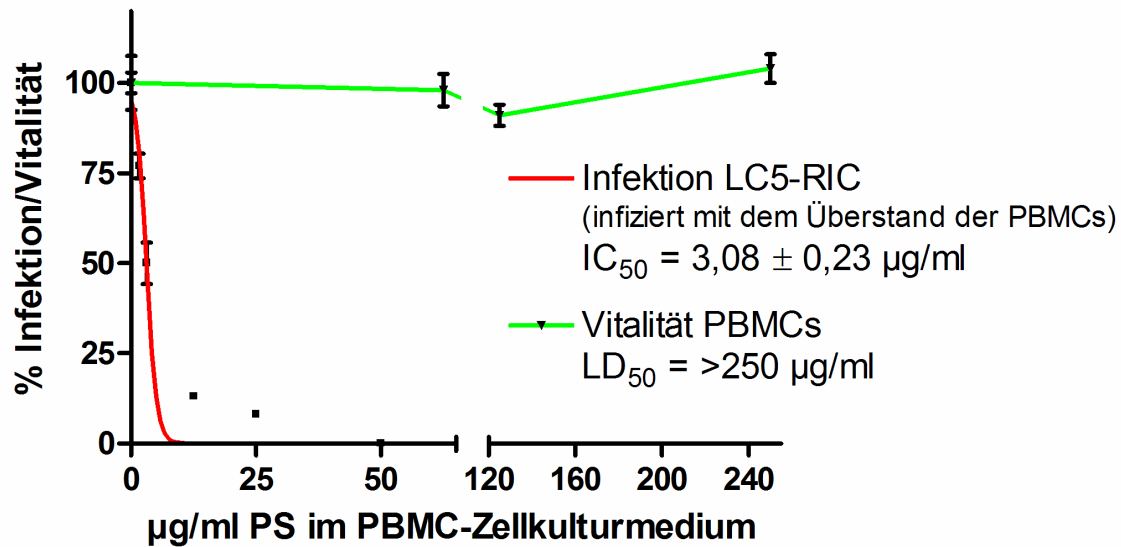


Abbildung 35: Inhibition von Viren mit verschiedenen Tropismen durch PS im EASY-HIT System. Das Virus HIV-1<sub>LAI</sub> (CXCR4-trop, Wildtyp), HIV-1<sub>AD8</sub> (CCR5-trop, Wildtyp) und HIV-1<sub>JRFL</sub> (CCR5-trop, pseudotypisiert) werden Dosis-abhängig von PS inhibiert. Die IC<sub>50</sub>-Werte unterscheiden sich hierbei nicht signifikant (p=0,13). Die Menge an eingesetztem Virus wurde jeweils so gewählt, dass die Signalinduktion nach 48 Stunden etwa 100-fach über dem Hintergrund lag. Alle dargestellten Daten sind ein Mittel aus 3 Einzelwerten für die Infektion der LC5-RIC Zellen in Schritt 1.

### 3.2.2.3 Der inhibitorische Effekt von PS auf die HIV-Infektion primärer humaner Zellen

Da LC5-RIC Zellen als HeLa-Zellen nicht zu den natürlichen Zielzellen für HIV zählen, sollte der Effekt von PS in primären PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) untersucht werden, die im Körper eines der Hauptziele für HIV darstellen (Abbildung 36). Eine Hemmung der Infektion von PBMCs in Schritt 1 spiegelt sich in der verminderten Produktion neuer, infektiöser Partikel wieder. Diese wurde mit der Infektion der LC5-RIC Zellen quantifiziert (Schritt 2). Demnach zeigte PS einen ähnlich starken Effekt (IC<sub>50</sub> = 3,08 ± 0,23 µg/ml; LD<sub>50</sub> > 250 µg/ml) in primären Zellen wie in den vorangegangenen Experimenten mit den LC5-RIC Zellen. Die Inhibition ist also kein durch die LC5-RIC Zellen bedingtes Artefakt oder künstlicher Effekt.

Abbildung 36: (nächste Seite): PS inhibiert die Infektion von PBMCs. 5\*10<sup>5</sup> IL2-stimulierte PBMCs/Well wurden in einer 96-Well Platte mit Verdünnungsreihen von PS behandelt und mit HIV-1<sub>LAI</sub> infiziert. 3 Stunden nach Infektion wurde das Medium komplett entfernt und gegen frisches IL2-haltiges Medium getauscht. 48 Stunden nach der Infektion der PBMCs mit HIV-1<sub>LAI</sub> wurden 20 µl des Überstandes auf LC5-RIC Zellen übertragen und deren Rotfluoreszenz (rote Linie) nach weiteren 72 Stunden gemessen. Die Vitalität der PBMCs wurde mit dem MTT-Test ermittelt (grüne Linie). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus Triplikaten. Standardabweichungen unter 5% sind in der Abbildung nicht zu erkennen.



#### 3.2.2.4 Eine eventuelle immunstimulierende Wirkung von PS aktiviert nicht die HIV-Transkription in latent infizierten T-Zellen

In der Literatur wird beschrieben, dass ein Extrakt von PS stimulierend auf Faktoren des Immunsystems wirken kann, wie erhöhte Makrophagenaktivität (Kayser et al. 2001; Trun et al. 2006; Kolodziej and Kiderlen 2007). Ein immunmodulatorischer Effekt könnte sich auf latent oder persistent infizierte T-Zellen negativ auswirken, da eine Aktivierung dieser Zellen zu einer erhöhten HIV-Transkription und somit zu einer höheren Viruslast führen kann. Um dies für PS zu untersuchen wurden latent infizierte T-Zellen (J-Lat) mit PS behandelt, und die Aktivierung der HIV-Transkription im Vergleich zu TNF- $\alpha$  behandelten (Aktivierung der HIV Transkription, (Jordan 2003)) und unbehandelten Zellen auf RNA-Ebene quantifiziert. Das in Abbildung 37 dargestellte Ergebnis zeigte, dass selbst bei der höchsten Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  PS keinerlei Aktivierung der HIV-Transkription nachgewiesen werden konnte.

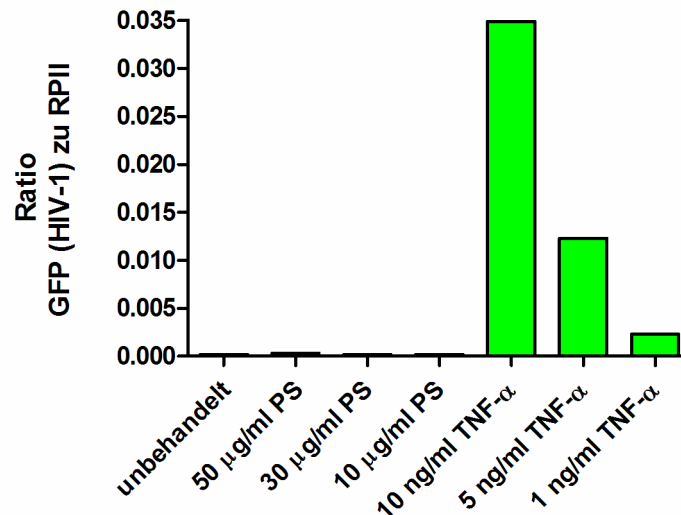


Abbildung 37: Einfluss von PS auf die HIV-1 Transkription latent HIV infizierter Zellen. Latent HIV-1 infizierte J-Lat Full Length clone 8.4-Zellen wurden 24h in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von *P. sidoides* bzw. TNF- $\alpha$  als bekannter Aktivator der HIV Transkription kultiviert und deren Einfluss auf die HIV-1 Transkription durch eine Real-Time PCR-Analyse auf cDNA untersucht. Dargestellt ist das Verhältnis der HIV-1 Transkripte (gemessen wurde die Menge an GFP-Transkript welches sich im Provirus-Genom der J-Lat Zellen befindet) zu den Transkripten des House-Keeping-Gens RPII. Die Analyse zeigt das Mittel aus den vereinten Zellen eines Dreifach-Ansatzes

### 3.2.3 Bioassay-angeleitete Fraktionierung des wässrigen Extraktes von PS zur näheren Charakterisierung der aktiven Inhaltsstoffe

Die Bioaktivität von Pflanzenextrakten muss nicht zwangsweise auf der Aktivität einer einzelnen Substanz beruhen, sondern kann auch einem Synergismus verschiedener Stoffe oder den Derivaten und Isomeren einer Hauptkomponente zugrunde liegen. Da ein wässriges Rohextrakt sehr viele Inhaltsstoffe besitzen kann, sollten nun die Bestandteile des Extraktes von PS orientiert an Bioaktivität fraktioniert werden.

#### 3.2.3.1 Untersuchung der generellen Separierbarkeit der Inhaltsstoffe von PS

Um als erstes die gesamte Komplexität des Rohextraktes zu betrachten, wurde eine UV-Spektrum des rohen Extraktes mit der UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) aufgenommen. Hierzu wurde das Extrakt auf die UPLC-Säule appliziert und mit einem Methanol-Gradienten von 10-100% Methanol eluiert. Das erhaltene Chromatogramm (Abbildung 38) spiegelt die hohe Komplexität des Extraktes in seiner Zusammensetzung wieder. Bei fast allen Wellenlängen zwischen 200 und 400 nm und über die gesamte Retentionszeit wurden teils sehr starke Signale detektiert.

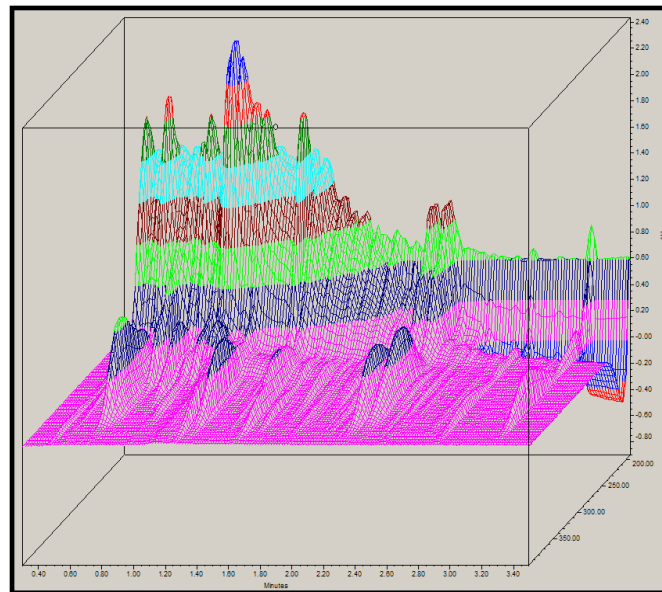


Abbildung 38: 3D-Darstellung des Chromatogramms der graduellen Elution von PS mit MeOH. Auf der X-Achse ist die Retentionszeit in Minuten angegeben, die Z-Achse gibt die Mess-Wellenlängen an (200 – 400 nm) und die Y-Achse die Signalintensität (AU). 10 µl des Rohextraktes wurden injiziert, die Flussrate betrug 0,3 ml/min. Der Gradient von 10–100% MeOH wurde über 3,4 Minuten angelegt.

Basierend auf dieser Erkenntnis wurden verschiedene Fraktionierungsmethoden getestet um die am besten geeignete zu identifizieren. Wegen der hohen Komplexität von PS stellten sich semi-preparative Fraktionierungen über Solid-Phase Extraktion (SPE) und Hochleistungs Flüssigchromatographie (HPLC) als nicht akkurat genug heraus (Daten nicht gezeigt) um die diversen Inhaltsstoffe effizient und reproduktiv voneinander zu trennen. Eine Fraktionierung mit Dünnschichtchromatographie (DC) ergab schließlich 12 Fraktionen. Diese wurden anhand der Fluoreszenz einzelner Banden bei 366 und 254 nm detektiert (verfügbare Wellenlängen einer Labor UV-Lampe). Ebenso wurden die dazwischen liegenden Bereiche ohne Fluoreszenz zu Fraktionen zusammengefasst. Bei 366 nm besitzen vor allem kondensierte Ringsysteme wie die bereits in der Literatur als prominente Inhaltsstoffe von PS beschriebenen Benzopyranone (Schoetz et al. 2008; Hauer et al. 2010) UV-Maxima im grünen bis blauen Bereich. Die einzelnen DC-Fraktionen wurden im EASY-HIT System auf Aktivität getestet. Da allerdings nur wenig Ausgangsmaterial vorhanden war, konnte dieser Test nur ein Mal durchgeführt werden und soll nur der Aussage dienen, ob eventuell mehrere Inhaltsstoffe für die anti-HIV Aktivität verantwortlich sind und ob generell eine Trennung dieser aktiven Inhaltsstoffe möglich ist. Das Ergebnis ist in Abbildung 39 dargestellt. Wie schon zuvor vermutet, enthält PS anscheinend nicht nur eine aktive Substanz, sondern mehrere, da nahezu alle Fraktionen eine gewisse Aktivität zeigten. Die Aktivität in Fraktion 1 könnte neben einer isolierten Komponente auch auf einen Überladungseffekt beim Auftrag auf die Dünnschichtplatte hinweisen und soll hier vernachlässigt werden. Die höchste Aktivität wurde in Fraktion 2 beobachtet. Die Aktivität lässt in Fraktion 7-10 stark nach. Fraktion 11 besitzt wiederum deutliche inhibitorische Aktivität. Eine  $IC_{50}$ -Bestimmung wurde

nicht durchgeführt, da keinerlei Information über Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen vorhanden war und die Fraktionen selber sich in ihrer Menge basierend auf der Bandenbreite auf der DC-Platte stark unterschieden.

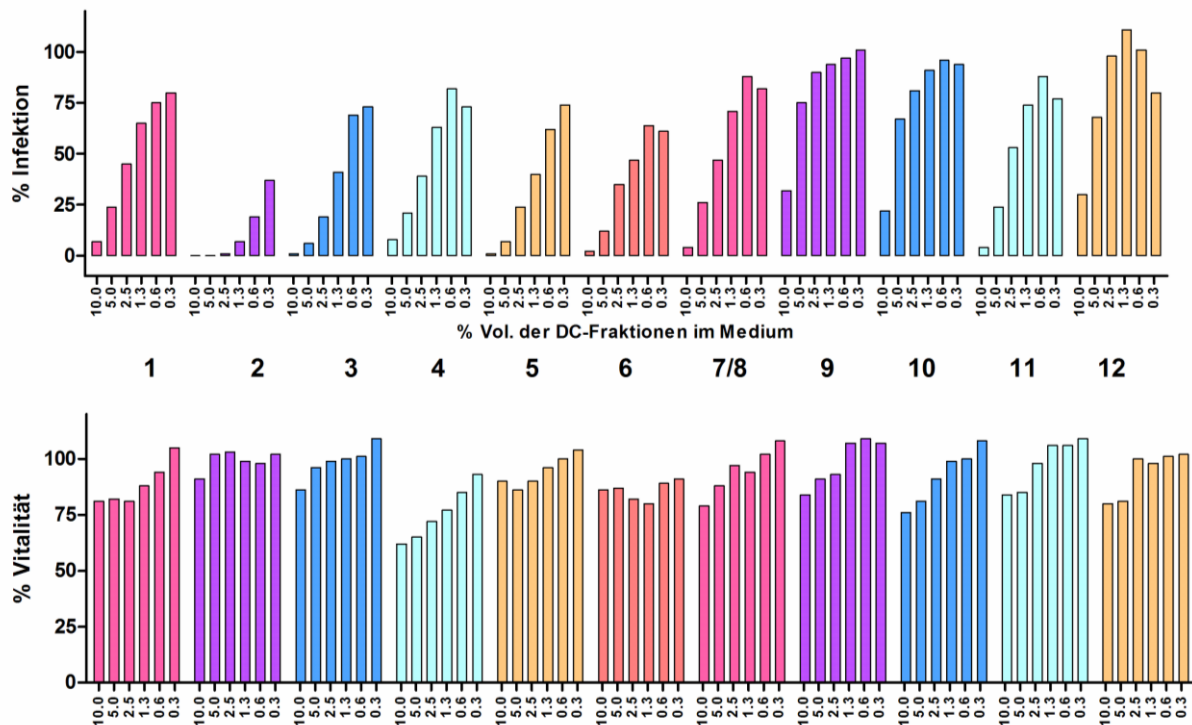


Abbildung 39: Aktivität der DC-Fraktionen von PS im EASY-HIT System. Im oberen Teil ist das Ergebnis des Infektionsversuches dargestellt. Jede DC-Fraktion wurde in einer Verdünnungsreihe von 10 – 0,313 %Vol. in Medium getestet. Im unteren Teil ist das Ergebnis des dazugehörigen MTT-Testes abgebildet. Fraktion 7 und 8 wurden vor dem Test vereinigt, um das sehr geringe Volumen dieser Fraktionen zu kompensieren. Alle Werte wurden jeweils bezogen auf infizierte, nicht behandelte LC5-RIC Zellen (100%). Aufgrund wenig Ausgangsmaterials wurde hier nur eine 1-fache Bestimmung durchgeführt.

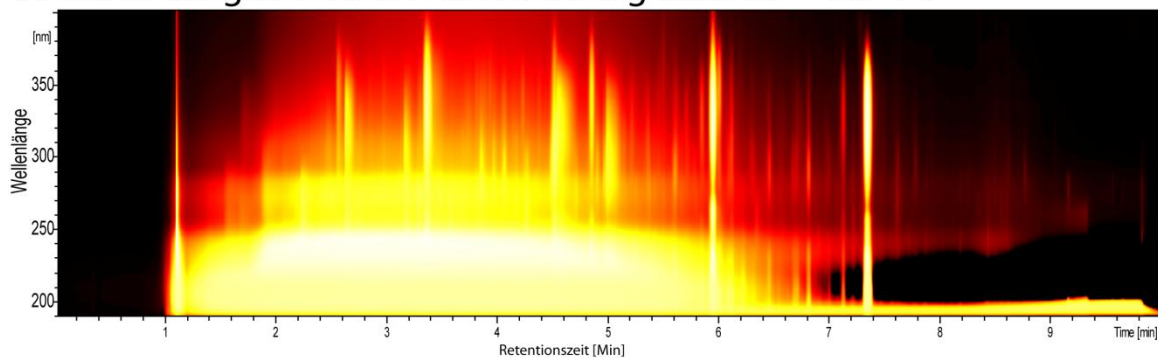
Diese Beobachtung legt nahe, dass es sich bei dem anti-HIV Effekt von PS tatsächlich um die Wirkung von mehreren Inhaltsstoffen handeln könnte. In Frage kommen hier die bereits erwähnten Benzopyranone, wie auch alle anderen Inhaltsstoffe von PS. Um diese Stoffe nun gezielt zu isolieren und Aktivitäten zuordnen zu können, wurde eine Methode zur Peak-orientierten Fraktionierung über die UPLC entwickelt (Abbildung 40). Als Orientierungspunkte fungierten die Signale bei den Wellenlängen 289 und 330 nm. 330 nm ist dieselbe Wellenlänge die auch von Hauer et al. zur Detektion der Benzopyranone in Umckaloabo® genutzt wurde (Hauer 2010). Allerdings konnte ich bei 289 nm eine Vielzahl mehr Signale erkennen (Abbildung 40B), die auch in die Wahl der Fraktionsbreite eingehen sollten.

### 3.2.3.2 Fraktionierung von PS mit dem Advion NanoMate via UPLC-MS

Zur Depletion von etwa Salzen und anderen Verunreinigungen sowie zum Equilibrieren des Extraktes (Verringerung der Konzentration von im Überschuss vorhandenen Molekülen, was

die Trennung über Flüssigchromatographie erheblich erschweren würde) wurde das Extrakt über verschieden beschaffene SPE-Säulen extrahiert und die Aktivitäten der jeweiligen Beladungsdurchflüsse, Waschdurchflüsse und erhaltenen Eluate getestet und verglichen. Hierzu wurde einerseits die Aktivität von jeder Fraktion im EASY-HIT System getestet, als auch ein UPLC-Chromatogramm erstellt (Daten nicht gezeigt). Die Vorreinigung über eine C8-SPE Säule zeigte sich am effektivsten bezüglich der Erhaltung der Aktivität des Eluats und der Separierbarkeit einzelner Signale in der UPLC. Das so vorgereinigte Extrakt wurde nach Injektion in die UPLC-Säule mit einem MeOH-Gradienten eluiert und das Eluat wurde in Peak-orientierten Fraktionen automatisch gesammelt (TriVersa NanoMate, Advion) während in Echtzeit ein kleiner Teil der jeweiligen Fraktion direkt in das Q-TOF Massenspektrometer weitergeleitet wurde, um gleichzeitig ein Echtzeit-Massenspektrum der Inhaltsstoffe aufzunehmen.

### A: Chromatogramm der Fraktionierung von 200 - 400 nm



### B: Extrahierte Chromatogramme für 330 (blau) und 289 (schwarz) nm

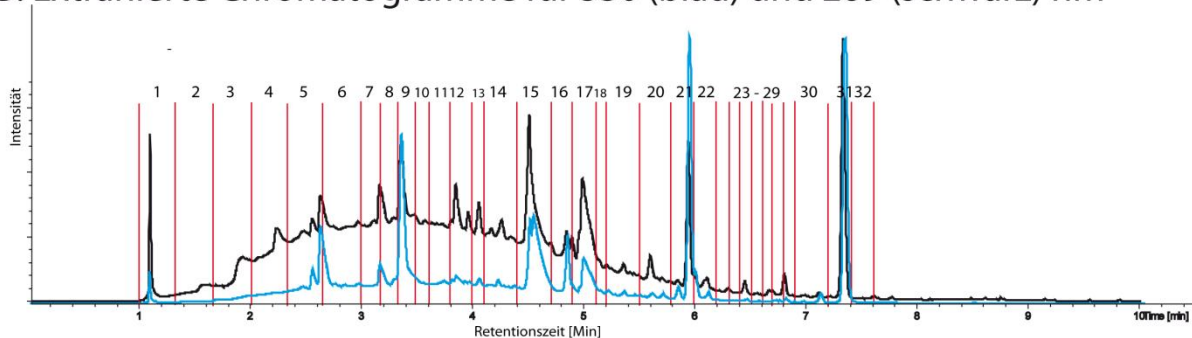


Abbildung 40: Die UPLC-MS gekoppelte Fraktionierung des PS- Extraktes. (A) UPLC-UV-Chromatogramm der graduellen Elution von PS über 7 Minuten und einem Wellenlängenbereich von 200 – 400 nm. Die Intensität der Signale ist von schwarz, rot, gelb nach weiß zunehmend. Die Y-Achse zeigt den Wellenlängenbereich. (B): Extrahierte UV-Chromatogramme für 289 (schwarze Linie) und 330nm (blaue Linie). Die X-Achsen in A und B geben die Retentionszeit in Minuten an. Die vertikalen roten Linien geben die jeweiligen Fraktionsbreiten der Fraktionen 1-32 an. Die Fraktionsnummern sind jeweils darüber angegeben. Die Bestimmung der Fraktionsbreite erfolgte manuell anhand des NanoMate Protokolls (siehe 2.2.20).

Die 37 gesammelten Fraktionen (36 + 1 Überhang) wurden im EASY-HIT System auf Aktivität getestet. In der Platte, auf der die Fraktionen 33 – 36 getestet wurden hatte der Zellrasen leider große Löcher, deswegen konnte die Aktivität dieser Fraktionen nur per



Mikroskop bestimmt werden. Da dort keine Aktivität zu erkennen war, werden sie für diese Auswertung der EASY-HIT Daten nicht berücksichtigt. Die in Abbildung 41 dargestellten Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass mehrere Komponenten für die Aktivität von PS verantwortlich zu sein scheinen. Die aktivsten Fraktionen waren bei diesem Versuch Nummer 5, 6 und 7, sowie 9 (eine übersichtlichere Darstellung bietet Abbildung 45A). Allerdings sollten wegen der diversen Schritte bei der Präparation der Fraktionen (Eindampfen, Lösungsmitteltausch, eventuelle Verschleppung bei der sequentiellen Elution über die UPLC-Säule usw.) die Bereiche der beobachteten Aktivität etwas ausgedehnt werden. Somit ergaben sich folgende, eventuell zusammen gehörende Fraktionsgruppen: 1-2, 3, 5-7, 8-10, 12-13, 15-16 und evtl. 20-21. Insgesamt zeigten sich also 8 Fraktionen als stark aktiv (3, 5-10, 12), 10 Fraktionen als mäßig aktiv (1-2, 11, 14, 15-18, 20-21) und 18 Fraktionen als nicht aktiv.

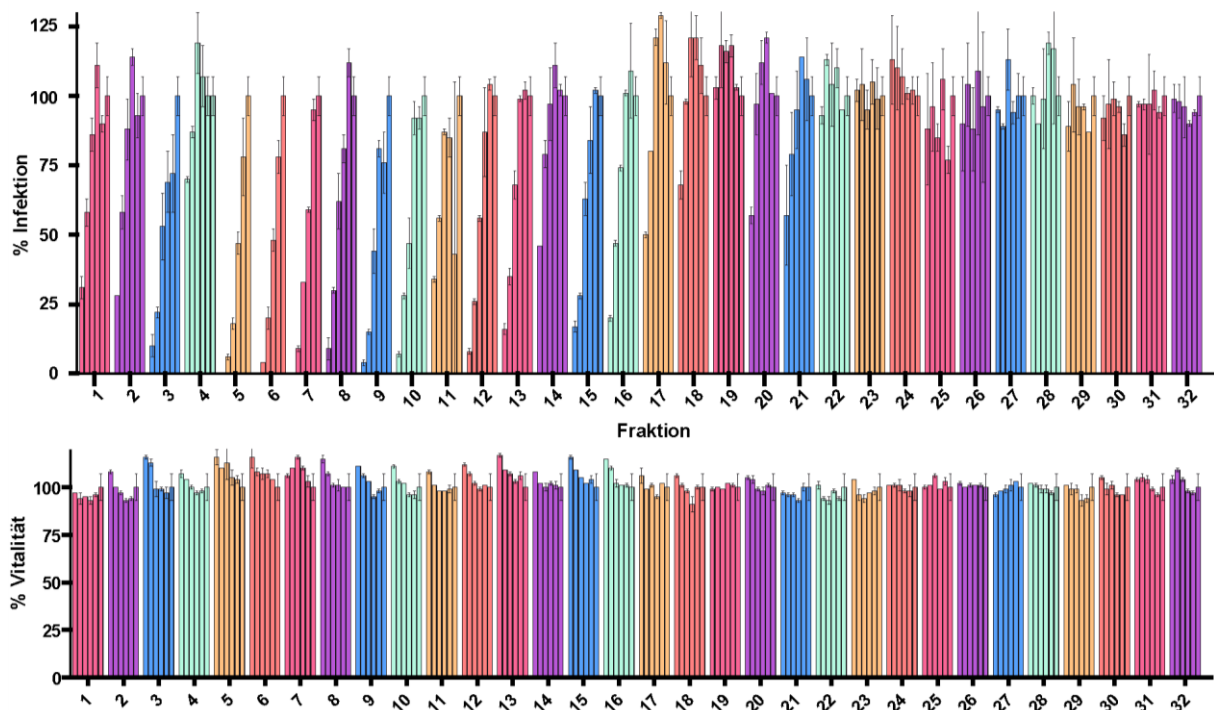


Abbildung 41: Untersuchung der anti-HIV Aktivität der Fraktionen im EASY-HIT System. Oben: Jede Fraktion (1-32) wurde in 5 linear verdünnten Konzentrationen im EASY-HIT System getestet. Der letzte dargestellte Wert einer jeden Fraktion stellt 0 % Fraktion dar (100% Infektion). Unten: Die dazugehörigen MTT-Daten. Alle dargestellten Daten sind ein Mittel aus zwei Datenpunkten. Die Fraktionen 33 bis 37 sind hier nicht dargestellt, da eine kreisrunde Ablösung der Zellen in der Mitte der Wells der entsprechenden Platte keine Messung zuließ. Jedoch wurden die Wells mit dem Mikroskop untersucht und dabei wurde keine inhibitorische Aktivität in den verbleibenden Zellen festgestellt.

### 3.2.3.3 Massenspektroskopische Analyse aller Fraktionen und erste Auswertungen

Die einzelnen Fraktionen wurden zusätzlich im Fourier Transformations-Ionen Cyclotron Resonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS) in beiden Modi für positive und negative

Ionisation analysiert. Zur weiteren Auswertung wurden die Daten der Messung mit negativer Ionisation herangezogen, da Cumarine und andere, hydroxylierte (R-OH), sulfatierte (R-SO<sub>3</sub>) und methoxylierte (R-OCH<sub>3</sub>) Gruppen hierbei hervortreten. Bei der Messung von Fraktion 7 traten Probleme auf, deswegen konnten die erhobenen Daten für diese Fraktion nicht ausgewertet werden. Insgesamt konnten in allen anderen 36 Fraktionen 8860 verschiedene Molekülmassen insgesamt 56572-mal detektiert werden. Um diese große Datenmenge zu bewältigen entschied ich mich für folgendes Verfahren: Als Hintergrund und Verunreinigung wurden dabei solche Massen definiert, die sich 5 bis 36-mal wiederholten. 6275 Massen konnten in nur maximal 4 Fraktionen detektiert werden. Von diesen Massen wurden in dieser ersten Auswertung nur die berücksichtigt, die eine Intensität von mindestens 2E7 aufwiesen (mindestens 1-mal von bis zu 4 Wiederholungen). Gleichzeitig durften sie bei Vorkommen in nicht-aktiven Fraktionen nur eine Intensität von maximal 1E7 aufweisen. Zur Veranschaulichung der Vorgehensweise sind die jeweiligen Schritte in nachfolgender Abbildung 42 aufgezeigt. Diese 195 verbleibenden Massen ließ ich jeweils durch das Online-Programm MasSTRIX analysieren. Es konnten einige dieser Massen annotiert werden. Diese Annotationen wurden danach noch einmal durch manuellen Ausschluss der nicht glaubwürdigen Annotationen reduziert. Übrig blieben 7 Flavonoide, 2 Derivate der D-Vitamine D2 und D3, zwei der für *Pelargonium sidoides* charakteristischen cyclischen Purine cAMP und cGMP (Schoetz 2008). Von den von Hauer et al. beschriebenen 15 charakteristischen Cumarinen waren 3 in den Datenbanken gelistet. Eine zweite Auswertung durch MasSTRIX, bei der ich jeweils die 100 höchsten Massen jeder Fraktion ungeachtet der Intensität eingab ergab zwar eine höhere Ausbeute an annotierten Fettsäuren, C13-Isotopen der jeweiligen Flavonoide, Purinen, D-Vitaminen und einigen anderen, aber alle Daten hier aufzuzeigen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, zudem keine weiteren der Massen mit Intensität über 2E7 identifiziert wurden.

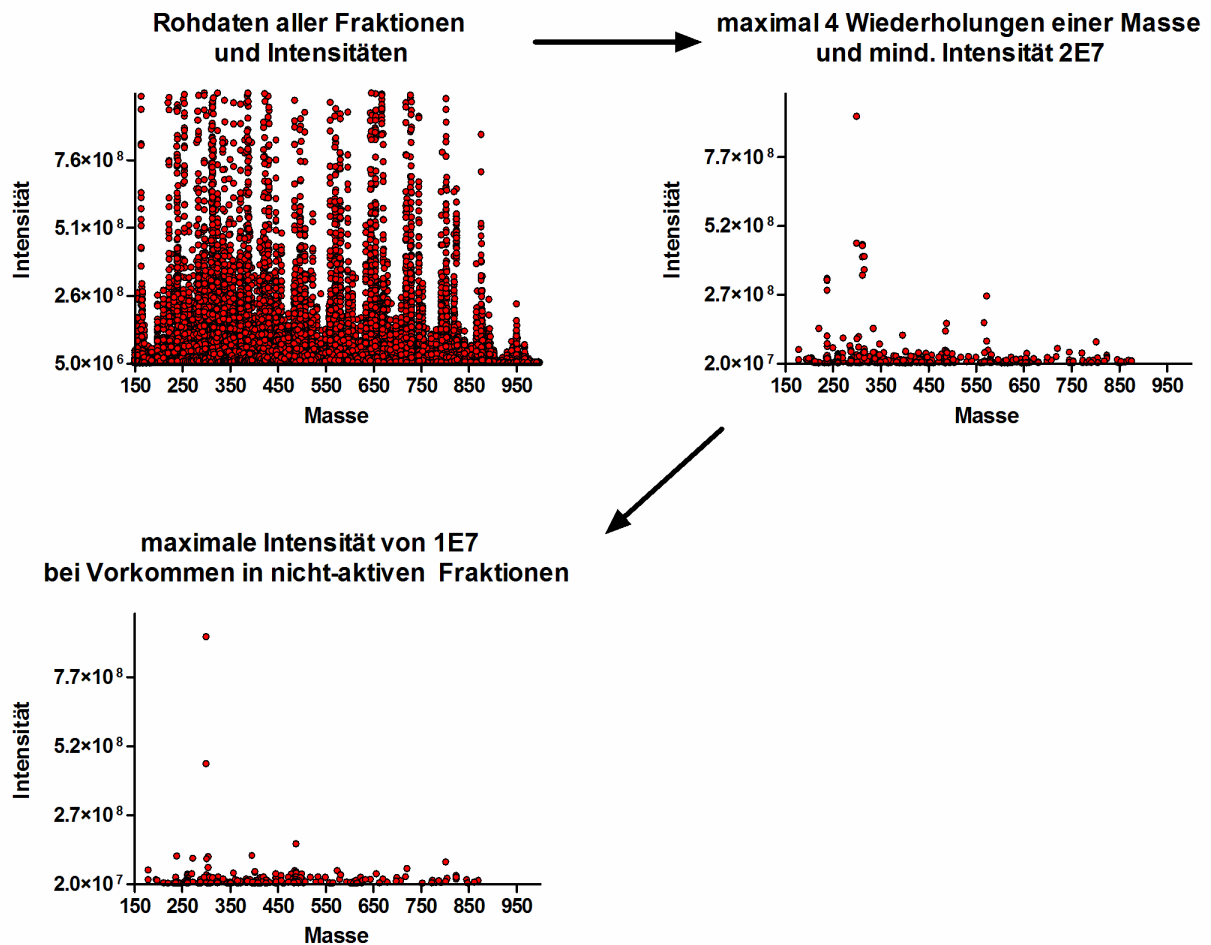


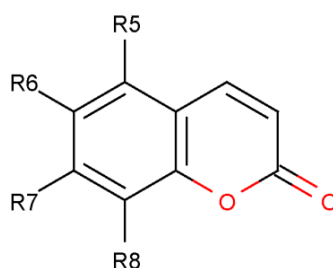
Abbildung 42: Darstellung der Datenreduzierung für die erste Analyse der Massenspektren. X-Achsen: Molekülmasse; Y-Achsen: Intensität im FT-ICR-MS. Links oben: Alle Rohdaten aller Fraktionen. Rechts oben: Massen mit maximal 4 Wiederholungen in allen Fraktionen. Links unten: Massen aus rechts oben, die bei Vorkommen in einer nicht-aktiven Fraktion maximal eine Intensität von  $1E7$  aufweisen.

MassTRIX korrigiert zuerst den eingegebenen Messwert der Massen um die jeweilige Ionisierung (hier  $+ 1H^+$ ) und ermittelt dann die wahrscheinlichste Summenformel. Diese wird dann mit den bestehenden Datenbanken verglichen. Manche Massen werden dabei auch gelisteten Molekülen zugeordnet, die in Pflanzen beispielsweise gar nicht vorkommen. Die Aussortierung dieser Moleküle erfolgte per Hand. In diesem ersten Level der Auswertung konzentriere ich mich auf die Darstellung der häufig in der Literatur erwähnten Cumarine und den gefundenen Flavonoiden. Die in der Literatur für *Pelargonium sidoides* von Hauser et al. als charakteristisch beschriebenen Cumarine sind in Abbildung 43 dargestellt. Identifiziert wurden sie bis auf Scopoletin (Nr. 3) und Fraxetin/Fraxetin-Isomer (Nr. 11/13) (durch MassTRIX annotiert) mittels manueller Auswertung. In den aktiven Fraktionen fanden sich Nr. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8/9, 11/13 und 12/14. Allerdings zeigten Nr. 1, 3, 5 und 7 keine Intensitäten über  $2E7$ . Cumarin Nummer 10 und 15 konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Nr. 1 (Umckalin) war in nicht-aktiven Fraktionen in größeren Intensitäten vorhanden, scheidet deshalb als aktive Substanz aus. Nummer 2, 4, 6, und 8/9 konnten zusätzlich durch

MS/MS-Fragmentierung bestätigt werden. Dabei wurde durch Anlegen einer Spannung das Abspalten einer  $\text{SO}_3$ -Gruppe verursacht, was in einer Zunahme des kleineren Produktes resultierte. Dies ist in nachfolgender Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: MS/MS-Fragmentierung einiger der gefundenen Cumarine zur Bestätigung der Identität. Durch Anlegen einer Kollisionsspannung von 5 V während der Messung im FT-ICR-MS wurde eine  $\text{SO}_3$ -Gruppe mit der Masse von etwa 80 g/mol von dem jeweiligen Cumarin abgespalten. Die gemessene Intensität des jeweiligen kleineren Produktes steigt dabei an.

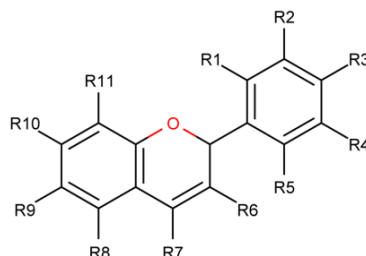
Cumarin – Masse $[\text{M-H}]^-$	MS/MS $[\text{M-H}]^-$
<b>Nr. 2 – 301,00</b>	221,05
<b>Nr. 4 – 270,99</b>	191,03
<b>Nr. 6 – 316,99</b>	237,05
<b>Nr. 8/9 – 272,97</b>	193,01



Cumarin Nr.	Name	R5	R6	R7	R8
1	Umckalin	$\text{OCH}_3$	$\text{OCH}_3$	OH	H
2	5,6-Dimethoxy-7-sulfoxycumarin	$\text{OCH}_3$	$\text{OCH}_3$	$\text{OSO}_3\text{H}$	H
3	Scopoletin	H	$\text{OCH}_3$	OH	H
4	6-Methoxy-7-sulfoxycumarin	H	$\text{OCH}_3$	$\text{OSO}_3\text{H}$	H
5	5,6-Dimethoxy-7,8-dihydroxycumarin	$\text{OCH}_3$	$\text{OCH}_3$	OH	OH
6	5,6-Dimethoxy-7-hydroxy-8-sulfoxycumarin	$\text{OCH}_3$	$\text{OCH}_3$	OH	$\text{OSO}_3\text{H}$
7	6,7,8-Trihydroxycumarin	H	OH	OH	OH
8	6-Sulfoxy-7,8-dihydroxycumarin	H	$\text{OSO}_3\text{H}$	OH	OH
9	8-Sulfoxy-6,7-dihydroxycumarin	H	OH	OH	$\text{OSO}_3\text{H}$
10	6,8-Disulfoxy-7-hydroxycumarin	H	$\text{OSO}_3\text{H}$	OH	$\text{OSO}_3\text{H}$
11	Fraxetin	H	$\text{OCH}_3$	OH	OH
12	6-Methoxy-7-hydroxy-8-sulfoxycumarin	H	$\text{OCH}_3$	OH	$\text{OSO}_3\text{H}$
13	Fraxetin-Isomer	H	OH	$\text{OCH}_3$	OH
14	7-Methoxy-8-hydroxy-6-sulfoxycumarin	H	$\text{OSO}_3\text{H}$	$\text{OCH}_3$	OH
15	6,8-Disulfoxy-7-methoxycumarin	H	$\text{OSO}_3\text{H}$	$\text{OCH}_3$	$\text{OSO}_3\text{H}$

Abbildung 43: Für *Pelargonium sidoides* charakteristische Benzopyranone (Cumarine) nach Hauser et al. 2009. Bis auf Nr. 10 und 15 konnten alle Cumarine nachgewiesen werden. R5 – R6: Rest 5 bis 6. Nr. 8/ 9 sowie 11/ 13 und 12/14 stellen jeweils zwei Isomere mit derselben molekularen Zusammensetzung dar, die im Massenspektrometer nicht voneinander unterschieden werden können.

Flavonoide die in mindestens einer Fraktion mit einer Intensität über 2E7 detektiert und von MassTRIX annotiert wurden sind in nachfolgender Abbildung 44 dargestellt. Da der jeweilige Isomerisierungszustand der oft sehr ähnlichen Moleküle bei gleicher Masse und Summenformel im FT-ICR-MS nicht eindeutig bestimmt werden kann, sind für manche annotierte Substanzen mehr als eine mögliche Identität angegeben.



MassTrix Annotation	in Fraktion	gemessene Masse [M-H]	korrigierte Masse [M]	Summenformel	Fehler in ppm	HIV/OI Datenbank
Leucocyanidin und/oder (+/-)-Gallicocatechin	(5), 6, 9, (21)	305,06668	306,07396	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	0,020	nein/ja (5 - 8 µg/ml)
Cis-3,4-Leucopelargonidin und/oder (+/-)-Catechin	9, 10, (21)	289,07178	290,07906	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	0,074	nein/ja (5 - >100 µg/ml)
Chrysopterin und/oder Scuticoflavone II	1, 3, (5, 9)	373,09281	374,10009	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	-0,210	nein/nein
Taxifolin und/oder Pentahydroxyflavanon	(6,) 9, 15	303,05101	304,05828	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	-0,070	ja (13 - < 250 µg/ml)/nein
Gallicocatechin-(4α->8)-epigallocatechin	(2,) 6	609,12500	610,13227	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	0,026	nein
Leucodelphinidin	(6,) 9	321,06161	322,06889	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	0,059	nein
Afzelechin und/oder 5-Deoxyleucopelargonidin	21	273,07680	274,08408	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	-0,172	nein/nein

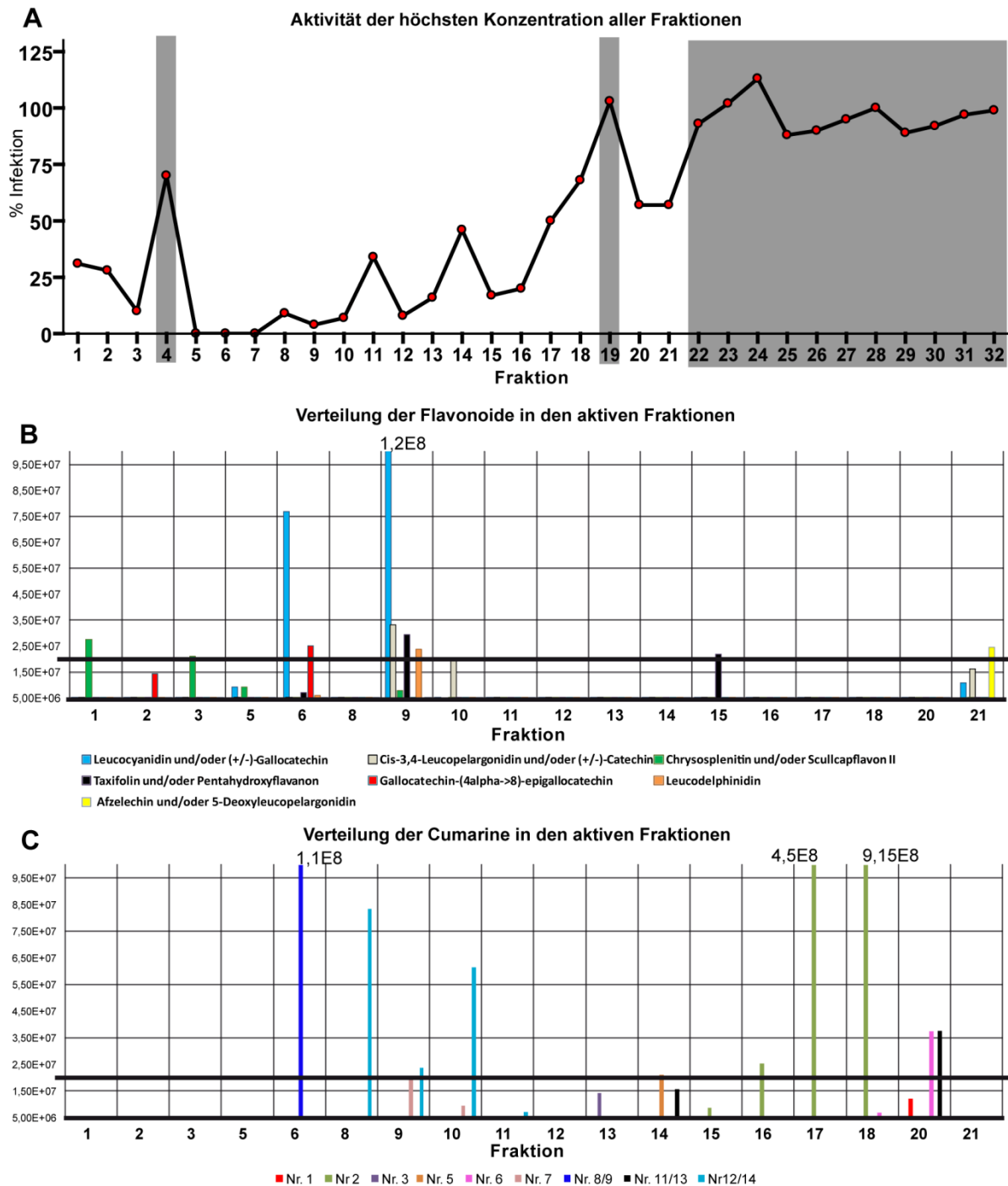
Abbildung 44: Die Flavonoide mit über 2E7 Signalintensität im FT-ICR-MS in mindestens einer Fraktion. Oben: Das Grundgerüst der Flavonoide. R1-11 zeigen substituierbare Positionen an. Unten: Tabellarische Darstellung der identifizierten Flavonoide. V.l.n.r.: Die MassTRIX Zuordnung zur jeweiligen Masse; in welchen Fraktionen kommt das Molekül mit einer Intensität von mindestens 2E7 vor (Zahlen in Klammern deuten an, dass das Flavonoid mit einer Intensität von <2E7 gefunden wurde); die im negativ-Modus (negative Ionisierung; -1 H<sup>+</sup>) gemessene Masse; die korrigierte, neutrale Masse (+ 1 H<sup>+</sup>); die errechnete wahrscheinlichste Summenformel; die Abweichung zur gemessenen Masse als Fehler in ppm („parts per million“; der gewählte Grenzwert betrug 1 ppm) und ob die Moleküle in der NIAID anti-HIV Wirkstoffdatenbank des NIH als anti-HIV aktiv gelistet sind. Wenn ein Molekül als aktiv gelistet ist steht hinter der Bezeichnung „ja“ in Klammern der IC<sub>50</sub>-Wert.

Anzumerken sei dass, wie in Abbildung 44 zu sehen, einige der gefundenen Moleküle als anti-HIV aktiv gelistet sind. Allerdings liegen die angegebenen IC<sub>50</sub>-Werte bereits im Bereich oder weit über dem IC<sub>50</sub>-Wert des rohen Extraktes. Zur deutlicheren Veranschaulichung ist die Verteilung der Flavonoide und Cumarine mit einer Intensität über 2E7 zwischen den einzelnen, aktiven Fraktionen in nachfolgender Abbildung 45 dargestellt. Bei den Flavonoiden erscheint Leucocyanidin und/oder (+/-)-Gallicocatechin als dominantester Vertreter in Fraktion 6 und einem Maximum in Fraktion 9, in 5 und 21 unter 2E7. Cis-3,4-Leucopelargonidin und/oder (+/-)-Catechin konnte(n) in Fraktion 9 und 10 (unter 2E7 in 21), das oligomere Gallicocatechin-(4α->8)-Epigallocatechin in Fraktion 6 und unter 2E7 in

Fraktion 2 bestimmt werden. Die von MassTRIX den Substanzen Chrysoplenetin oder Scullcapflavon II zugeordnete Masse tritt auf in Fraktion 1 und 3, in 5 und 9 in Spuren. Leucodelphinidin tritt ebenfalls in Fraktion 9 auf, in sehr geringen Spuren in 6. Taxifolin und/oder Pentahydroxyflavanon konnte(n) in Fraktion 9 und 15 (Spuren in 6), Afzeletin und/oder 5-Deoxyleucopelargonidin lediglich in Fraktion 21 detektiert werden.

Cumarin Nr. 1 (Umckalin) tritt unter dem Schwellenwert von  $2E7$  in Fraktion 20 auf. Cumarin Nr. 2 unter dem Schwellenwert von  $2E7$  in Fraktion 15, dann stark ansteigend in 16, 17 und 18. Nr. 3, 5 und 7 sind schwach vertreten, während die Cumarine Nr. 8/9 als prominentester Peak exklusiv in Fraktion 6 vorhanden sind. Nr. 12/14 eluierten in Fraktion 8 und 10, mit einer leichten Überlappung in 9.

Abbildung 45 (nächste Seite): Verteilungsprofil der gefundenen Flavonoide und Cumarine in den aktiven Fraktionen. Dargestellt sind in A die jeweiligen Aktivitäten der höchsten Konzentration einer jeden Fraktion im EASY-HIT System. Nicht aktive Fraktionen sind grau hinterlegt. Diese sind in B und C zur besseren Veranschaulichung nicht dargestellt. Die Y-Achse zeigt hier die Infektion in %, die Y-Achse die jeweilige Fraktion. Dargestellt in B und C sind zum Vergleich die im FT-ICR-MS gemessenen Intensitäten für die Flavonoide (B) und Cumarine (C) in den aktiven Fraktionen. Die Y-Achsen in B und C zeigen Intensitäten von  $5E6$  bis  $1E8$ , höhere Intensitäten sind über den jeweiligen Balken angegeben. Die X-Achsen in B und C zeigen die jeweiligen Fraktionsnummern. Die schwarze Linie zeigt den Cut-Off bei einer Intensität von  $2E7$  an.



Weitere Experimente wie zum Beispiel nicht-zielgerichtete Fraktionierungen mit einem sehr breitem Molekülklassenspektrum und schmalen Fraktionsbreiten (höhere Auflösung) müssen zur genauen Identifikation der übrigen prominenten, noch unbekanntesten Massen herangezogen werden. Dies war in der vorgegebenen Zeit leider nicht mehr möglich.

Zusammenfassend kann an diesem Punkt festgehalten werden, dass ein Extrakt der Wurzeln von *Pelargonium sidoides*, ähnlich dem phytomedizinischen Präparat Umckaloabo®, den Eintritt von HIV in die Wirtszelle inhibiert. Charakteristisch für die beobachtete Aktivität scheinen hierbei Flavonoide und Cumarine zu sein, da einige Vertreter

dieser Molekülklassen nach Fraktionierung des Extraktes in den aktiven Fraktionen überrepräsentiert vorkamen, im Vergleich zu schwach oder nicht aktiven Fraktionen.



## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung der LC5-RIC HIV Indikatorzelllinie

#### 4.1.1 Zelluläre Voll-Replikationssysteme bieten Vorteile bei der initialen Identifizierung von Inhibitoren

Um Inhibitoren der HIV Replikation zu Identifizieren existieren biochemische und zelluläre Testsysteme. Enzymatische *in-vitro* Assays wie zum Beispiel für die Messung der Aktivität der reversen Transkriptase oder der HIV-Protease liefern ein genaues und spezifisches Ergebnis. Die theoretische Gefahr einer falsch-positiven Schlussfolgerung wird stark verringert, da die Aktivität des gewünschten Enzyms außerhalb des zellulären bzw. viralen Kontexts untersucht wird. Mit einem biochemischen Assay können Testsubstanzen im Hochdurchsatz auf Aktivität untersucht werden. Aktive Substanzen müssen daraufhin in einem HIV-Replikationssystem validiert werden, da ein Inhibitor in der Lage sein muss, die gesamte HIV-Replikation zum Erliegen zu bringen. So erbrachte ein Screen von 550000 Einzelsubstanzen mit einem biochemischen Assay zur Untersuchung der Rev/RRE-Interaktion 248 Hits, von denen aber kein einziger in einem zellulären HIV-Replikationssystem bestätigt werden konnte (Mills et al. 2007). Auch die Einflüsse einer Substanz auf menschliche Zellen wie Toxizität können mit enzymatischen Tests nicht überprüft werden. Gerade HIV bietet mit seinen vielen und teilweise sehr gut bekannten aber auch unbekanntem Replikationsschritten viele verschiedene Angriffspunkte. Dies ist der entscheidende Vorteil von zellulären Voll-Replikationssystemen, mit denen alle Schritte im HIV-Replikationszyklus im Kontext der HIV-Infektion gleichzeitig beachtet werden können. Zum Beispiel bietet der virale Eintritt alleine mit der Anlagerung des Virus an die Zelle über die gp120 Bindung an CD4 und CXCR4 oder CCR5 und die durch Konformationsänderungen von gp41 eingeleitete Fusion der Membranen von Virus und Zelle schon mehrere verschiedene Ziele für potentielle Inhibitoren. Zusätzlich können im Zellsystem neue, von der Wirkstoffforschung bisher noch nicht beachtete Ziele im HIV-Replikationszyklus identifiziert werden.

Ein biochemischer Assay kann zusätzlich oder nachgeschaltet dazu dienen, die im Zellsystem beobachtete Inhibition der exakten Zielstruktur im HIV-Replikationszyklus zuzuordnen, oder synthetische Derivat-Bibliotheken der aktiven Substanz auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu untersuchen. Das hier entwickelte und beschriebene EASY-HIT System stellt mit seinen Eigenschaften also einen klaren Vorteil bei der Inhibitorsuche dar, bei dem auf einmal alle relevanten HIV Replikationsprozesse auf viraler als auch zellulärer Seite beachtet werden.

#### 4.1.2 Charakterisierung der LC5-RIC Zelllinie

Um ein zelluläres Testsystem effizient und nachhaltig nutzen zu können, benötigt man die Gewährleistung der Aufrechterhaltung der spezifischen zellulären Eigenschaften, die die HIV-Indikatorzellen auszeichnen. Dazu zählt die stabile Expression der Oberflächenrezeptoren CD4, CXCR4 oder CCR5, sowie die Erhaltung der Induzierbarkeit der Reporterexpression durch die HIV-Infektion. Durch die Kopplung des Reportergens und der Gene für die Expression der Oberflächenrezeptoren CD4 und CCR5 mit Genen, die eine Resistenz gegen die Selektionsantibiotika Geneticin und Hygromycin B vermitteln sowie die regelmäßige Kontrolle dieser Eigenschaften konnte ein hohes Maß an Zuverlässigkeit der Zellen diesbezüglich erreicht werden, wie in Abbildung 11 dargestellt ist. Die Tatsache, dass die LC5-RIC und LC5-RIC-R5 Zellen eine hohe Dichte der infektionsrelevanten Oberflächenrezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5 aufweisen, stattet diese Zellen mit einer hohen Suszeptibilität für Virenstämme mit verschiedenen Tropismen für CXCR4 oder CCR5 aus. Zusätzlich macht es den Einsatz von infektionsverstärkenden Agenzien wie z.B. DEAE-Dextran, das man zum Beispiel für die ebenfalls von HeLa-Zellen abgeleiteten MAGI oder TZM-BL HIV-Indikatorzellen verwendet (Kimpton and Emerman 1992; Wei et al. 2002) überflüssig. Die Intensität des erzeugten, messbaren Signals, wurde vor allem auch durch die Perfektionierung der Handhabung und des genutzten Materials optimiert. Unter anderem die Einführung der Liquidator96 Pipettierhilfe sowie die Bestimmung der idealen Zellkulturplatten und die Fein-Kalibrierung von Parametern wie Volumina, Inkubationszeiten usw. ermöglichten die Erzeugung eines konstanten und starken Signals. Die initiale Reporterproduktion als direkte Antwort auf eine erfolgte Infektion mit HIV findet im EASY-HIT System wie auch in anderen Systemen (Gervaix 1997; Ochsenbauer-Jambor et al. 2006; Wu et al. 2007) während der frühen Phase des HIV Replikationszyklus statt. Anders als jedoch in den erwähnten Systemen ermöglicht der 2-stufige Aufbau des EASY-HIT Systems auch eine Abdeckung der späten Phase, also die Reifung neuer infektiöser Partikel (Abbildung 18). Dies wird durch den Übertrag des Überstandes der primär infizierten Zellen auf frische Zellen und die erneute Messung der Reporterexpression in diesen Zellen erreicht. Durch diese praktische Messung der Produktion infektiöser Partikel in den primär infizierten Zellen, werden Ergebnisse beobachteter Hemmungen in der frühen Phase wiedergespiegelt, da jede Inhibition in dieser Phase auch in einer verminderten Produktion neuer Viren resultieren sollte. Zum anderen erhält man bereits nach Durchlauf des Standard EASY-HIT Tests eine Information über die Phase, in der ein potentieller neuer Inhibitor eingreift. Denn ein Inhibitor beispielsweise der HIV Protease zeigt eine wesentlich stärkere Reduktion der Rotfluoreszenz in Schritt 2 als in Schritt 1 (Abbildung 19). Speziell die späte Phase ist nach wie vor sehr interessant um neue anti-HIV Wirkstoffe zu entwickeln, da sie gegenüber

Inhibitoren der frühen Phase effektiver darin sein könnten die Viruslast *in vivo* zu senken (Donahue et al. 2010).

#### 4.1.3 Vorteil der Abhängigkeit der Reporterexpression von HIV Tat und Rev

Viele HIV-Reportergene basieren wie das EASY-HIT System auf der HIV-LTR als Promotor der Transkription (Kimpton and Emerman 1992; Gervaix 1997; Blair et al. 2005; Ochsenbauer-Jambor 2006; Chiba-Mizutani 2007), die nach erfolgter Infektion der Zellen mit HIV von Tat aktiviert wird. Allerdings besitzt die HIV-LTR eine essentielle basale NF $\kappa$ B-abhängige Aktivität zur Initiation der HIV Expression und eine gewisse Kapazität zur Aktivierung als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli. Das führt in HIV-Reportersystemen zu der oft beobachteten Hintergrundexpression der LTR-abhängigen Reporterproteine (Rocancourt 1990; Vodicka et al. 1997; Wu 2007). Diese Hintergrundexpression kann aber durch die Einführung von zusätzlichen regulatorischen Elementen für die Rev-abhängige Expression abgeschaltet werden. Wu et al. demonstrierten dies, indem sie die Reporter-Hintergrundexpression in CEM Reporterzellen durch die Einführung eben dieser zusätzlichen Rev-Abhängigkeit der Reporter-Expression reduzierten. Die LC5-RIC Zellen besitzen deswegen eben diese doppelte Abhängigkeit der Reporter-Expression von Tat und Rev (Wolff et al. 2003; Wolff 2006) und wie in Abbildung 15 gezeigt gibt es keinerlei messbare Hintergrundexpression von *DsRed1* in den nicht-infizierten LC5-RIC Zellen.

#### 4.1.4 Vorteil von *DsRed1* als Reporterprotein

Die Wahl von *DsRed1* anstatt beispielsweise GFP bringt einige Vorteile mit sich. Neben der Tatsache das eukaryotische Zellen eine gewisse Autofluoreszenz im gelben bis leicht grünen Wellenlängenbereich besitzen, was das Signalfenster zwischen Hintergrund und maximalem Signal verkleinern könnte, besitzen einige Reporterproteine wie GFP relativ kurze Reifungszeiten (Luna et al. 2010). Da im EASY-HIT System aber der ganze Replikationszyklus von HIV über etwa 48 Stunden lang beobachtet werden soll und nach dieser Zeit auch die Messung der Fluoreszenz vorgenommen wird, ist eine schnellere Reifung des Proteins eher nicht gewünscht, um etwaige Sättigungseffekte oder gar Toxizität zu vermeiden. *DsRed1* besitzt mit seiner Reifungszeit von über 30 Stunden (Baird et al. 2000) die idealen kinetischen Eigenschaften um als Indikator für eine Messung nach 48 Stunden zu dienen, da kurz vor diesem Zeitpunkt auch die Freisetzung neuer Viren in den Überstand in die exponentielle Phase eintritt (Abbildung 13D). Zudem bietet sich die Möglichkeit weitere fluoreszierende Marker einzusetzen um zusätzliche Informationen zu diversen Prozessen zu erhalten wie etwa mit GFP markierte Viren (Muller et al. 2004; Hubner et al. 2007) um zum Beispiel den Prozess des Knospens neuer Viren zu Visualisieren. Desweiteren kann ein zusätzliches, HIV-unabhängiges Gen für die konstitutive Expression von z.B. YFP (gelb fluoreszierendes Protein) oder GFP als Marker für die Vitalität

der Zellen eingesetzt werden. Eine von LC5-RIC-R5 abgeleitete Zelllinie mit einem YFP (gelb fluoreszierendes Protein)-kodierenden Gen als Vitalitätsmarker befindet sich zurzeit in der Arbeitsgruppe in der Validierungsphase.

#### **4.1.5 Vorteile der von HeLa-Zellen abgeleiteten LC5-RIC gegenüber anderen HIV-Indikatorzellen**

HIV Indikatorzelllinien stammen häufig entweder von T-Zell-Leukämie Zelllinien (Gervais 1997; Ochsenbauer-Jambor 2006; Wu 2007) oder von HeLa Zelllinien (Kimpton and Emerman 1992; Wei 2002; Montefiori 2009) ab. Die Eigenschaft von HeLa Zellen adhärenz zu wachsen ist für unsere Zwecke im Gegensatz zu anderen HIV Indikator Zelllinien ein weiterer klarer Vorteil des Systems. Wie in Abbildung 12 dargestellt erhält man durch den gleichmäßigen Bewuchs des gesamten Bodens eines jeglichen Zellkulturgefäßes ein einheitliches Signal. Dieser Bewuchs in einer Ebene ermöglicht auch eingehende morphologische Untersuchungen mittels visueller Techniken wie Mikroskopie und High-Content Analysen zu Veränderungen diverser zellulärer Strukturen als Antwort auf eine Infektion oder einen Inhibitor.

Die Handhabung einiger herkömmlicher HIV-Indikatorzelllinien ist im Vergleich zu der LC5-RIC Zelllinie wesentlich aufwändiger. So müssen beispielsweise die ebenfalls HeLa basierten MAGI-Zellen (HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal) vor der Infektion mit DEAE-Dextran dahingehend stimuliert werden, um die Infektionseffizienz zu erhöhen. MAGI-Zellen benutzen die  $\beta$ -Galaktosidase als Reporter und müssen für die Messung daher zuerst fixiert, dann gewaschen, dann gefärbt, dann wieder gewaschen werden. Die Messung erfolgt dann visuell durch auszählen der blauen Zellen (Kimpton and Emerman 1992). Um einen Screen von über 1 Millionen Substanzen durchzuführen benutzte die Pharmafirma Pfizer ebenfalls diese Zelllinie (Cao et al. 2005). Der Test wurde durchgeführt, indem infizierte T-Zellen zu den adhärenz MAGI Zellen gegeben wurden, die vorher mit den Substanzen behandelt wurden. Nach 4 Tagen wurde die Auswertung der Experimente vorgenommen, die dem Schritt 1 des EASY-HIT Systems entsprechen. Diese lange Inkubationszeit war nötig, da erst mehrere HIV-Replikationsrunden die gewünschte Infektionsstärke hervorriefen. Zwar beschreibt Cao in der zugehörigen Veröffentlichung die hervorragende Eignung des sogenannten „HIV-1 Rep Assays“ zum Screen im Hochdurchsatzverfahren und ich möchte die Qualität der erhaltenen Daten in keiner Weise anzweifeln. Jedoch erscheint mir diese Art des Indikatorsystems bei dieser Anwendung dem EASY-HIT System in Aussagekraft, Handhabung und Arbeitsaufwand unterlegen. Denn das EASY-HIT System führt schneller zu einem Ergebnis (nur 2 Tage für Schritt 1 und 2 – 3 Tage für Schritt 2), man benötigt nur eine Zelllinie und der Nachweis des HIV-Reporters *DsRed1* ist sehr einfach nachweis- und quantifizierbar. Ähnlich verhält es sich mit den Assays, die Luciferasen als Reporter

benutzen. Auch diese Art des Reporters erfordert zusätzliche Schritte wie Lyse der Zellen und Zugabe der teuren Substrate der Luciferasen.

#### **4.1.6 Validierung des EASY-HIT Systems**

Zur Validierung des EASY-HIT Systems gehörte die Testung bereits bekannter Inhibitoren mit verschiedener Wirkungsweise gegen 6 Schritte im HIV-Replikationszyklus (Tabelle 5). Dazu gehörten die Anlagerung des Virus an die Zielzelle, die Fusion und die Reverse Transkription, die Integration des HIV-Genoms in das Wirtsgenom, die Expression der viralen Gene und schließlich die Reifung neuer, infektiöser Partikel. Dabei entsprachen die jeweiligen  $IC_{50}$ -Werte für die verschiedenen Inhibitoren im EASY-HIT System den für T-Zellen publizierten Werten (siehe Tabelle 5). Auch statistische Parameter zur Qualifizierung des EASY-HIT System zu größer angelegten Screenings und zum Vergleich mit herkömmlichen Testsystemen wurden erhoben (siehe Tabelle 4). Als Vorlage hierzu dienten die Richtlinien für die Entwicklung Screening-geeigneter Assays des „National Institute of Health Chemical Genomics Center“ kurz NCGC. Dabei wurde das produzierte Signal auf Reproduzierbarkeit, Zuverlässigkeit, Robustheit und Qualität geprüft. Mit einem  $Z'$ -Wert von 0,97 unter Validierungsbedingungen und 0,94 unter Screening-Bedingungen (Vorgabe  $\geq 0,4$ ). Dies entspricht per Definition einem exzellenten Assay (Zhang et al. 1999). Zusammen mit einem CV-Wert von  $\leq 2\%$  (Vorgabe  $\leq 20\%$ ) und einem durchschnittlichen Signalfenster von etwa 100 (Vorgabe  $\geq 2$ ) zeigten sich die LC5-RIC Zellen als durchaus konkurrenzfähig, da andere Systeme beim Screen der LOPAC<sup>1280</sup> Bibliothek  $Z'$ -Werte von 0,72 – 0,84 erreichten (Blair 2005; Ochsenbauer-Jambor 2006; Garcia et al. 2009).

Durch eine Kombination aller bei der Charakterisierung erhaltenen Daten wurde der Standard EASY-HIT Test entwickelt. Diese Test ist optimiert auf eine einfache Handhabung, Ressourcen und Zeit-Ersparnis. So wurde der Screen der LOPAC<sup>1280</sup> Bibliothek im Triplikat in 6 Tagen durchgeführt. Einziges technisches Hilfsmittel hierbei war der Liquidator<sup>96</sup>, eine rein mechanische, 96-Kanal Pipettierhilfe. EASY-HIT ist somit potentiell geeignet, um auch Screens größerer Substanzbibliotheken durchzuführen.

#### **4.1.7 Der Time-Of-Addition Assay (TOA) als schnelles System zur Eingrenzung von möglichen Zielstrukturen eines potentiellen Inhibitors**

Um relativ schnell eine Vorstellung über einen inhibierten Schritt im HIV Replikationszyklus zu erhalten, etablierte ich für das EASY-HIT System ein Time-Of-Addition Assay (TOA). Dieser Test ermöglicht die Einordnung eines potentiell neuen Inhibitors in den zeitlich sequentiellen Ablauf der Infektion und Replikation von HIV in den LC5-RIC Zellen. TOAs wurden schon häufiger eingesetzt, um Inhibitionen gegen bestimmte Zielstrukturen zu belegen (Schols et al. 1997; Pluymers et al. 2000; Matthys et al. 2010). Beim TOA wird gemessen, in welchem Zeitrahmen nach der Virus-Exposition der Zellen es möglich ist,

durch Zugabe eines Stoffes die Infektion noch zu verhindern, bzw. die Bildung neuer infektiöser Partikel zu unterdrücken. Die Replikation von HIV unterliegt einer klaren zeitlichen Abfolge, nämlich der Anheftung an die Zelle, der Prozess der Fusion, gefolgt von der reversen Transkription des viralen RNA-Genoms in DNA und dessen Integration ins Wirtsgenom, die darauf folgende Initiation und Amplifikation der Transkription viraler Gene und schließlich Reifung und Abgabe neuer Viren in den Überstand (Abbildung 8). Mit einem TOA-Assay kann man diese Schritte der HIV-Replikation zeitlich voneinander trennen (Abbildung 21). Hat man nun einen neuen Inhibitor-Kandidaten gefunden, kann sein TOA-Profil mit dem von bekannten Referenzsubstanzen verglichen werden, um einen Hinweis auf den betroffenen Zielprozess zu erhalten. So sieht man zum Beispiel deutlich, dass die Inhibition der Anlagerung des Virus an die Zelle durch Zugabe des viruzidalen Griffithsin nur sehr kurzfristig nach der Virusexposition der Zellen geschehen kann. Das gp41-attackierende T-20, welches die Konformationsänderung von gp41 verhindert, ist über eine deutlich längere Zeitspanne wirksam. Obwohl diese Art des TOA sehr hilfreich für die Eingrenzung des inhibierten Schrittes im EASY-HIT System ist, muss für jedes Virus und jeden Zelltyp eine gesonderte Experimentreihe durchgeführt werden, da sich verschiedene Viren in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich verhalten könnten. Dies wird deutlich beim Vergleich der Ergebnisse für AZT im EASY-HIT System und der Arbeiten von Pannecouque et al, bei denen AZT und auch der Proteaseinhibitor Ritonavir etwas früher an Wirkung verliert (Pannecouque et al. 2002). Insgesamt jedoch gleichen sich die Tendenzen aller genannten TOAs aus der o.g. Literatur mit den hier vorgestellten Profilen. Eine Berechnung der von mir  $ET_{50}$ -genannten Werte wurde in der Literatur bereits durchgeführt und zum Vergleich verschiedener Substanzen herangezogen (Gustchina et al. 2008; Kopetzki et al. 2008). Gustchina et al. beschrieben hierbei sogar Unterschiede von wenigen Minuten als signifikant. Allerdings betrachten die 2 angeführten Veröffentlichungen nur ein sehr kurzes Zeitfenster. Ebenso kurz waren die Intervalle der Zugabe der Substanzen, die nur wenige Minuten betragen. Die Auflösungs-fähigkeit wurde somit erhöht. In den hier beschriebenen Experimenten betragen diese Intervalle meist 1 bis mehrere Stunden, über bis zu 60 Stunden. Auch zog ich zur Auswertung den 95% Konfidenzintervall heran, der den Bereich vorgibt, den die gefittete Kurve zu 95% Sicherheit durchläuft. Dies vergrößert einerseits auch den besagten  $ET_{50}$ -Wert, lässt aber auch definitive Unterscheidungen zwischen verschiedenen Zeitfenstern zu, in denen die  $ET_{50}$  der verschiedenen Klassen von Inhibitoren liegen. In Abbildung 24 ist beispielsweise deutlich zu sehen, dass sich Anlagerungs- und Fusionsinhibitor hier deutlich unterscheiden, obwohl ausgehend vom  $ET_{50}$  ein Toleranzfenster in beide Richtungen zugelassen wurde (95% Konfidenzintervall). Der Extrakt von *Echinacea purpurea* hingegen überschneidet sich hier mit dem der Integraseinhibitoren. Dies lässt eine Zuordnung der Inhibition zum Schritt der Integration durch *E. purpurea* zu.

Dies wiederum deckt sich mit den bereits beschriebenen Effekten der Inhibition der Integrase durch die Chicoriensäure, die Bestandteil des Extraktes ist (De Clercq 2000). Um nun beispielsweise CD4-Anlagerungsinhibitoren, Inhibitoren der Korezeptorbindung und Fusionsinhibitoren hochaufgelöst trennen zu können, wird momentan am Institut die Technik des hochauflösenden TOA etabliert (Betrachtung eines relativ kurzen Zeitfensters mit vielen Zugabezeitpunkten).

Die Substanzen Abyssinon IV, 3,12-DCA und ROY beispielsweise zeigen in ihren TOA-Profilen deutliche Tendenzen. Der 95% Konfidenzintervall von Abyssinon IV liegt genau zwischen denen der RT-Inhibitoren und der Integraseinhibitoren. Mögliche Ziele wären also die RT, die Formation des PIK (Prä-Integrations-Komplex) und dessen Transport in den Zellkern oder die Integrase selbst, sowie zelluläre Proteine die als Interaktionspartner dieser Schritte auftreten. Während ROY das Profil eines Proteaseinhibitors deckt, zeigt 3,12-DCA keinerlei Ähnlichkeit zu den Referenzprofilen. Die  $ET_{50}$ -Werte der flankierenden Prozesse Integration davor und Reifung (Protease) danach liegen jeweils etwa 15 Stunden weit entfernt. Wie in Abbildung 23B zu erkennen ist, erfolgt bei dem Profil von Schritt 1 von 3,12-DCA, ähnlich wie bei dem der Proteaseinhibitoren keine vollständige Inhibition, jedoch ist die Reduktion stärker und länger andauernd. Die Produktion neuer infektiöser Partikel jedoch (Schritt 2) nimmt hier erst weit hinter dem Aktivitätsfenster der Proteaseinhibitoren zu. Das deutet auf die Entdeckung eines bis dato als Wirkstoffziel wahrscheinlich unbekanntes oder für die Wirkstoffforschung ungenutzten Prozesses der HIV-Replikation hin. Ob dieser Prozess allerdings virale Strukturen oder zelleigene Strukturen die das Virus zur Reifung benötigt beeinflusst müsste in weiteren Studien ergründet werden. Da die  $ET_{50}$ -Werte beider Schritte jedoch nach denen der Integrase-Inhibitoren liegen, könnte die Regulation der Transkription (evtl. Tat oder Rev) oder die Prozessierung der viralen Proteine gp160 oder Gag/Pol durch entweder zelluläre Faktoren oder auch die HIV Protease beeinflusst werden. Auch der Zusammenbau neuer Viren könnte gestört werden. Zusammenfassend bewies sich der TOA als sehr hilfreiche Erweiterung des EASY-HIT Systems zur näheren Charakterisierung der neu entdeckten HIV Inhibitoren.

#### **4.1.8 Die Identifizierung weiterer Naturstoffe mit anti-HIV Wirkung**

Ein Screen einer Naturstoffbibliothek der Firma AnalytiCon Discovery von 800 Substanzen ergab 7 Substanzen, die in der frühen Phase des HIV-Replikationszyklus angreifen und laut NIH Datenbank bis jetzt noch nicht als Inhibitoren bekannt waren. Weitere Studien müssten aber für alle neu gefundenen Substanzen durchgeführt werden, um genaue Aussagen treffen zu können und bis zum jetzigen Zeitpunkt war es mir nicht möglich, TOA-Profile der Substanzen zu erstellen. Jedoch weisen einige Klassen von Naturstoffen häufig ähnliche Wirkungsweisen auf. Unter den 7 Hits ist beispielsweise ein Kaffeesäurederivat, das

eventuell eine Aktivität gegen die Integrase besitzt, wie bei dieser Stoffklasse häufig beobachtet wurde (Robinson et al. 1996; Lin 1999; De Clercq 2000) 120 der Kaffeesäurederivate, die in der NIAID anti-HIV Substanzdatenbank gelistet sind zeigen Aktivität gegen die Integrase, 4 gegen den Eintritt, 6 gegen die RT, 2 gegen HIV Tat und 2 gegen die Protease. Das Flavonoid könnte diverse Zielstrukturen besitzen, da diese Stoffgruppe sehr vielfältig agiert (Critchfield et al. 1996; Harborne and Williams 2000). Für Cumarine findet man in der Datenbank aktive Vertreter und Derivate gegen reverse Transkriptase, Integrase und Protease, wobei auch die Inhibierung von anderen Prozessen der Replikation denkbar ist.

Insgesamt konnte mit dem EASY-HIT System ein Set aus 14 Einzelsubstanzen identifiziert werden, deren anti-HIV Aktivität bis dato noch nicht in der Literatur beschrieben war. Hierzu wurden insgesamt 5980 Substanzen aus 1 Bibliothek mit pharmakologisch aktiven Substanzen (LOPAC<sup>1280</sup>) und 3 Naturstoffbibliotheken gescreent (nur Ergebnisse der SPECS-Bibliothek und AnalytiCon-Bibliothek gezeigt). Die Hit-Rate lag demnach bei insgesamt 0,24% was den gängigen Statistiken für Wirkstoffforschung mit Naturstoffen entspricht (Li and Vederas 2009; Zhu et al. 2010).

#### **4.1.9 Ausblick auf weitere Anwendungsmöglichkeiten und Erweiterungen des EASY-HIT Systems**

Neben den aufgezeigten Anwendungsmöglichkeiten und obwohl das EASY-HIT System in dieser Arbeit sehr gut charakterisiert und validiert wurde, birgt das System immer noch Potential zur Weiterentwicklung. Neben der Einbringung von YFP als Vitalitätsmarker (s.o.) könnte man das Reporterkonstrukt auch dazu verwenden Eintritt-Inhibitoren gegen andere Viren zu identifizieren. Hierzu muss das HIV-1Δenv Virus mit dem jeweiligen, Eintritts-assoziierten Glykoprotein der entsprechenden Viren komplementiert werden. Um die geeigneten Reporterzellen zu kreieren, sollten die geeigneten Zielzellen mit dem Reporterkonstrukt ausgestattet werden. Nach dem jeweilig virusspezifischen Eintritt in die Zellen würde nun die normale HIV-Replikation stattfinden und die Zellen würden analog der LC5-RIC Zellen messbares *DsRed1* produzieren. Diese Art der Suche nach neuen Eintritts-Inhibitoren ist bereits in der Literatur beschrieben. Neben dem auch in dieser Arbeit genutzten VSV-Glykoprotein (Aiken 1997), können auch Hüllproteine von zum Beispiel Influenza (Nefkens et al. 2007), Dengue (Hu et al. 2007), Ebola (Manicassamy et al. 2005) und HCV (Hsu et al. 2003) benutzt werden. Könnte mit den neuen Reporterzelllinien eine ähnlich hochwertige Signalproduktion wie im EASY-HIT System erreicht werden, würden diese ein sehr hilfreiches Werkzeug zur Wirkstoffforschung darstellen.

Aber auch für die Untersuchung der Inhibition von HIV sind die Möglichkeiten nicht ausgeschöpft. So könnten breit angelegte Resistenztestungen mit einerseits Referenzviren,



andererseits klinischen Isolaten aus Patienten durchgeführt werden. Hierbei könnte zum einen ein neuer oder auch alter Wirkstoff hinsichtlich der jeweiligen auftretenden Resistenzen charakterisiert werden. Andererseits könnte diese Art der Charakterisierung eines klinischen Virusisolates die Entwicklung einer individuellen Medikation des betreffenden Patienten vereinfachen. Auch Tropismus-Tests müssen vor der Gabe von CCR5-Inhibitoren durchgeführt werden, da ein CXCR4-tropes Virus dadurch nicht inhibiert werden würde, oder bei einer Mischinfektion (CCR5- und CXCR4-tropes Virus gleichzeitig) auf die aggressivere, R4-trope Variante selektioniert werden würde (Ariën et al. 2007). Momentan werden Resistenz- (Oette et al. 2006) und Tropismus-Tests hauptsächlich durch Genotypisierung (Hirsch 2008) der entsprechenden Isolate und auch Testungen in aufwendigeren Reporterzellsystemen (Whitcomb et al. 2006) durchgeführt. Eben hierbei könnte das EASY-HIT System mit der erweiterten LC5-RIC-R5 Zelllinie für Infizierbarkeit durch R5-trope Viren einen großen Beitrag leisten, da es wie oben beschrieben außerordentliche Qualitäten aufweist.

## **4.2 Charakterisierung der anti-HIV Aktivität eines wässrigen Extraktes der Wurzeln von *Pelargonium sidoides***

### **4.2.1 Eine kurze Einführung zur Herkunft von *P. sidoides* als Arzneimittel**

Präparationen der Wurzeln von *Pelargonium sidoides* werden in Süd-Afrika schon seit vielen Jahrhunderten gegen eine Vielzahl von Krankheiten und Beschwerden eingesetzt. In Europa wurde *Pelargonium sidoides* zur Behandlung von Tuberkulose 1897 von dem Engländer Charles Henry Stevens eingeführt (Brendler and van Wyk 2008; Kolodziej 2008). Dieser wurde selbst in Süd-Afrika von einem einheimischen Heiler mit einer Wurzelpräparation dieser Pflanze behandelt und geheilt. Er verkauft sein Heilmittel erfolgreich, wird jedoch von der Britischen Gesellschaft für Medizin (BMA) in einem Artikel verhöhnt. Eine Klage gegen die BMA verliert er 1914 und 1919 unterbricht der 1. Weltkrieg seine Geschäfte. 1920 – 1930 behandelt der Schweizer Arzt Adrien Sechehayde 800 Patienten mit Stevens Heilmittel und berichtet auch der BMA von seinen Erfolgen, jedoch ohne große Aufmerksamkeit zu erregen. Er behandelte trotzdem noch bis in die 1960er Jahre hinein Patienten mit Stevens Heilmittel. Nach dem 1. Weltkrieg bewirbt und vermarktet Stevens sein Mittel trotz Rückschlägen weiterhin unbeirrt. 1942 stirbt Stevens und seine Firma wird anscheinend von seinem Sohn an eine Deutsche Pharmafirma verkauft, das Heilmittel jedoch nicht vermarktet, obwohl es in der Roten Liste erfasst ist. Erst 1974 wird es von der Pharmazeutin Dr. Sabine Bladt an der Universität München wiederentdeckt (Bladt 1974) und erfährt seitdem große Aufmerksamkeit. Nachdem in den 1990er Jahren umfangreiche klinische Studien mit Umckaloabo® als Mittel zur Behandlung von Bronchitis und Erkältungen durchgeführt

wurden, stieg der Umsatz in Deutschland von 8 Millionen Euro im Jahr 2001 auf 80 Millionen Euro in 2006 (Brendler and van Wyk 2008).

Tabelle 7: Übersicht über bereits beschriebene anti-pathogene Effekte von Extrakten aus den Wurzeln von *P. sidoides*.

Erreger	Referenz
<b>Antibakteriell</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	(Kayser and Kolodziej 1997)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>beta-hämolytischer Streptococcus</i> 1451	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Seidel and Taylor 2004)
<i>Helicobacter pylori</i>	(Beil and Kilian 2007)
A-Streptokokken	(Conrad et al. 2007)
<b>Antiprotozoen</b>	
<i>Leishmania donovani</i>	(Kolodziej et al. 2005; Trun 2006)
<b>Antiviral</b>	
Herpes simplex (HSV)	(Schnitzler 2008)
H1N1 (Influenza A; "Schweinegrippe")	(Michaelis 2010)
H3N2 (Influenza A; "Hongkong-Grippe")	
Respiratorisches Synzytium Virus (RSV)	
Parainfluenza Virus 3 (PIV-3)	
Cocksackievirus A9	
Encephalomyocarditis Virus (EMCV)	(Thale 2010)

Während antibakterielle und anti-Protozoen Aktivitäten bereits früher beschrieben wurden, wurden in jüngerer Zeit auch Effekte gegen verschiedene Viren beschrieben. Einige dieser Effekte sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Auch klinische Studien zur Effektivität, Sicherheit und Verträglichkeit wurden in den letzten Jahren durchgeführt. Von Agbabiaka (Agbabiaka et al. 2008) wird aus 6 dieser Studien zusammenfassend die Effektivität gegen akute Bronchitis belegt. Dem interessierten Leser empfehle ich den Übersichtsartikel von Brendler und van Wyk (Brendler and van Wyk 2008).

#### 4.2.2 Anti-HIV Wirkung von Extrakten frischer und getrockneter Wurzeln von *Pelargonium sidoides* und Umckaloabo®

In dieser Arbeit habe ich die anti-HIV Wirkung von Extrakten der Wurzel von *Pelargonium sidoides* (PS) untersucht. Der beobachtete Effekt von Umckaloabo® ist sowohl mit Extrakt aus frischem Pflanzenmaterial, als auch aus getrockneten Wurzeln reproduzierbar. Die IC<sub>50</sub>-Werte der selbst hergestellten Extrakte lagen bei etwa 1 – 11 µg/ml wässrigen Rohextrakts. Wie ich aufzeigen konnte, scheint die anti-HIV Wirkung auf hydrophilen Bestandteilen der Wurzeln zu beruhen, die nicht durch Trocknung der Wurzel oder Behandlung mit organischen Lösungsmitteln (Umckaloabo® enthält 12% Ethanol als Auszugsmittel) sowie

Erhitzen auf 100°C beeinflusst werden. Der Einsatz von organischen Lösungsmitteln ergab keine signifikante Steigerung der Aktivität. Auch Schnitzler et al setzen der Extraktion kein Lösungsmittel außer Wasser zu, um Extrakte mit anti-HSV Wirkung herzustellen (Schnitzler 2008). Die anti-HIV Aktivität ist nicht auf Pflanzen beschränkt, die in Afrika angebaut werden (Umckaloabo®) sondern konnte auch für eine Pflanze nachgewiesen werden, die ich unter heimischen Bedingungen kultivierte.

#### **4.2.3 Die inhibitorische Wirkung von PS auf den viralen Eintritt im EASY-HIT System und in primären Zellen**

Der Eintritt in die Zielzelle ist ein Schlüsselpunkt in der HIV-Replikation und die Suche nach Inhibitoren gegen HIV gp120, gp41 oder auch CD4, CXCR4 und CCR5 ein aktuelles Thema in Wissenschaft und Industrie (Briz et al. 2006; Leonard and Roy 2006; Esté and Telenti 2007; Adamson and Freed 2008; Uchil and Mothes 2009).

Wie ich mit einem TOA im Vergleich mit den TOA-Profilen des Anlagerungsinhibitors GRFT, des Fusionsinhibitors T20 und des RT-Inhibitors AZT zeigen konnte, inhibiert PS den viralen Eintritt in die Zielzellen. Das Rohextrakt von PS zeigt dabei eine gleich starke Wirkung gegen Viren beider Tropismen, also CXCR4-trope Viren und CCR5-trope Viren. Der Einsatz eines Virus, dessen Glykoprotein gp120/gp41 gegen das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) ausgetauscht wurde, erniedrigt den  $IC_{50}$  um das ca. 10-fache. Die Vorinkubation einer Viruslösung mit PS für 3 Stunden vor der Infektion der Zellen steigerte die Aktivität um das 3,4-fache. Zusammengefasst legen diese Beobachtungen nahe, dass

- i) zumindest teilweise viruseigene Zielstrukturen inhibiert werden da eine Vorinkubation des Virus die Infektiosität signifikant mindert. Ähnliche Ergebnisse wurden für ein Extrakt von *Pelargonium sidoides* von Schnitzler et al. für Herpesviren beschrieben.
- ii) HIV-gp120 und/oder gp41 scheinen als Zielstruktur eine Rolle zu spielen da der Austausch des HIV-Hüllproteins gegen ein VSV-Glykoprotein die Effektivität stark vermindert.
- iii) Die Bindestelle von gp120 (V3-Domäne) an die Korezeptoren CXCR4 oder CCR5 scheint nicht in der Inhibition involviert zu sein, da eine Infektion durch Viren mit beiden entsprechenden Tropismen gleich stark inhibiert wird.

Eine Beteiligung von HIV-gp120 oder/und gp41 scheint auch durchaus plausibel, da zum Beispiel viele Vertreter der im Pflanzenreich omnipräsenten Gruppe der Flavonoide aber auch andere Molekülklassen mit diesen Strukturen interagieren und den viralen Eintritt inhibieren können (Asres et al. 2005; Zhang et al. 2005; Fink et al. 2009). Die Alternative Wirkweise, die auf einer HIV-unabhängigen Inaktivierung von zellulären Strukturen beruht

wird durch die Beobachtung entkräftet, dass eine Vor-Inkubation der Zellen mit PS keine Steigerung der Aktivität bewirkt. Eine andere Alternative bestünde darin, dass das Viruspartikel selbst angegriffen würde indem die Membran zerstört oder dahingehend verändert wird, dass die Infektiosität verringert werden würde. Dies ist zum Beispiel für einen Extrakt der Pfefferminze gezeigt worden (Geuenich et al. 2008). Allerdings müsste solch ein Effekt auch bei dem Virus HIV-1 $\Delta$ env<sub>VSV-G</sub> zu tragen kommen der aber 10-fach schlechter inhibiert wird als die anderen getesteten HIV-1-Typen.

Die anti-HIV Aktivität von PS wurde schließlich auch für primäre menschliche PBMCs getestet und bestätigt. Der IC<sub>50</sub>-Wert lag hier in einem ähnlichen Bereich wie für die LC5-RIC/RIC-R5 Zellen. Dies beweist einerseits wiederum die Tauglichkeit der LC5-RIC Zellen zur Erzeugung vertrauenswürdiger Daten. Andererseits bestärkt es eine Annahme der *in vivo*-Tauglichkeit des hier verwendeten *Pelargonium sidoides* Extraktes.

#### 4.2.4 Fraktionierung des Rohextraktes

In den bereits zitierten Veröffentlichungen werden häufig Cumarine als wichtige, charakteristische Inhaltsstoffe der Wurzelextrakte von *Pelargonium sidoides* genannt. Sie machen etwa 2% des käuflichen Umckaloabo aus (Schoetz 2008). Desweiteren wurden bei dieser Analyse 12% Kohlenhydrate, 2% Purine, 10% Aminosäuren und Peptide, 12% Minerale und 40% Oligopropylphenidine festgestellt. 22% der Inhaltsstoffe werden von Schoetz et al. als unbekannt bezeichnet.

Um nun herauszufinden ob für die beobachtete Inhibition eine oder mehrere Substanzen verantwortlich sind, sollte der Rohextrakt der getrockneten Wurzeln (PS) fraktioniert werden, um die verschiedenen Inhaltsstoffe voneinander zu trennen. Ich entschied mich dafür den Fokus auf die Cumarine zu legen, da diese in der Literatur sehr viel Aufmerksamkeit erhielten und charakteristisch für die *P. sidoides* sind. Zu Anfang fraktionierte ich PS mit verschiedenen Methoden. Dazu gehörten semipreparative HPLC und Fraktionierung über Festphasen-Extraktion (SPE) via gradueller Elution. Diese stellten sich als eher schlecht geeignet heraus. Denn obwohl bei der Trennung über semipreparative HPLC verschiedene aktive, nicht aktive und toxische Fraktionen erzeugt werden konnten, stellte hier die Reproduktion der Fraktionierung und die Detektion von etwaigen Inhaltsstoffen mit den vorhandenen Mitteln (HPLC-Säulen, Pumpe, Detektor) ein Problem dar (Daten nicht gezeigt). Die SPE-Ergebnisse waren zwar reproduzierbar, allerdings war hierbei die Trennung nur sehr grob (Daten nicht gezeigt), beziehungsweise bei manueller Durchführung ein zu großer Arbeitsaufwand, da für jede Fraktion der Gradient an organischem Lösungsmittel (MeOH) manuell eingestellt, pipettiert und Eluat gesammelt werden musste. Jedoch konnte ich bereits bei diesen Methoden eine Trennbarkeit der Bioaktivität in verschiedene aktive und nicht aktive Fraktionen beobachten. Ein via SPE vorgereinigtes und

eingengtes Extrakt konnte schließlich mit einer UPLC-MS gekoppelten Methode erfolgreich aufgetrennt werden. Dabei wird die Fraktionierung mit einer UPLC (UltraPerformance-LC-Trennsystem) vorgenommen und das Eluat direkt mit einem Advion NanoMate Fraktionssammler einerseits in 96-Well Multititerplatten gesammelt, andererseits in Echtzeit in ein TOF-Massenspektrometer injiziert. Von insgesamt 37 erhaltenen Fraktionen zeigten 16 eine starke anti-HIV Aktivität im EASY-HIT System (siehe Abbildung 41).

#### **4.2.5 Massenspektrometrische Analyse der Inhaltsstoffe**

Aktive und nicht anti-HIV-aktive Fraktionen wurden daraufhin im FT-ICR-MS (Hochauflösungs-Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonanz Massenspektrometrie mit sehr hoher Auflösung) charakterisiert. Die nicht aktiven Fraktionen wurden mit in die erste Analyse eingeschlossen. Denn wie gezeigt, konnten viele, potentiell aktive Kandidaten, per Ausschlussverfahren aussortiert werden konnten, wenn sie gleichzeitig mit ähnlichen Intensitäten in aktiven und nicht-aktiven Fraktionen gefunden wurden. Die erhaltene Datenmenge war beachtlich (Abbildung 42). Eine manuelle Auswertung aller Signale möglicher Kandidaten wäre in der vorgegebenen Zeit nicht durchführbar gewesen, zumal die Fraktionierungsmethode immer noch große Anzahlen verschiedener Moleküle pro Fraktion begünstigte (Injektion des Rohextraktes, breitere Fraktionen).

Um nun möglichst schnell viele erste Informationen über die aufgenommenen Massenspektren zu erhalten, entschieden wir uns die Online Plattform MasSTRIX zu nutzen. Diese wurde am Helmholtz Zentrum München von unserem Kollaborationspartner Dr. Philippe Schmitt-Kopplin (Institut für ökologische Chemie) und Karsten Suhre (Institut für Bioinformatik und Systembiologie) entwickelt und ist unter [www.masstrix.org](http://www.masstrix.org) zu erreichen (Suhre and Schmitt-Kopplin 2008). MasSTRIX stellt ein äußerst hilfreiches Werkzeug für eine schnelle, erste Auswertung großer Datenmengen dar. Jedoch unterliegt die endgültige Interpretation der Daten immer noch dem Experimentator selbst. Denn MasSTRIX erzeugt aus den eingegebenen Rohdaten (gemessene Massen) mögliche Summenformel mit einer vom Experimentator vorher festgelegten, erlaubten Fehlerrate. Diese Summenformeln werden nun mit den, in den Datenbanken „KEGG with expanded lipids (HMDB, LipidMaps) (06-2009)“ gelisteten Molekülen verglichen. Für viele Summenformeln sind je nach Komposition und Fehlertoleranz mehrere Zuordnung zu verschiedenen Molekülen möglich. Eine Zuordnung eines unbekanntes Stoffes der aus einer Pflanze extrahiert wurde zu einem humanen Hormon mit gleicher Summenformel und Masse beispielsweise muss nachträglich manuell aussortiert werden. Auch ist die Qualität der eingegebenen Daten entscheidend. Rollen hierbei spielen zum einen Faktoren wie Kalibrierung der Roh-Spektren nach internen und externen Standards (zum Beispiel Arginin-Cluster oder Fettsäuren) und die Qualität der aufgenommenen Spektren wie Peak-breite, gleichmäßige Signale und Peak-Gestalt. Auch

muss beachtet werden, dass einige Moleküle während der gesamten Prozedur degradieren könnten, und somit nicht mehr identifiziert werden.

#### **4.2.6 Flavonoide und Cumarine sind die vorrangig identifizierten Substanzen in den aktiven Fraktionen**

Da ich durch die Literatur beeinflusst meinen Fokus zuerst auf die zielgerichtete Suche nach den, für *Pelargonium sidoides* charakteristischen Cumarinen legte, beruhte der Fraktionierungsansatz auf dieser Molekülklasse. Ich konnte 13 der 15 von unter anderem Hauer et al. beschriebenen Cumarine in PS identifizieren. Sie traten nicht in allen aktiven Fraktionen auf. Manche fanden sich zusätzlich oder exklusiv in nicht-aktiven Fraktionen. Über die 2 nicht identifizierten, jeweils zweifach sulfatierten Cumarine kann keine Aussage getroffen werden. Es könnte sein, dass sie während des Extraktions- und Isolierungsprozesses degradierten (Schoetz 2008), oder gar nicht vorhanden sind. Cumarin Nr.2 zum Beispiel kommt in hoher Intensität in Fraktion 17 und 18 vor. Diese Fraktionen sind aber im Vergleich zu beispielsweise Fraktion 5 und 6 eher schwach aktiv. An dieser Stelle sei angemerkt, dass gemessene Intensitäten im Massenspektrometer nicht unbedingt quantitative Aussagen zulassen, da die Intensität anhand der Stärke der Ionisierung des jeweiligen Moleküls gemessen wird. Jedoch ist ein Vergleich zwischen Messungen in verschiedenen Proben (Fraktionen) durchaus möglich. In den stark aktiven Fraktionen 6, 8 und 10 wurden die sulfatierten Cumarine 8/9 und 12/14 mit hohen Intensitäten identifiziert (Abbildung 43, Abbildung 45C). Diese unterscheiden sich von Cumarin 2 dadurch, dass sie im Falle der Cumarine 8/9 neben der Sulfoxygruppe 2 Hydroxylgruppen und keine Methoxygruppe, im Fall der Cumarine 12/14 1 Hydroxylgruppe und nur eine Methoxygruppe besitzen. Cumarin 2 hingegen besitzt keine Hydroxylgruppe neben der Sulfoxygruppe, sondern nur zwei Methoxygruppen. Eine Aktivität würde ich hierbei also der Komposition aus Sulfoxy- und Hydroxylgruppen zuschreiben und die Anwesenheit einer Methoxygruppe als aktivitätsmindernd ansehen. Um diese These zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung zu belegen sind weitere Experimente mit den Reinsubstanzen nötig, die bis zum Abschluss dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung standen. Interessant ist jedoch, dass diese einfachen, monomeren, sulfatierten Cumarine bis jetzt noch in keiner ähnlichen Konfiguration in der NIAID anti-HIV Datenbank beschrieben wurden. Auch Literaturrecherchen brachten hierzu keine Ergebnisse. Es könnte sich somit um eine neue anti-HIV Molekülklasse handeln, wenn die Wirkung in Folgeexperimenten bestätigt werden könnte.

An diesem Punkt der Analyse kann ich eine Beteiligung der Cumarine an der Aktivität des Extraktes nicht ausschließen. Jedoch scheint es, dass sie nicht alleine für die beobachtete anti-HIV Wirkung verantwortlich sind, da sie wie oben beschrieben nicht in allen aktiven Fraktionen vertreten sind. Zuzufügen bleibt noch, dass Cumarine bis in die Gegenwart

generell misstrauisch betrachtet wurden (Yarnell and Abascal 2009), da einige Vertreter dieser Gruppe starke Antikoagulantia sind wie beispielsweise das Rattengift Warfarin oder das blutverdünnende Medikament Marcumar. Der Effekt beruht hierbei liegt darauf, dass diese Stoffe als Vitamin K Antagonisten die Bildung einiger Gerinnungsfaktoren inhibiert. Für die Cumarine in PS wurde jedoch für alle bewiesen, dass sie diese Eigenschaft nicht besitzen (Koch and Biber 2007).

Die gefundenen Flavonoide (Abbildung 44, Abbildung 45B) passen etwas besser in das Bild eines Inhibitors des HIV Eintritt-Prozesses. In der Literatur werden sehr viele Isomere, Derivate, Oligomere und anders verwandte Moleküle von (+/-)-Catechin als HIV-Inhibitoren beschrieben (Fassina et al. 2002; Williamson et al. 2006; Song and Seong 2007; Nance 2009). Die Wirkung vieler dieser Flavonoide wird meist als Inhibition der Bindung von gp120 an CD4 durch die Blockade der Bindestelle an gp120 beschrieben. Taxifolin, das hier nur in sehr geringen Mengen nachweisbar war inhibiert gp120 (De Clercq 2000) mit einem  $IC_{50}$  von 13,8 bis 250  $\mu\text{g/ml}$  (NIAID Division of AIDS Anti-HIV/OI/TB Therapeutics Database). Das hier getestete Rohextrakt zeigte aber bereits einen  $IC_{50}$ -Wert zwischen etwa 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$ . Deshalb schien mir angesichts der großen Menge an verschiedenen detektierten Massen die Möglichkeit, dass nur eines der gefundenen Flavonoide für die Aktivität verantwortlich sein könnte für eher unwahrscheinlich, da es, ausgehend von den angesprochenen publizierten Werten nicht in ausreichender, inhibitorischer Konzentration vorhanden wäre. Das oligomere Flavonoid Gallocatechin-(4 $\alpha$ ->8)-Epigallocatechin ist ebenfalls in der genannten Datenbank als aktiv gelistet, taucht aber hier nur in Fraktion 6 der insgesamt 16 Fraktionen auf und dort in relativ niedriger Intensität. Die nahe Verwandtschaft der gefundenen Flavonoide legt auch eine ähnliche Aktivität nahe. Eine Hauptbeteiligung der übergeordneten Gruppen der Flavonoide, der Prodelphinidine (Oligomere basierend auf Gallocatechin) und Proanthocaynidine an der oben beschriebenen anti-HIV-Aktivität scheint wahrscheinlich, zudem diese Molekülklassen einen großen Anteil der Inhaltsstoffe von Umckaloabo® darstellen (Kolodziej 2007; Schoetz 2008).

#### **4.2.7 Ein Extrakt der Wurzeln von *Pelargonium sidoides* als natürliches Multiwirkstoffpräparat gegen HIV?**

Dennoch konnte in diesen ersten Analysen nicht in allen aktiven Fraktionen ein oder mehrere Hauptbestandteile identifiziert werden. Dieser Umstand bestärkte mich einerseits in meiner Annahme, dass das von mir hergestellte Extrakt eine Kombination verschiedener Substanzen mit ähnlicher Wirkung ist, sozusagen ein natürliches Kombinationspräparat gegen den zellulären Eintritt von HIV, Herpes (Schnitzler 2008) und vielleicht auch anderen Viren, für die der Wirkmechanismus noch nicht weiter beschrieben ist (Michaelis 2010). Andererseits erfordern die bis jetzt erhobenen Daten weitere Analysen der Inhaltsstoffe. Dies

ist für die Zeit nach Fertigstellung dieses Manuskriptes geplant. Dabei soll die Fraktionierungsmethode abgewandelt werden um den Fokus einerseits möglichst breit gefächert auf Flavonoide und deren verwandte Molekülklassen zu legen. Andererseits sollen auch die besprochenen Cumarine eingehender untersucht werden, wobei ich versuchen werde sie von den Flavonoiden in den jeweiligen Fraktionen zu trennen, um die Aktivität entweder zu bestätigen oder auszuschließen. Ausgehend von den Ergebnissen die mit dieser Methodik erzielt werden, kann dann der Fokus auf Molekülklassen und Anzahl entweder eingengt, oder wiederum verlagert werden. Die bereits identifizierten Substanzen sollen wenn möglich im Einzelnen beschafft und getestet werden, sowohl alleine, als auch in Gemischen, die den jeweiligen Fraktionen nachempfunden sind, in denen sie identifiziert wurden. Dies könnte Aufschluss darüber geben ob ein additiver Effekt der einzelnen Aktivitäten die Wirkung überdurchschnittlich steigern kann.

#### **4.2.7.1 Herausforderungen, die bei einer Entwicklung zu einer einsatzfähigen Arznei überwunden werden müssten**

##### 4.2.7.1.1 Nebenwirkungen und Kreuzreaktionen müssen ausgeschlossen werden

Die Charakterisierung und Standardisierung eines Extraktes ist auch unter dem Gesichtspunkt wichtig, dass ein Präparat oder Auszug aus *Pelargonium sidoides* eventuell Anwendung in der Behandlung von HIV-positiven Menschen finden sollte. Dafür ist es wichtig, mehr über die anti-HIV aktiven, aber auch die zusätzlichen bioaktiven Inhaltsstoffe zu erfahren. Einerseits müsste geprüft werden ob spezifische Nebenwirkungen auftreten könnten, verursacht zum Beispiel durch das Vorhandensein von Stoffen, die bereits in der Literatur als kontraproduktiv beschrieben sind. Andererseits müssen eventuelle Effekte auf den Wirkstoffmetabolismus der HAART-Medikamente ausgeschlossen werden. Diese könnten sich beispielsweise darin äußern, dass der jeweilige Metabolismus des Medikaments im Körper erhöht oder erniedrigt wird. Das wiederum könnte dazu führen, dass ein Medikament in zu hohen Konzentrationen angereichert wird und sich dessen Nebenwirkungen verstärken. So wurde zum Beispiel in einer Untersuchung mit HIV-Patienten in Zimbabwe festgestellt, dass die gleichzeitige Einnahme antiretroviraler Medikamente und lokaler pflanzlicher Heilmittel (*Hypoxis hemerocallidea*, *Sutherlandia frutescens* u.a.) Hautausschläge und Abdominalschmerzen verursachen, bzw. signifikant verstärken können (Bepe et al. 2010). Aber auch eine zu geringe Serum-Konzentrationen von HAART-Medikamenten im Patient kann sich nachteilig auf den Therapieeffekt auswirken. Verursacht werden kann dies durch erhöhten Medikament-Metabolismus bei dessen Stimulation durch pflanzliche Inhaltsstoffe. Dies wiederum kann zu erhöhter Viruslast und eventuell schnellerer Resistenzbildung gegen HAART führen. Anzumerken bleibt, dass die Zielgruppe für eine Medikation mit Phytopharmaka ohnehin eher zu den 80% der



Weltbevölkerung gehört, die keinen Zugang zu moderner westlicher Medizin haben (Desai et al. 2009), was die Zweifel einer negativen Kreuzreaktion mit HAART-Medikamenten etwas entkräftet.

#### 4.2.7.1.2 Eine Aktivierung Latenter Infektionen muss ausgeschlossen werden

Bei einer latenten Infektion mit HIV sollte nach gängiger Meinung eine Stimulation des Immunsystems oder genauer von infizierten T-Zellen vermieden werden, da eine Aktivierung des Metabolismus bzw. die Proliferation dieser Zellen das Virusreservoir vergrößern und somit die Viruslast erhöhen könnte. Rollen hierbei spielen die Faktoren TNF- $\alpha$  über die Aktivierung von NF $\kappa$ B, sowie verschiedene Interleukine (Hiscott et al. 2001; Porcheray et al. 2006; Jeeninga et al. 2008). Ein immunstimulierendes Präparat von *Echinacea purpurea* (Ep) (Burger et al. 1997; Sasagawa et al. 2006; Matthias et al. 2007; Jian-ming and Wen-jun 2009) allerdings führte beispielsweise nach einer Untersuchung in HIV-positiven Patienten nicht zu einer Erhöhung der Viruslast. Ebenso wenig stieg *in vivo* die Abbaurate der Proteaseinhibitoren Darunavir/Ritonavir in den Patienten an, obwohl Ep *in-vitro* das entsprechende, verantwortliche Zytochrom P450 3A4 durchaus stimuliert (Molto et al. 2011).

In der Literatur wurden immunmodulatorische Wirkungen von Extrakten von *Pelargonium sidoides* beschrieben. Dazu gehören die Aktivierung von Makrophagen *in vitro* über eine (leichte) Induktion einer erhöhten Produktion von iNO, TNF- $\alpha$ , Interleukinen und IF $\beta$ . Diese Effekte werden in Untersuchungen zu der immunmodulatorischen Wirkung von Umckaloabo® hauptsächlich auf die Aktivität von Gallussäure und deren Methylester zurückgeführt (Kayser 2001; Kolodziej 2003; Kolodziej 2005; Trun 2006; Kolodziej and Kiderlen 2007; Luna 2010). Diese beiden Moleküle jedoch konnten in dieser Arbeit in keiner der aktiven (und nicht aktiven) Fraktionen identifiziert werden. In einem Versuch, die HIV-Transkription in latent HIV-infizierten T-Zellen mit PS zu aktivieren konnte auch gezeigt werden, dass dies zumindest in den eingesetzten Konzentrationen von maximal 50  $\mu$ g/ml Rohextrakt (Vollinhibition in EASY-HIT und PBMCs) nicht geschah. Weitere Untersuchungen stimulierender Effekte von PS auf die HIV-Produktion in primären Zellen, isoliert aus HIV-positiven Patienten sind für die Zeit nach der Fertigstellung dieser Arbeit geplant.

#### 4.2.7.1.3 Präparationen von *Pelargonium sidoides* und auch anderen Pflanzen sind es wert, als anti-HIV Arzneimittel weiterentwickelt zu werden.

Es wurden bereits verschiedene klinische Studien zur Bestätigung der Wirkung und Verträglichkeit des kommerziellen Präparats EPs 7630 (Umckaloabo®) durchgeführt. Die Wirkung der Präparation *in vivo* auf verschiedene respiratorische Krankheiten sowie die generelle Verträglichkeit wurden dort bereits bestätigt (Bereznoy et al. 2003; Matthys et al. 2003; Chuchalin et al. 2005; Conrad et al. 2007; Matthys and Heger 2007; Matthys et al. 2007; Matthys and Funk 2008; Kamin et al. 2010; Kamin et al. 2010; Matthys 2010).

Desweiteren bleibt zu beachten, dass vor allem Menschen in den armen Regionen der Welt, wie Afrika oder Indien oftmals primär den traditionellen Heilern und Medizinmännern ihres Kulturkreises vertrauen (müssen), die die Menschen mit den jeweilig verfügbaren, traditionellen Heilmitteln behandeln (Mills et al. 2005; Mills et al. 2005; Izzo and Ernst 2009; Bepe 2010). Für etwaige klinische Studien müsste natürlich versucht werden, die Präparation dahingehend zu optimieren, dass sie nur einen standardisierten, definierten Auszug der aktivsten Substanzen enthält, um eventuelle, unerwünschte Nebeneffekte einiger Substanzen im Vorherein zu eliminieren. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, war und ist die Tendenz der Industrie (größtenteils) weg von Naturstoffen und Phytopharmaka teilweise auf eben diesen Faktoren aufgebaut. Allerdings entstand meiner Meinung nach auch der Bedarf nach einer exakt definierten und charakterisierten, vorhersagbaren Wirkungsweise eines Arzneistoffes erst mit den Neuerungen der modernen Wirkstoffforschung. Und das wiederum erklärt mitunter die mehrere Millionen Euro teure Entwicklung mit durchschnittlicher Dauer von 12 Jahren von der Entdeckung eines Wirkstoffes bis zur Markteinführung eines neuen Medikamentes. So war es noch vor 100 Jahren zum Beispiel undenkbar und unmöglich spezifische enzymatische oder zellkulturbasierte Tests durchzuführen, Wirkstoffe im Blut von Versuchstieren nachzuweisen oder die Metabolisierung und deren Produkte zu quantifizieren.

Natürlich müssen auch die Schwierigkeiten und Zweifel beachtet werden, die eine Entwicklung eines Pflanzenextraktes hin zu einer Therapiemöglichkeit für HIV-positive Menschen oder auch bereits an AIDS Erkrankten mit sich bringt. Ungeachtet dessen sehe ich allerdings ein großes Potential in den einzelnen Substanzen, aber auch der Art und Weise, wie sie in der „Kaplandgeranie“ *Pelargonium sidoides* zusammengefügt sind. Dieses Potential sehe ich vor allem für Menschen als Chance, bei denen aktuelle Medikamente aus welchen Gründen auch immer nicht eingesetzt werden können. Sei es wegen einer Multiresistenz des Virus oder auch nur die Tatsache, dass sie keinen Zugang zu westlicher Medizin besitzen. Denn wie bereits erwähnt werden laut WHO nur 5,2 Millionen Menschen der weltweit 33 Millionen Infizierten mit HAART versorgt.

Neben der Möglichkeit das Präparat aus der Wurzel selbst zu gewinnen, könnte die Flavonoid-Biosynthese beispielsweise in Bakterien vollzogen werden, wie schon für Catechin, Leucocyanidin und Quercetin gezeigt (Chemler et al. 2010). Geerntet und gereinigt über große Bioreaktoren und preparative HPLC beispielsweise, wäre in großer Menge ein ähnlich potentes Gemisch zu erwarten wie der Wurzelextrakt selbst. Nicht zuletzt bestünde auch die Möglichkeit, ein solches Präparat in Kombination mit HAART einzusetzen, was es eventuell erlauben könnte die benötigte Dosis der HAART-Medikamente herabzusetzen. Dies würde vielleicht nicht nur die Möglichkeit auf Nebenwirkungen reduzieren, sondern auch

den Finanzaufwand der HIV-Therapie erniedrigen. Auch für Patienten, die gerade eine HAART-Unterbrechung machen, wäre ein solches Präparat interessant. Die Medikamentenpause könnte sich dadurch positiv verlängern. Auch ein Effekt auf opportunistische Erreger und Krankheiten die bei immunschwachen Menschen auftreten wäre durchaus nicht zu unterschätzen und ist ja für Extrakte aus *Pelargonium sidoides* als Arzneimittel gegen einige Erreger solcher Krankheiten bereits publiziert (Bereznoy 2003; Beil and Kilian 2007; Conrad and Frank 2008; Kolodziej 2008; Kim 2009; Michaelis 2010).

## 5 Zusammenfassung

HIV ist nach wie vor aktueller Gegenstand der Wirkstoffforschung. Die Suche nach neuen Inhibitoren gegen diverse Ziele im HIV-Replikationszyklus setzt voraus, dass möglichst vielseitige Testsysteme zur Verfügung stehen. Neben enzymatischen, genetischen und immunologischen Systemen gibt es auch HIV-Reporterzellensysteme. Diese zeichnen sich aus durch ihre Beschaffenheit zur HIV-Infizierbarkeit, die Qualität der verwendeten HIV-Reporter gene, sowie durch Qualität und Quantität der produzierten, messbaren Signale.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Zell-basierte EASY-HIT System zur Identifikation und Charakterisierung neuer Inhibitoren gegen alle Schritte im HIV Replikationszyklus etabliert und validiert. Das System basiert auf HIV-Indikatorzellen mit einem Reporterkonstrukt, das bei Anwesenheit der HIV-Proteine Tat und Rev das rotfluoreszierende Protein DsRed1 exprimiert. Es wurde gezeigt, dass die messbare Fluoreszenz der HIV-Indikatorzellen proportional zur Stärke der Infektion der Zellpopulation ist. Desweiteren kann mit diesem System der gesamte HIV-Replikationszyklus beobachtet werden. Für die Identifizierung von Inhibitoren der HIV-Replikation wurde ein Standard Test etabliert. Der Aufbau des Tests erlaubt die Identifizierung und Unterscheidung von Inhibitoren gegen die frühe und späte Phase der HIV-Replikation. Die zusätzliche Etablierung eines Time-of-Addition Assays für das EASY-HIT System ermöglicht eine einfache, schnelle und trotzdem relativ genaue Zuordnung eines neuen Inhibitors zu dem eigentlichen Schritt der HIV-Replikation, der gehemmt wird. Eine Validierung des EASY-HIT Systems nach den Vorgaben des NIH National Genomics Center (NCGC) für die Qualifizierung des EASY-HIT Systems zu einem Hochdurchsatz-fähigen Testsystem erzielte exzellente Ergebnisse. Es konnten 14 neue Substanzen mit anti-HIV Wirkung identifiziert werden. 3 davon konnten bis jetzt mit dem Time-of-Addition Assay näher charakterisiert werden. Das Gallsäurederivat 3,12-Dioxocholansäure (3,12-DCA) zeigte dabei ein Inhibitionsprofil, das zu keiner der Klassen der Referenzinhibitoren passt. Dies belegt die Eignung des EASY-HIT Systems zur Identifizierung neuer Zielstrukturen im HIV-Replikationszyklus.

Im zweiten Teil dieser Arbeit beschreibe ich die Charakterisierung der anti-HIV Wirkung eines Extraktes der Wurzeln von *Pelargonium sidoides* (PS) mithilfe des EASY-HIT Systems. Dabei fand ich heraus, dass PS den viralen Eintritt in die Zielzellen inhibiert. CCR5- und CXCR4-trope Viren werden gleichstark inhibiert. Tauscht man die HIV Glykoproteine im Viruspartikel gegen das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus aus, nimmt die Inhibition stark ab. Die Inhibition von HIV durch PS wurde auch für die Infektion primärer humaner Zellen (PBMCs, Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts) bestätigt. Eine Fraktionierung von PS zeigte, dass mehrere aktive Inhaltsstoffe für die Inhibition

verantwortlich sind. Die ersten Fraktionierungen und die Untersuchungen der Zusammensetzung der Fraktionen mit der Massenspektrometrie bestätigten eine Anreicherung von Flavonoiden und Cumarinen in den aktiven Fraktionen.

## 6 Ausblick

Wie erwähnt, wäre eine Weiterentwicklung des EASY-HIT Systems mit der Validierung der Zelllinie mit dem zusätzlichen, YFP-basierten Toxizitätsmarker ein erster Schritt in der Perfektionierung des Systems, da der MTT-Test oder andere Kosten- und arbeitsaufwändige Schritte zur Bestimmung der Toxizität von Testsubstanzen in den Zellen entfielen. Desweiteren wäre die Adaptierung des Systems für andere Viren mittels pseudotypisierter HI-Viren und dem Reporterkonstrukt in den entsprechenden Zielzellen ein weiterer wichtiger Schritt. Somit könnten auch Eintritt-Inhibitoren gegen andere Viren wie zum Beispiel Hepatitis B und C, Dengue und Influenza ebenso einfach identifiziert werden.

Der Extrakt von *Pelargonium sidoides* muss noch näher charakterisiert werden. Dazu sollten zuerst die bereits identifizierten, potentiell aktiven Substanzen verifiziert werden. Zusätzlich muss durch eine Modifikation der Fraktionierung und weitere massenspektrometrische Analyse der noch unbekannte Anteil an Massen in den aktiven Teilen des Extraktes identifiziert werden. Ein Verfahren zur Anreicherung der aktiven Substanzen bereits bei der Extraktion könnte erarbeitet werden, um die Aktivität gegen HIV zu steigern.

Gleichzeitig müssen weitere prä-klinische Parameter bestimmt werden. Der Fokus liegt hierbei zuerst auf der Überprüfung einer etwaigen Aktivierung oder zusätzlichen Stimulation von persistent und latent infizierten humanen Zellen. Kann dies ausgeschlossen werden und ist ein Extrakt standardisiert in seiner Zusammensetzung der aktiven Stoffe, sollte zukünftig eventuell eine erste klinische Phase mit HIV-Patienten angestrebt werden.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome; erworbene Immunschwäche Krankheit
<b>Anti/Anti</b>	Antibiotikum/Antimykotikum
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>AU</b>	Arbitrary Unit; willkürliche Einheiten
<b>AZT</b>	Azidothymidin; Inhibitor der reversen Transkriptase
<b>BMA</b>	British Medical Association; Britische Gesellschaft für Medizin
<b>Bp</b>	Basenpaar
<b>ca.</b>	circa
<b>CCR5</b>	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5; CD195
<b>CD4</b>	Cluster of Differentiation 4; CD4-Rezeptor
<b>CDC</b>	Centers of Disease Control and Prevention
<b>CDK9</b>	Cyclin-abhängige Kinase 9; Cyclin-Dependant Kinase 9
<b>cDNA</b>	complementary DNA; komplementäre DNA
<b>CEM-SS</b>	T-Zelllinie mit HIV-Indikator
<b>CombiChem</b>	Combinatorial Chemistry; kombinatorische Chemie
<b>CP</b>	Crossing Point; Schwellenwert für Amplifikatmenge bei Realtime PCR
<b>cPPT</b>	zentraler Polypurintrakt
<b>CTS</b>	zentrale Terminationssequenz
<b>CV</b>	Koeffizient der Variation
<b>CXCR4</b>	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; CD181
<b>d4T</b>	Stavudin; reverse Transkriptase Inhibitor
<b>ddC</b>	Zalcitabin; reverse Transkriptase Inhibitor
<b>DMEM</b>	Dulbeccos Modified Eagle medium; Zellkulturmedium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DRV</b>	Darunavir
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige DNA
<b>EFV</b>	Efavirenz; reverse Transkriptase Inhibitor
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immuno absorbent Assay
<b>env/Env</b>	HIV-Hüllprotein kodierendes Gen/ HIV-Hüllvorläuferprotein gp160
<b>EPCG</b>	Epigallocatechingallat
<b>ESI</b>	Elektrospray Ionenquelle
<b>ET50</b>	Effective Timepoint 50%
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting
<b>FDA</b>	US Food and Drug Administration; Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde von Amerika
<b>FKS</b>	fötales Kälberserum
<b>FLV</b>	Flavopiridol; CDK9-Inhibitor
<b>FT-ICR-MS</b>	Fourier-Transformation Ionen-Cyklotron-Resonanz Massenspektrometer
<b>G418</b>	Geneticin

<b>gag/Gag</b>	HIV-Strukturproteine kodierendes Gen/Polyprotein pr55 aus p17, p24 und p7
<b>GFP</b>	Grün fluoreszierendes Protein
<b>gp120</b>	gp41-assoziiertes HIV Hüllprotein
<b>gp160</b>	HIV-Hüllvorläuferprotein
<b>gp41</b>	transmembranes HIV Hüllprotein
<b>GRFT</b>	Griffithsin; Anlagerungsinhibitor
<b>h.p.i.</b>	hours post infection; Stunden nach der Infektion
<b>HAART</b>	Hochaktive antiretrovirale Therapie
<b>HBV</b>	Hepatitis B Virus
<b>HCV</b>	Hepatitis C Virus
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz Virus
<b>HIV/OI</b>	HIV/Opportunistische Infektionen
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HTLV-III</b>	Humanes T-Zell Leukämie Virus III
<b>IC50</b>	Inhibitorische Konzentration 50%
<b>IF<math>\beta</math></b>	Interferon beta
<b>IL2</b>	Interleukin 2
<b>iNO</b>	inorganic Nitric Oxide; anorganische Stickoxide
<b>J-Lat</b>	latent HIV infizierte T-Zelllinie
<b>JRFL</b>	R5-tropes HIV-Isolat
<b>K95</b>	Konfidenzintervall 95%
<b>KE37.1</b>	T-Lymphom-Zelllinie
<b>KEGG</b>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<b>LAV</b>	Lymphadenopathie-assoziiertes Virus
<b>LC5-CD4</b>	HeLa-Zelllinie die CD4 exprimiert
<b>LC5-RIC</b>	LC5-CD4 mit HIV-Indikator
<b>LC5-RIC-R5</b>	LC5-RIC die CCR5 exprimiert
<b>LD50</b>	Letale Dosis 50%
<b>LEGDF/p75</b>	Lens Epithelium Derived Growth Factor
<b>logP</b>	Verteilungskoeffizient eines Stoffes zwischen Butanol und Wasser
<b>LOPAC1280</b>	Library of 1280 Pharmaceutical Active Compounds; Bibliothek 1280 pharmakologisch wirksamer Substanzen
<b>LTR</b>	Long Terminal Repeat (DNA)
<b>m/z</b>	Masse zu Ladung Verhältnis
<b>Max</b>	Maximales Signal
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>ml; mg; mM</b>	Milliliter; Milligramm; Millimolar
<b>Min</b>	Minimales Signal
<b>Mitt</b>	Mittleres Signal
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>MT-4</b>	T-Ziellinie
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat
<b>NB</b>	Nicht Bestimmt

<b>NCGC</b>	NIH National Genomics Center
<b>Nef</b>	HIV Negativer Regulationsfaktor
<b>NFκB</b>	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
<b>NIAID</b>	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
<b>nl; ng; nM</b>	Nanoliter; Nanogramm; Nanomolar
<b>NIH</b>	National Institutes of Health
<b>NNRTI</b>	Nicht-Nukleosidischer RT-Inhibitor
<b>NRTI</b>	Nukleosidischer RT-Inhibitor
<b>p11</b>	HIV-Protease
<b>p17</b>	HIV-Matrixprotein
<b>p24</b>	HIV-Capsidprotein
<b>p32</b>	HIV-Integrase
<b>p66/51</b>	HIV-RT/RNase H
<b>p7</b>	HIV-Nukleocapsidprotein
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cell; Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
<b>PBS</b>	Primer Binding Site; Primer-Bindestelle
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction; Polymerasekettenreaktion
<b>PIC</b>	Prä-Integrationskomplex
<b>pl; pg; pM</b>	Pikoliter; Pikogramm; Pikomolar
<b>pol/Pol</b>	HIV Polyprotein kodierendes Gen/Polyprotein aus p11, p66/51 und p32
<b>ppb</b>	parts per billion; Teile in einer Milliarde
<b>pPI</b>	peptidischer Proteaseinhibitor
<b>ppm</b>	parts per million; Teile in einer Million
<b>PPT</b>	Polypurintrakt
<b>pr160</b>	HIV-Gag/Pol-Vorläuferprotein
<b>pr55</b>	HIV-Gag-Vorläuferprotein
<b>PS</b>	Wässriger, bei Raumtemperatur hergestellter Extrakt der getrockneten Wurzeln von <i>Pelargonium sidoides</i>
<b>P-TEFb</b>	Positiver Transkriptions-Elongationsfaktor b
<b>Q-TOF</b>	Quadrupol-Time-of-Flight Massenspektrometer
<b>R2</b>	Bestimmtheitsmaß
<b>R5-trop</b>	Viren mit Tropismus für CCR5
<b>RAL</b>	Raltegravir; Integrase Inhibitor
<b>Rev</b>	HIV "regulator of virion"; Regulator des Virions
<b>RKI</b>	Robert-Koch Institut
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RO5</b>	Lipinskis Rule of 5
<b>ROY</b>	7α-Acetoxy-6β-Hydroxyroyleanon
<b>RPII</b>	House-keeping Gen für Realtime PCR
<b>RRE</b>	Rev-Response-Element
<b>RT</b>	reverse Transkriptase
<b>RTC</b>	reverser Transkriptionskomplex
<b>S/B</b>	Signal to Background; Signal zu Hintergrund
<b>SIVcpz</b>	Simian immunodeficiency virus chimpanzee; Schimpansen Immundefizienz Virus



<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction; Festphasen Extraktion
<b>SQV</b>	Saquinavir; Proteaseinhibitor
<b>ssRNA</b>	einzelsträngige RNA
<b>Stabw</b>	Standardabweichung
<b>SW</b>	Signal Window; Signalfenster
<b>SYBR Green</b>	Cyanin Farbstoff zum Nachweis von RNA und ssDNA
<b>T20</b>	Peptidischer Fusionsinhibitor, abgeleitet von dem HIV-Protein gp41
<b>Tar</b>	Trans-Activating Response Region; TAT Bindestelle an HIV mRNA
<b>Tat</b>	Transaktivator der Transkription
<b>Ti</b>	Therapeutischer Index; LD50/IC50
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Nekrose Faktor alpha
<b>TOA</b>	Time-of-Addition Assay; Zeitpunkt der Zugabe Assay
<b>tRNA</b>	transfer-RNA
<b>UNAIDS</b>	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
<b>UNDP</b>	United Nations Development Programme
<b>UPLC</b>	Ultra Performance Liquid Chromatography
<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>USD</b>	US-Dollar
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>Vif</b>	HIV Virion-Infektiositäts-Faktor
<b>Vpr</b>	HIV Virales Protein P
<b>Vpu</b>	HIV Virales Protein U
<b>VSV</b>	Vesikuläres Stomatitis Virus
<b>VSV-G</b>	VSV-Glykoprotein
<b>WHO</b>	World Health Organisation; Weltgesundheitsorganisation
<b>X4-trop</b>	CXCR4-tropes Virus
<b><math>\mu</math>l; <math>\mu</math>g; <math>\mu</math>M</b>	Mikroliter; Mikrogramm; Mikromolar
<b>VLE RPMI-1640</b>	(Very Low Endotoxin) Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
<b>118-D-24</b>	experimentelle Integraseinhibitor
<b>3,12-DCA</b>	3,12-Dioxocholansäure
<b>3'PPT</b>	3' Polypurintrakt

## 8 Literaturverzeichnis

- Adamson, C. S. and E. O. Freed (2007). "Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation." *Advances in Pharmacology* 55: 347-387.
- Adamson, C. S. and E. O. Freed (2008). "Recent progress in antiretrovirals--lessons from resistance." *Drug Discov Today* 13(9-10): 424-432.
- Agbabiaka, T. B., R. Guo and E. Ernst (2008). "Pelargonium sidoides for acute bronchitis: A systematic review and meta-analysis." *Phytomedicine* 15(5): 378-385.
- AIDSmeds (2011). [www.aidsmeds.com](http://www.aidsmeds.com).
- Aiken, C. (1997). "Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A." *Journal of virology* 71(8): 5871.
- Altmann, K. H., F. Cachoux, F. Feyen, J. Gertsch, C. N. Kuzniewski and M. Wartmann (2010). "Natural products as leads for anticancer drug discovery: discovery of new chemotypes of microtubule stabilizers through reengineering of the epothilone scaffold." *Chimia (Aarau)* 64(1-2): 8-13.
- Andrew, A. and K. Strebel (2010). "HIV-1 Vpu targets cell surface markers CD4 and BST-2 through distinct mechanisms." *Molecular Aspects of Medicine*(5): 407-417.
- Arhel, N. (2010). "Revisiting HIV-1 uncoating." *Retrovirology* 7(1): 96.
- Ariën, K. K., G. Vanham and E. J. Arts (2007). "Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans?" *Nature Reviews Microbiology* 5(2): 141-151.
- Armitage, A. E., A. J. McMichael and H. Drakesmith (2008). "Reflecting on a quarter century of HIV research." *Nature Immunology* 9(8): 823-826.
- Arrieta, J. M., S. Arnaud-Haond and C. M. Duarte (2010). "What lies underneath: Conserving the oceans' genetic resources." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(43): 18318-18324.
- Asres, K., A. Seyoum, C. Veeresham, F. Bucar and S. Gibbons (2005). "Naturally derived anti-HIV agents." *Phytotherapy Research* 19(7): 557-581.
- Baird, G. S., D. A. Zacharias and R. Y. Tsien (2000). "Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(22): 11984.
- Baker, D. D., M. Chu, U. Oza and V. Rajgarhia (2007). "The value of natural products to future pharmaceutical discovery." *Nat Prod Rep* 24(6): 1225-1244.
- Bar-Magen, T., R. D. Sloan, V. H. Faltenbacher, D. A. Donahue, B. D. Kuhl, M. Oliveira, H. Xu and M. A. Wainberg (2009). "Comparative biochemical analysis of HIV-1 subtype B and C integrase enzymes." *Retrovirology* 6(1): 103.
- Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun and C. Rouzioux (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* 220(4599): 868.
- Beil, W. and P. Kilian (2007). "EPs 7630, an extract from Pelargonium sidoides roots inhibits adherence of Helicobacter pylori to gastric epithelial cells." *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 5-8.
- Bepe, N., N. Madanhi, T. Mudzviti, S. Gavi, C. C. Maponga and G. D. Morse (2010). "The impact of herbal remedies on adverse effects and quality of life in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy." *The Journal of Infection in Developing Countries* 5(01): 048-053.
- Bereznoy, V. V., D. S. Riley, G. Wassmer and M. Heger (2003). "Efficacy of extract of Pelargonium sidoides in children with acute non-group A beta-hemolytic streptococcus tonsillopharyngitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Altern Ther Health Med* 9(5): 68-79.
- Bertoni, N., M. Singer, C. Silva, S. Clair, M. Malta, F. I. Bastos, M. Okwen, B. Ngem, F. Alomba and M. Capo (2011). "Knowledge of AIDS and HIV transmission among drug users in Rio de Janeiro, Brazil." *Harm Reduction Journal* 8(1): 5.
- Beutler, J. A. (2009). "Natural Products as a Foundation for Drug Discovery." *Curr Protoc Pharmacol* 46: 9 11 11.
- Bladt, S. (1974). "Zur Chemie der Inhaltsstoffe der Pelargonium Curt.-Wurzel (Umckaloabo)." Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München
- Blair, W. S., J. Isaacson, X. Li, J. Cao, Q. Peng, G. F. Kong and A. K. Patick (2005). "A novel HIV-1 antiviral high throughput screening approach for the discovery of HIV-1 inhibitors." *Antiviral Res* 65(2): 107-116.
- Booyesen, F. R., H. C. J. Van Rensburg, M. Bachmann, G. Louwagie and L. Fairall (2007). "The heart in HAART: quality of life of patients enrolled in the public sector antiretroviral treatment programme in the free state province of South Africa." *Social indicators research* 81(2): 283-329.

- Brendler, T. and B. E. van Wyk (2008). "A historical, scientific and commercial perspective on the medicinal use of *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae)." *J Ethnopharmacol* 119(3): 420-433.
- Bridge, J., J. V. Lazarus and R. Atun (2010). "HIV epidemics and prevention responses in Asia and Eastern Europe: lessons to be learned?" *Aids* 24: S86.
- Briggs, J., J. Riches, B. Glass, V. Bartonova, G. Zanetti and H. G. Kräusslich (2009). "Structure and assembly of immature HIV." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(27): 11090.
- Briz, V., E. Poveda and V. Soriano (2006). "HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57(4): 619.
- Burger, R. A., A. R. Torres, R. P. Warren, V. D. Caldwell and B. G. Hughes (1997). "Echinacea-induced cytokine production by human macrophages." *International journal of immunopharmacology* 19(7): 371-379.
- Butler, M. S. and D. J. Newman (2008). "Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery." *Prog Drug Res* 65: 1, 3-44.
- Butler, S. L., M. S. T. Hansen and F. D. Bushman (2001). "A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo." *Nature medicine* 7(5): 631-634.
- Campos, H. C., M. D. da Rocha, F. P. Viegas, P. C. Nicastro, P. C. Fossaluzza, C. A. Fraga, E. J. Barreiro and C. Viegas, Jr. (2010). "The Role of Natural Products in the Discovery of New Drug Candidates for the Treatment of Neurodegenerative Disorders II: Alzheimer's Disease." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10(2): 251-270.
- Cao, J., J. Isaacson, A. K. Patick and W. S. Blair (2005). "High-throughput human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) full replication assay that includes HIV-1 Vif as an antiviral target." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(9): 3833.
- Carter, C. A. and L. S. Ehrlich (2008). "Cell biology of HIV-1 infection of macrophages." *Annu Rev Microbiol.* 62: 425-443.
- Charneau, P., M. Alizon and F. Clavel (1992). "A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication." *Journal of virology* 66(5): 2814.
- Chemler, J. A., Z. L. Fowler, K. P. McHugh and M. A. G. Koffas (2010). "Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering." *Metabolic Engineering* 12(2): 96-104.
- Chiba-Mizutani, T., H. Miura, M. Matsuda, Z. Matsuda, Y. Yokomaku, K. Miyauchi, M. Nishizawa, N. Yamamoto and W. Sugiura (2007). "Use of new T-cell-based cell lines expressing two luciferase reporters for accurately evaluating susceptibility to anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs." *J Clin Microbiol* 45(2): 477-487.
- Chuchalin, A. G., B. Berman and W. Lehmacher (2005). "Treatment of acute bronchitis in adults with a *pelargonium sidoides* preparation (EPs 7630): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Explore (NY)* 1(6): 437-445.
- Clark, A. M. (1996). "Natural products as a resource for new drugs." *Pharmaceutical research* 13(8): 1133-1141.
- Cochrane, A. W., M. T. McNally and A. J. Mouland (2006). "The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity." *Retrovirology* 3(1): 18.
- Coffin, J., S. Hughes and H. Varmus (1997). "Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA." *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Press, New York: 121-160.
- Cohen, J. (2010). "Late for the Epidemic: HIV/AIDS in Eastern Europe." *Science* 329(5988): 160.
- Collins, K. L. (2009). "This Bud's for Vpu." *Cell Host & Microbe* 5(3): 217-219.
- Conrad, A. and U. Frank (2008). "Extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) displays anti-infective properties by enhanced phagocytosis and differential modulation of host-bacteria interactions." *Planta Med* 74(6): 682-685.
- Conrad, A., I. Jung, D. Tioua, C. Lallemand, F. Carrapatoso, I. Engels, F. D. Daschner and U. Frank (2007). "Extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) inhibits the interactions of group A-streptococci and host epithelia in vitro." *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 52-59.
- Conrad, A., H. Kolodziej and V. Schulz (2007). "[*Pelargonium sidoides*-extract (EPs 7630): registration confirms efficacy and safety]." *Wien Med Wochenschr* 157(13-14): 331-336.
- Cos, P., L. Maes, A. Vlietinck and L. Pieters (2008). "Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection—an update (1998–2007)." *Planta Med* 2008: 1323-1337.
- Cowan, M. M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." *Clinical microbiology reviews* 12(4): 564.
- Critchfield, J. W., S. T. Butera and T. M. Folks (1996). "Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds." *AIDS research and human retroviruses* 12(1): 39-46.

- Cullen, B. R. (1991). "Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus." *Journal of virology* 65(3): 1053.
- Cutler, D. M. (2007). "The demise of the blockbuster?" *New England Journal of Medicine* 356(13): 1292.
- De Clercq, E. (2000). "Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection." *Med Res Rev* 20(5): 323-349.
- De Clercq, E. (2007). "Three decades of antiviral drugs." *Nature Reviews Drug Discovery* 6(12): 941.
- De Clercq, E. (2009). "Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV." *International journal of antimicrobial agents* 33(4): 307-320.
- Delelis, O., K. Carayon, A. Saïb, E. Deprez and J. F. Mouscadet (2008). "Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase." *Retrovirology* 5(1): 114.
- Desai, M. C. and S. Chackalamannil (2008). "Rediscovering the role of natural products in drug discovery." *Curr Opin Drug Discov Devel* 11(4): 436-437.
- Desai, S., K. Majumdar and K. Kulkarni (2009). "EXPLORING NATURAL MOLECULES FOR ANTIVIRAL THERAPY: A SHORT REVIEW." *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 3(1): 117-122.
- DHHS (2011). Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents., Department of Health and Human Services.: 1-166.
- Donahue, D. A., R. D. Sloan, B. D. Kuhl, T. Bar-Magen, S. M. Schader and M. A. Wainberg (2010). "Stage-dependent inhibition of HIV-1 replication by antiretroviral drugs in cell culture." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3): 1047-1054.
- Embree, J. E., S. Njenga, P. Datta, N. J. D. Nagelkerke, J. O. Ndinya-Achola, Z. Mohammed, S. Ramdahin, J. J. Bwayo and F. A. Plummer (2000). "Risk factors for postnatal mother-child transmission of HIV-1." *Aids* 14(16): 2535.
- Essex, M. and Y. Lu (2008). "HIV/AIDS: Lessons from a New Disease Pandemic." *Emerging Infections in Asia*: 133-142.
- Esté, J. A. and A. Telenti (2007). "HIV entry inhibitors." *The Lancet* 370(9581): 81-88.
- Esteves, A. I. S., M. Nicolai, M. Humanes and J. Goncalves (2011). "Sulfated Polysaccharides in Marine Sponges: Extraction Methods and Anti-HIV Activity." *Marine Drugs* 9(1): 139.
- Fassina, G., A. Buffa, R. Benelli, O. E. Varnier, D. M. Noonan and A. Albini (2002). "Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea as a candidate anti-HIV agent." *Aids* 16(6): 939.
- Fink, R. C., B. ROSCHEK and R. S. Alberte (2009). "HIV type-1 entry inhibitors with a new mode of action." *Antiviral chemistry & chemotherapy* 19(6): 243-255.
- Fleming, S. A. (1950). "Penicillin: its practical application." *Academic Medicine* 25(4): 303.
- Foster, J. L., S. J. Denial, B. R. S. Temple and J. V. Garcia (2011). "Mechanisms of HIV-1 Nef Function and Intracellular Signaling." *Journal of Neuroimmune Pharmacology*: 1-17.
- Frankel, A. D. and J. A. T. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." *Annual review of biochemistry* 67(1): 1-25.
- Freed, E. O. (2001). "HIV-1 replication." *Somatic cell and molecular genetics* 26(1): 13-33.
- Freed, E. O., G. Englund and M. A. Martin (1995). "Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection." *Journal of virology* 69(6): 3949.
- Friedland, G. H. and R. S. Klein (1987). "Transmission of the human immunodeficiency virus." *New England Journal of Medicine* 317(18): 1125-1135.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl and S. Zolla-Pazner (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* 220(4599): 865.
- Ganesan, A. (2008). "The impact of natural products upon modern drug discovery." *Curr Opin Chem Biol* 12(3): 306-317.
- Ganser-Pornillos, B. K., M. Yeager and W. I. Sundquist (2008). "The structural biology of HIV assembly." *Current opinion in structural biology* 18(2): 203-217.
- Garcia, J. M., A. Gao, P. L. He, J. Choi, W. Tang, R. Bruzzone, O. Schwartz, H. Naya, F. J. Nan, J. Li, R. Altmeyer and J. P. Zuo (2009). "High-throughput screening using pseudotyped lentiviral particles: a strategy for the identification of HIV-1 inhibitors in a cell-based assay." *Antiviral Res* 81(3): 239-247.
- Garg, A. B., J. Nuttall and J. Romano (2009). "The future of HIV microbicides: challenges and opportunities." *Antiviral chemistry & chemotherapy* 19(4): 143-150.
- Gervaix, A., D. West, L. M. Leoni, D. D. Richman, F. Wong-Staal and J. Corbeil (1997). "A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility in vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(9): 4653.

- Geuenich, S., C. Goffinet, S. Venzke, S. Nolkemper, I. Baumann, P. Plinkert, J. Reichling and O. T. Keppler (2008). "Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density." *Retrovirology* 5(1): 27.
- Ghezzi, S., D. M. Noonan, M. G. Aluigi, G. Vallanti, M. Cota, R. Benelli, M. Morini, J. D. Reeves, E. Vicenzi and G. Poli (2000). "Inhibition of CXCR4-dependent HIV-1 infection by extracellular HIV-1 Tat." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270(3): 992-996.
- Gothi, D. and M. Joshi (2011). "Resistant TB: Newer Drugs and Community Approach." *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 6(1): 27-37.
- Greene, W. (1991). "The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection." *New England Journal of Medicine* 324(5): 308-317.
- Gustchina, E., C. A. Bewley and G. M. Clore (2008). "Sequestering the Pre-Hairpin Intermediate of gp41 by Peptide N36Mut (e, g) Potentiates the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Neutralizing Activity of Monoclonal Antibodies Directed Against the N-Terminal Helical Repeat of gp41." *Journal of virology* 82: 10032-10041.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." *Phytochemistry* 55(6): 481-504.
- Harvey, A. L. (2008). "Natural products in drug discovery." *Drug discovery today* 13(19-20): 894-901.
- Hauer, H., S. Germer, J. Elsasser and T. Ritter (2010). "Benzopyranones and their sulfate esters from *Pelargonium sidoides*." *Planta Med* 76(4): 350-352.
- Hazen, R. J., R. J. Harvey, M. H. St Clair, R. G. Ferris, G. A. Freeman, J. H. Tidwell, L. T. Schaller, J. R. Cowan, S. A. Short and K. R. Romines (2005). "Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor GW678248 in combination with other antiretrovirals against clinical isolate viruses and in vitro selection for resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(11): 4465.
- Heider, D., J. Verheyen and D. Hoffmann (2010). "Predicting Bevirimat resistance of HIV-1 from genotype." *Bmc Bioinformatics* 11(1): 37.
- Heredia, A., C. Davis, D. Bamba, N. Le, M. Y. Gwarzo, M. Sadowska, R. C. Gallo and R. R. Redfield (2005). "Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a Chinese antileukemia medicine, inhibits P-TEFb function and HIV-1 replication." *Aids* 19(18): 2087.
- Hirsch, M. S., H. F. Günthard, J. M. Schapiro, F. B. Vézinet, B. Clotet, S. M. Hammer, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, J. W. Mellors and D. Pillay (2008). "Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel." *Clinical Infectious Diseases* 47(2): 266.
- Hiscott, J., H. Kwon and P. Génin (2001). "Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- $\kappa$ B pathway." *J Clin Invest* 107(2): 143-151.
- Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C. M. Rice and J. A. McKeating (2003). "Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(12): 7271.
- Hu, H. P., S. C. Hsieh, C. C. King and W. K. Wang (2007). "Characterization of retrovirus-based reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengue viruses." *Virology* 368(2): 376-387.
- Hubner, W., P. Chen, A. Del Portillo, Y. Liu, R. E. Gordon and B. K. Chen (2007). "Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1." *J Virol* 81(22): 12596-12607.
- Izzo, A. A. and E. Ernst (2009). "Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: an updated systematic review." *Drugs* 69(13): 1777-1798.
- Jaffar, S., A. D. Grant, J. Whitworth, P. G. Smith and H. Whittle (2004). "The natural history of HIV-1 and HIV-2 infections in adults in Africa: a literature review." *Bulletin of the World Health Organization* 82(6): 462-469.
- Janecki, A., A. Conrad, I. Engels, U. Frank and H. Kolodziej (2011). "Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from *Pelargonium sidoides* (EPs(R)) 7630 for its activity against group A-streptococci adhesion to human HEp-2 epithelial cells." *J Ethnopharmacol* 133(1): 147-152.
- Jasny, B., K. Mueller and L. Roberts (2010). "HIV/AIDS: Eastern Europe." *Science* 329(5988): 159.
- Jeeninga, R. E., E. M. Westerhout, M. L. Van Gerven and B. Berkhout (2008). "HIV-1 latency in actively dividing human T cell lines." *Retrovirology* 5(1): 37.
- Ji, H. F., X. J. Li and H. Y. Zhang (2009). "Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia?" *EMBO Rep* 10(3): 194-200.
- Jian-ming, W. and Z. Wen-jun (2009). "Immunostimulatory Effect of the Main Active Fractions from Introduced *Echinacea purpurea* [J]." *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research* 4.

- Johnson, A. M. (1988). "Regular Review: Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus." *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 296(6628): 1017.
- Jones, J., W. Whitford, F. Wagner and O. Kutsch (2007). "Optimization of HIV-1 infectivity assays." *BioTechniques* 43(5): 589.
- Jordan, A., D. Bisgrove and E. Verdin (2003). "HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro." *The EMBO Journal* 22(8): 1868-1877.
- Kamin, W., V. Maydannik, F. A. Malek and M. Kieser (2010). "Efficacy and tolerability of EPs 7630 in children and adolescents with acute bronchitis - a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial with a herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides* roots." *Int J Clin Pharmacol Ther* 48(3): 184-191.
- Kamin, W., V. G. Maydannik, F. A. Malek and M. Kieser (2010). "Efficacy and tolerability of EPs 7630 in patients (aged 6-18 years old) with acute bronchitis." *Acta Paediatr* 99(4): 537-543.
- Kayser, O. and H. Kolodziej (1997). "Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*." *Planta Med* 63(6): 508-510.
- Kayser, O., H. Kolodziej and A. F. Kiderlen (2001). "Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*." *Phytotherapy Research* 15(2): 122-126.
- Ketas, T. J., P. J. Klasse, C. Spenlehauer, M. Nesin, I. Frank, M. Pope, J. M. Strizki, G. R. Reyes, B. M. Baroudy and J. P. Moore (2003). "Entry inhibitors SCH-C, RANTES, and T-20 block HIV type 1 replication in multiple cell types." *AIDS research and human retroviruses* 19(3): 177-186.
- Kim, C. E., W. J. Griffiths and P. W. Taylor (2009). "Components derived from *Pelargonium* stimulate macrophage killing of *Mycobacterium* species." *J Appl Microbiol* 106(4): 1184-1193.
- Kimpton, J. and M. Emerman (1992). "Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene." *Journal of virology* 66(4): 2232.
- Koch, E. and A. Biber (2007). "Treatment of rats with the *Pelargonium sidoides* extract EPs 7630 has no effect on blood coagulation parameters or on the pharmacokinetics of warfarin." *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 40-45.
- Koehn, F. E. and G. T. Carter (2005). "The evolving role of natural products in drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 4(3): 206-220.
- Koh, Y., H. Nakata, K. Maeda, H. Ogata, G. Bilcer, T. Devasamudram, J. F. Kincaid, P. Boross, Y. F. Wang and Y. Tie (2003). "Novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with potent activity against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(10): 3123.
- Kolodziej, H. (2007). "Fascinating metabolic pools of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine Umckaloabo." *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 9-17.
- Kolodziej, H. (2008). "Aqueous ethanolic extract of the roots of *Pelargonium sidoides*--new scientific evidence for an old anti-infective phytopharmaceutical." *Planta Med* 74(6): 661-666.
- Kolodziej, H., A. Burmeister, W. Trun, O. A. Radtke, A. F. Kiderlen, H. Ito, T. Hatano, T. Yoshida and L. Y. Foo (2005). "Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells." *Bioorg Med Chem* 13(23): 6470-6476.
- Kolodziej, H., O. Kayser, O. A. Radtke, A. F. Kiderlen and E. Koch (2003). "Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents." *Phytomedicine* 10 Suppl 4: 18-24.
- Kolodziej, H. and A. F. Kiderlen (2007). "In vitro evaluation of antibacterial and immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation EPs 7630." *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 18-26.
- Kopetzki, E., A. Jekle, C. Ji, E. Rao, J. Zhang, S. Fischer, N. Cammack, S. Sankuratri and G. Heilek (2008). "Closing two doors of viral entry: Intramolecular combination of a coreceptor-and fusion inhibitor of HIV-1." *Virol J* 5: 56.
- Kremb, S., M. Helfer, W. Heller, D. Hoffmann, H. Wolff, A. Kleinschmidt, S. Cepok, B. Hemmer, J. Durner and R. Brack-Werner (2010). "EASY-HIT: HIV full-replication technology for broad discovery of multiple classes of HIV inhibitors." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(12): 5257-5268.
- Leonard, J. T. and K. Roy (2006). "The HIV entry inhibitors revisited." *Current medicinal chemistry* 13(8): 911-934.
- Levin, A., J. Rosenbluh, Z. Hayouka, A. Friedler and A. Loyter (2010). "Integration of HIV-1 DNA is regulated by interplay between viral rev and cellular LEDGF/p75 proteins." *Molecular Medicine* 16(1-2): 34.

- Li, G., M. Bukrinsky and R. Y. Zhao (2009). "HIV-1 viral protein R (Vpr) and its interactions with host cell." *Current HIV research* 7(2): 178-183.
- Li, J. W. and J. C. Vederas (2009). "Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?" *Science* 325(5937): 161-165.
- Li, X. Y., F. Guo, L. Zhang, L. Kleiman and S. Cen (2007). "APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription." *Journal of Biological Chemistry* 282(44): 32065.
- Ligon, B. L. (2004). *Sir Alexander Fleming: Scottish researcher who discovered penicillin*, Elsevier.
- Lilly, E. (2008). "Assay Guidance Manual Version 5.0." Available online at: [http://www.ncgc.nih.gov/guidance/manual\\_toc.html](http://www.ncgc.nih.gov/guidance/manual_toc.html).
- Lin, Y. L., C. Mettling, P. Portalès, B. Réant, V. Robert-Hebmann, J. Reynes, J. Clot and P. Corbeau (2006). "The efficiency of R5 HIV-1 infection is determined by CD4 T-cell surface CCR5 density through G [alpha] i-protein signalling." *Aids* 20(10): 1369.
- Lin, Z., N. Neamati, H. Zhao, Y. Kiryu, J. A. Turpin, C. Aberham, K. Strebler, K. Kohn, M. Witvrouw and C. Pannecouque (1999). "Chicoric acid analogues as HIV-1 integrase inhibitors." *Journal of medicinal chemistry* 42(8): 1401-1414.
- Lipinski, C. A., F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney (1997). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." *Advanced Drug Delivery Reviews* 23(1-3): 3-25.
- Llano, M., D. T. Saenz, A. Meehan, P. Wongthida, M. Peretz, W. H. Walker, W. Teo and E. M. Poeschla (2006). "An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration." *Science* 314(5798): 461.
- Luna, L. A., Jr., A. L. Bachi, E. B. R. R. Novaes, R. G. Eid, V. M. Suguri, P. W. Oliveira, L. C. Gregorio and M. Vaisberg (2010). "Immune responses induced by *Pelargonium sidoides* extract in serum and nasal mucosa of athletes after exhaustive exercise: Modulation of secretory IgA, IL-6 and IL-15." *Phytomedicine* 18(4): 303-308.
- Mahdi, J., A. Mahdi and I. Bowen (2006). "The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential." *Cell Proliferation* 39(2): 147-155.
- Malim, M. H. and M. Emerman (2008). "HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment." *Cell Host & Microbe* 3(6): 388-398.
- Manicassamy, B., J. Wang, H. Jiang and L. Rong (2005). "Comprehensive analysis of Ebola virus GP1 in viral entry." *Journal of virology* 79(8): 4793.
- Martin, D. E., R. Blum, J. Wilton, J. Doto, H. Galbraith, G. L. Burgess, P. C. Smith and C. Ballou (2007). "Safety and pharmacokinetics of Bevirimat (PA-457), a novel inhibitor of human immunodeficiency virus maturation, in healthy volunteers." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(9): 3063.
- Matthias, A., L. Banbury, L. Stevenson, K. Bone, D. Leach and R. Lehmann (2007). "Alkylamides from *Echinacea* modulate induced immune responses in macrophages." *Immunological Investigations* 36(2): 117-130.
- Matthys, H., R. Eisebitt, B. Seith and M. Heger (2003). "Efficacy and safety of an extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) in adults with acute bronchitis. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Phytomedicine* 10 Suppl 4: 7-17.
- Matthys, H. and P. Funk (2008). "EPs 7630 improves acute bronchitic symptoms and shortens time to remission. Results of a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial." *Planta Med* 74(6): 686-692.
- Matthys, H. and M. Heger (2007). "Treatment of acute bronchitis with a liquid herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides* (EPs 7630): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study." *Curr Med Res Opin* 23(2): 323-331.
- Matthys, H., W. Kamin, P. Funk and M. Heger (2007). "*Pelargonium sidoides* preparation (EPs 7630) in the treatment of acute bronchitis in adults and children." *Phytomedicine* 14 Suppl 6: 69-73.
- Matthys, H., V. G. Lizogub, F. A. Malek and M. Kieser (2010). "Efficacy and tolerability of EPs 7630 tablets in patients with acute bronchitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled dose-finding study with a herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides*." *Curr Med Res Opin* 26(6): 1413-1422.
- McDonald, D., M. A. Vodicka, G. Lucero, T. M. Svitkina, G. G. Borisy, M. Emerman and T. J. Hope (2002). "Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells." *The Journal of cell biology* 159(3): 441.
- McLean, C. A., J. H. H. M. van de Wijgert, H. E. Jones, J. M. Karon, J. M. McNicoll, S. J. Whitehead, S. Braunstein, J. Achalapong, S. Chaikummao and J. W. Tappero (2010). "HIV genital shedding and safety of Carraguard use by HIV-infected women: a crossover trial in Thailand." *Aids* 24(5): 717.
- McNamara, D. and F. Naples (2006). "Severe Side Effects Can Be at HAART of HIV Tx." *Skin & Allergy News* 37(3): 32-32.

- Mehellou, Y. and E. De Clercq (2009). "Twenty-Six Years of Anti-HIV Drug Discovery: Where Do We Stand and Where Do We Go?" *Journal of medicinal chemistry* 53(2): 521-538.
- 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(6): 527.
- Mercer, J., M. Schelhaas and A. Helenius (2010). "Virus entry by endocytosis." *Annual review of biochemistry* 79: 803-833.
- Michaelis, M., H. W. Doerr and J. Cinatl, Jr. (2010). "Investigation of the influence of EPs((R)) 7630, a herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides*, on replication of a broad panel of respiratory viruses." *Phytomedicine* 18(5): 384-386.
- Mills, E., C. Cooper, D. Seely and I. Kanfer (2005). "African herbal medicines in the treatment of HIV: Hypoxis and *Sutherlandia*. An overview of evidence and pharmacology." *Nutrition Journal* 4(1): 19.
- Mills, E., B. C. Foster, R. Heeswijk, E. Phillips, K. Wilson, B. Leonard, K. Kosuge and I. Kanfer (2005). "Impact of African herbal medicines on antiretroviral metabolism." *Aids* 19(1): 95.
- Mills, N. L., A. A. Shelat and R. K. Guy (2007). "Assay optimization and screening of RNA-protein interactions by AlphaScreen." *Journal of Biomolecular Screening* 12(7): 946.
- Miyauchi, K., Y. Kim, O. Latinovic, V. Morozov and G. B. Melikyan (2009). "HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes." *Cell* 137(3): 433-444.
- Molinari, G. (2009). "Natural products in drug discovery: present status and perspectives." *Adv Exp Med Biol* 655: 13-27.
- Molto, J., M. Valle, C. Miranda, S. Cedeno, E. Negredo, M. J. Barbanoj and B. Clotet (2011). "Herb-Drug Interaction between *Echinacea purpurea* and Darunavir-Ritonavir in HIV-Infected Patients." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(1): 326.
- Montagnier, L. (2010). "25 years after HIV discovery: Prospects for cure and vaccine." *Virology* 397(2): 248-254.
- Montefiori, D. C. (2009). "Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay." *Methods Mol Biol* 485: 395-405.
- Mori, T., B. R. O'Keefe, R. C. Sowder, S. Bringans, R. Gardella, S. Berg, P. Cochran, J. A. Turpin, R. W. Buckheit and J. B. McMahon (2005). "Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp." *Journal of Biological Chemistry* 280(10): 9345.
- Mukherjee, J., L. E. Llewellyn and E. A. Evans-Illidge (2008). "A Tropical Marine Microbial Natural Products Geobibliography as an Example of Desktop Exploration of Current Research Using Web Visualisation Tools." *Marine Drugs* 6(4): 550.
- Muller, B., J. Daecke, O. T. Fackler, M. T. Dittmar, H. Zentgraf and H. G. Krausslich (2004). "Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative." *J Virol* 78(19): 10803-10813.
- Musto, J., C. Seed, M. Law, A. Keller and J. Kaldor (2008). "Estimating the risk of blood donation associated with HIV risk behaviours." *Transfusion Medicine* 18(1): 49-54.
- Nakata, H., M. Amano, Y. Koh, E. Kodama, G. Yang, C. M. Bailey, S. Kohgo, H. Hayakawa, M. Matsuoka and K. S. Anderson (2007). "Activity against human immunodeficiency virus type 1, intracellular metabolism, and effects on human DNA polymerases of 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(8): 2701.
- Nance, C. L., E. B. Siwak and W. T. Shearer (2009). "Preclinical development of the green tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123(2): 459-465.
- Nefkens, I., J. M. Garcia, C. S. Ling, N. Lagarde, J. Nicholls, D. J. Tang, M. Peiris, P. Buchy and R. Altmeyer (2007). "Hemagglutinin pseudotyped lentiviral particles: characterization of a new method for avian H5N1 influenza sero-diagnosis." *Journal of clinical virology* 39(1): 27-33.
- Newman, D. J. and G. M. Cragg (2007). "Natural products as sources of new drugs over the last 25 years." *J Nat Prod* 70(3): 461-477.
- Newman, D. J., G. M. Cragg and K. M. Snader (2000). "The influence of natural products upon drug discovery." *Nat Prod Rep* 17(3): 215-234.
- O'Keefe, B. R., F. Vojdani, V. Buffa, R. J. Shattock, D. C. Montefiori, J. Bakke, J. Mirsalis, A. L. d'Andrea, S. D. Hume and B. Bratcher (2009). "Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(15): 6099.
- Ochsenbauer-Jambor, C., J. Jones, M. Heil, K. P. Zammit and O. Kutsch (2006). "T-cell line for HIV drug screening using EGFP as a quantitative marker of HIV-1 replication." *Biotechniques* 40(1): 91-100.
- Oette, M., R. Kaiser, M. Däumer, R. Petch, G. Fätkenheuer, H. Carls, J. K. Rockstroh, D. Schmalöer, J. Stechel and T. Feldt (2006). "Primary HIV drug resistance and efficacy of first-line



- antiretroviral therapy guided by resistance testing." *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 41(5): 573.
- Ojima, I. (2008). "Modern natural products chemistry and drug discovery." *J Med Chem* 51(9): 2587-2588.
- Overington, J. P., B. Al-Lazikani and A. L. Hopkins (2006). "How many drug targets are there?" *Nature reviews Drug discovery* 5(12): 993-996.
- Pannecouque, C., W. Pluymers, B. Van Maele, V. Tetz, P. Cherepanov, E. De Clercq, M. Witvrouw and Z. Debyser (2002). "New class of HIV integrase inhibitors that block viral replication in cell culture." *Current biology* 12(14): 1169-1177.
- Peden, K., M. Emerman and L. Montagnier (1991). "Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI." *Virology* 185(2): 661-672.
- Peeters, M., S. A. Mundeke, E. M. Ngole and E. Delaporte (2010). "Origin of HIV/AIDS and risk for ongoing zoonotic transmissions from nonhuman primates to humans." *HIV Ther.* 4(4): 387-390.
- Pereira, L. A., K. Bentley, A. Peeters, M. J. Churchill and N. J. Deacon (2000). "Survey and Summary: A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter." *Nucleic acids research* 28(3): 663.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic acids research* 29(9): e45.
- Pluymers, W., N. Neamati, C. Pannecouque, V. Fikkert, C. Marchand, T. R. Burke Jr, Y. Pommier, D. Schols, E. De Clercq and Z. Debyser (2000). "Viral entry as the primary target for the anti-HIV activity of chicoric acid and its tetra-acetyl esters." *Molecular pharmacology* 58(3): 641.
- Porcheray, F., B. Samah, C. Léone, N. Dereuddre-Bosquet and G. Gras (2006). "Macrophage activation and human immunodeficiency virus infection: HIV replication directs macrophages towards a pro-inflammatory phenotype while previous activation modulates macrophage susceptibility to infection and viral production." *Virology* 349(1): 112-120.
- Preston, B. D. and J. P. Dougherty (1996). "Mechanisms of retroviral mutation." *Trends in microbiology* 4(1): 16-21.
- Radonic, A., S. Thulke, I. M. Mackay, O. Landt, W. Siegert and A. Nitsche (2004). "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." *Biochem Biophys Res Commun* 313(4): 856-862.
- Ramaiah, K., B. S. Rani, R. Anand, S. Ramola, P. S. Babu and R. R. Babu (2010). "Opportunistic infections (OIs) present in HIV-seropositive patients: a study." *Journal of the International AIDS Society* 13(Suppl 4): P191.
- Roberts, J. D., K. Bebenek and T. A. Kunkel (1988). "The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1." *Science* 242(4882): 1171.
- Robinson, W. E., M. G. Reinecke, S. Abdel-Malek, Q. Jia and S. A. Chow (1996). "Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(13): 6326.
- Rocancourt, D., C. Bonnerot, H. Jouin, M. Emerman and J. Nicolas (1990). "Activation of a beta-galactosidase recombinant provirus: application to titration of human immunodeficiency virus (HIV) and HIV-infected cells." *Journal of virology* 64(6): 2660.
- Romani, B., S. Engelbrecht and R. H. Glashoff (2010). "Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1." *Journal of General Virology* 91(1): 1.
- Roos, J. W., M. F. Maughan, Z. Liao, J. E. K. Hildreth and J. E. Clements (2000). "LuSIV cells: a reporter cell line for the detection and quantitation of a single cycle of HIV and SIV replication." *Virology* 273(2): 307-315.
- Sasagawa, M., N. B. Cech, D. E. Gray, G. W. Elmer and C. A. Wenner (2006). "Echinacea alkylamides inhibit interleukin-2 production by Jurkat T cells." *International immunopharmacology* 6(7): 1214-1221.
- Schnitzler, P., S. Schneider, F. C. Stintzing, R. Carle and J. Reichling (2008). "Efficacy of an aqueous *Pelargonium sidoides* extract against herpesvirus." *Phytomedicine* 15(12): 1108-1116.
- Schoetz, K., C. Erdelmeier, S. Germer and H. Hauer (2008). "A detailed view on the constituents of EPs 7630." *Planta Med* 74(6): 667-674.
- Schols, D., J. A. Esté, G. Henson and E. De Clercq (1997). "Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4." *Antiviral research* 35(3): 147-156.
- Seidel, V. and P. W. Taylor (2004). "In vitro activity of extracts and constituents of *Pelargonium* against rapidly growing mycobacteria." *Int J Antimicrob Agents* 23(6): 613-619.
- Sharp, P. M. and B. H. Hahn (2010). "The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365(1552): 2487.

- Singh, I. P. and H. S. Bodiwala (2010). "Recent advances in anti-HIV natural products." *Nat Prod Rep* 27(12): 1781-1800.
- Song, J. M. and B. L. Seong (2007). "Tea catechins as a potential alternative anti-infectious agent." *Expert Review of Anti-infective Therapy* 5(3): 497-506.
- Spennlethauer, C., C. A. Gordon, A. Trkola and J. P. Moore (2001). "A luciferase-reporter gene-expressing T-cell line facilitates neutralization and drug-sensitivity assays that use either R5 or X4 strains of human immunodeficiency virus type 1." *Virology* 280(2): 292-300.
- Stoll, M. (2007). "Direct Costs for highly active antiretroviral treatment (HAART) regimens in the German ClinSurv multicenter cohort 1996 - 2007." *ClinSurv Project( CS-689-003)*.
- Suhasini, M. and T. R. Reddy (2009). "Cellular proteins and HIV-1 Rev function." *Current HIV research* 7(1): 91-100.
- Suhre, K. and P. Schmitt-Kopplin (2008). "MassTRIX: mass translator into pathways." *Nucleic acids research* 36(suppl 2): W481.
- Svarovskaia, E. S., R. Barr, X. Zhang, G. C. G. Pais, C. Marchand, Y. Pommier, T. R. Burke Jr and V. K. Pathak (2004). "Azido-containing diketo acid derivatives inhibit human immunodeficiency virus type 1 integrase in vivo and influence the frequency of deletions at two-long-terminal-repeat-circle junctions." *Journal of virology* 78(7): 3210.
- Thale, C., A. F. Kiderlen and H. Kolodziej (2010). "Anti-infective Activities of *Pelargonium sidoides* (EPS(R) 7630): Effects of Induced NO Production on *Leishmania major* in Infected Macrophages and Antiviral Effects as Assessed in a Fibroblast-Virus Protection Assay." *Planta Med.*
- Trun, W., A. F. Kiderlen and H. Kolodziej (2006). "Nitric oxide synthase and cytokines gene expression analyses in *Leishmania*-infected RAW 264.7 cells treated with an extract of *Pelargonium sidoides* (Eps 7630)." *Phytomedicine* 13(8): 570-575.
- Uchil, P. D. and W. Mothes (2009). "HIV Entry Revisited." *Cell* 137(3): 402-404.
- Van der Graaf, M. and R. Diepersloot (1986). "Transmission of human immunodeficiency virus (HIV/HTLV-III/LAV): a review." *Infection* 14(5): 203-211.
- Vila-Coro, A., M. Mellado, A. Martin de Ana, P. Lucas, G. Del Real, C. Martínez-A and J. Rodriguez-Frade (2000). "HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(7): 3388.
- Vodicka, M. A., W. C. Goh, L. I. Wu, M. E. Rogel, S. R. Bartz, V. L. Schweickart, C. J. Raport and M. Emerman (1997). "Indicator cell lines for detection of primary strains of human and simian immunodeficiency viruses." *Virology* 233(1): 193-198.
- Von Nussbaum, F., M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand and D. Häbich (2006). "Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival?" *Angewandte Chemie International Edition* 45(31): 5072-5129.
- Wachinger, M., A. Kleinschmidt, D. Winder, N. von Pechmann, A. Ludvigsen, M. Neumann, R. Holle, B. Salmons, V. Erfle and R. Brack-Werner (1998). "Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression." *Journal of General Virology* 79(4): 731.
- Watts, J. M., K. K. Dang, R. J. Gorelick, C. W. Leonard, J. W. Bess Jr, R. Swanstrom, C. L. Burch and K. M. Weeks (2009). "Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome." *Nature* 460(7256): 711-716.
- Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw and J. C. Kappes (2002). "Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy." *Antimicrob Agents Chemother* 46(6): 1896-1905.
- Wei, X., J. M. Decker, S. Wang, H. Hui, J. C. Kappes, X. Wu, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, J. M. Kilby and M. S. Saag (2003). "Antibody neutralization and escape by HIV-1." *Nature* 422(6929): 307-312.
- Whitcomb, J., W. Huang, S. Fransen, K. Limoli, J. Toma, T. Wrin, C. Chappey, L. Kiss, E. E. Paxinos and C. J. Petropoulos (2006). "Development and characterization of a novel single-cycle recombinant virus assay to determine human immunodeficiency virus type-1 co-receptor tropism." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(2): 556-575.
- Willer, A., K. Buff, A. Kleinschmidt, W. Mellert, F. D. Goebel and V. Erfle (1992). "Growth inhibition of HIV-1-infected cells and membrane alterations induced by phosphatidylcholine." *Research in experimental medicine* 192(1): 65-77.
- Williamson, M. P., T. G. McCormick, C. L. Nance and W. T. Shearer (2006). "Epigallocatechin gallate, the main polyphenol in green tea, binds to the T-cell receptor, CD4: Potential for HIV-1 therapy." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118(6): 1369-1374.

- Wolff, H., R. Brack Werner, M. Neumann, T. Werner and R. Schneider (2003). "Integrated functional and bioinformatics approach for the identification and experimental verification of RNA signals: application to HIV 1 INS." *Nucleic acids research* 31(11): 2839.
- Wolff, H., K. Hadian, M. Ziegler, C. Weierich, S. Kramer-Hammerle, A. Kleinschmidt, V. Erfle and R. Brack-Werner (2006). "Analysis of the influence of subcellular localization of the HIV Rev protein on Rev-dependent gene expression by multi-fluorescence live-cell imaging." *Experimental Cell Research* 312(4): 443-456.
- Wood, N., T. Bhattacharya, B. Keele, E. Giorgi and M. Liu (2009). "HIV evolution in early infection: selection pressures, patterns of insertion and deletion, and the impact of APOBEC." *PLoS Pathogens* 5(5): e1000414.
- Wu, Y., M. H. Beddall and J. W. Marsh (2007). "Rev-dependent indicator T cell line." *Current HIV research* 5(4): 394.
- Xue, H., X. Lu, P. Zheng, L. Liu, C. Han, J. Hu, Z. Liu, T. Ma, Y. Li and L. Wang (2010). "Highly Suppressing Wild-Type HIV-1 and Y181C Mutant HIV-1 Strains by 10-Chloromethyl-11-demethyl-12-oxo-calanolide A with Druggable Profile." *Journal of medicinal chemistry* 53(3): 1397-1401.
- Yan, H. Y. (2004). "Harvesting drugs from the seas and how Taiwan could contribute to this effort." *Changhua J Med* 9(1): 1-6.
- Yarnell, E. and K. Abascal (2009). "Plant Coumarins: Myths and Realities." *Alternative and Complementary Therapies* 15(1): 24-30.
- Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier and P. Charneau (2000). "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap." *Cell* 101(2): 173-185.
- Zhang, G. H., Q. Wang, J. J. Chen, X. M. Zhang, S. C. Tam and Y. T. Zheng (2005). "The anti-HIV-1 effect of scutellarin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334(3): 812-816.
- Zhang, J. H., T. Chung and K. R. Oldenburg (1999). "A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays." *Journal of Biomolecular Screening* 4(2).
- Zhang, M. Q. and B. Wilkinson (2007). "Drug discovery beyond the [ ] rule-of-five'." *Current opinion in biotechnology* 18(6): 478-488.
- Zhu, S., H. Wurdak and P. G. Schultz (2010). "Directed embryonic stem cell differentiation with small molecules." *Future Med. Chem.* 2(6): 965-973.
- Zolopa, A. R., J. Andersen, L. Komarow, I. Sanne, A. Sanchez, E. Hogg, C. Suckow and W. Powderly (2009). "Early antiretroviral therapy reduces AIDS progression/death in individuals with acute opportunistic infections: a multicenter randomized strategy trial." *PLoS One* 4(5): 5575.

## **9 Erklärung**

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde.

München im Mai 2011

Markus Helfer