



Charakterisierung der anti-HIV Wirkung der neuen auf dem
Naturstoff Aureothin basierenden Substanzklasse MAGIC

Alexander Frank Herrmann

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

München, 29.08.2019

Charakterisierung der anti-HIV Wirkung der neuen auf dem Naturstoff Aureothin basierenden Substanzklasse MAGIC

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

Durchgeführt am Institut für Virologie des Helmholtz Zentrums München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Vorgelegt von M.Sc. Alexander Frank Herrmann aus Herxheim bei Landau/Pfalz

1. Gutachter: Prof. Dr. Ruth Brack-Werner

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Enard

Tag der Abgabe: 29.08.2019

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2019

Für meine Eltern und meine Geschwister

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Humanes Immundefizienz-Virus.....	1
1.1.1 Entdeckung und Geschichte von HIV.....	1
1.1.2 Epidemiologie von HIV	2
1.1.2.1 Klinische Prävalenz, Inzidenz und Mortalitätsrate der HIV Infektion	2
1.1.2.2 Übertragung von HIV.....	4
1.1.2.3 Krankheitsverlauf bei HIV/AIDS	4
1.1.2.4 Phylognese von HIV	6
1.1.3 Charakteristische Eigenschaften von HIV	9
1.1.3.1 Taxonomie von HIV.....	9
1.1.3.2 Genomaufbau von HIV	9
1.1.3.3 Partikelstruktur von HIV	11
1.1.3.4 Funktion der HIV Proteine	13
1.1.3.5 Replikationszyklus von HIV	16
1.1.4 Behandlungsansätze zur Therapie von HIV Infektionen	21
1.1.4.1 Antiretrovirale Kombinationstherapie.....	21
1.1.4.2 Resistenzentwicklung bei der antiretroviralen Therapie	25
1.1.4.3 Therapieansätze der Zukunft	28
1.2 Entwicklung von neuen Wirkstoffen	31
1.2.1 Ansätze und Herausforderungen in der Wirkstoffentwicklung	31
1.2.2 Naturstoffe als Grundlage der Wirkstoffentwicklung	34
1.2.3 Multiple Antiviral γ -Pyrone Inspired Compounds	37
1.3 Zielsetzung der Dissertation	40
2. Materialien.....	41

2.1 Geräte und Software	41
2.2 Verbrauchsmaterialien	43
2.3 Chemikalien, Lösungen und Kits	44
2.4 MAGIC und Referenzsubstanzen.....	47
2.5 Zellen und Zelllinien	47
2.5.1 LC5-RIC und LC5-RIC-R5 Zelllinie	47
2.5.2 HEK293T/17 Zelllinie	48
2.5.3 H9 Zelllinie.....	49
2.5.4 PBMC.....	49
2.6 Viren und Bakterien	49
2.7 Plasmide	50
2.8 Medien und Pufferlösungen	50
2.9 Primer.....	51
2.10 Antikörper.....	52
3. Methoden	53
3.1 Zellbiologische Methoden	53
3.1.1 Kultivierung von Zellen und Zelllinien	53
3.1.1.1 Isolation von PBMC mittels Ficoll-Gradient	54
3.1.2 Zählen und Aussäen von Zellen für Experimente.....	54
3.1.3 Zelltoxizitäts- und Zellviabilitätsassays	55
3.1.3.1 CellTox™ Green Toxizitätsassay	55
3.1.3.2 CellTiter-Blue® Viabilitätsassay.....	56
3.1.3.3 CellTiter-Glo® Viabilitätsassay	56
3.2 Virologische Methoden	57
3.2.1 Produktion von HIV	57
3.2.1.1 Produktion von HIV Laborstämmen aus Plasmiden	57
3.2.1.2 Expansion von HIV Patientenisolaten	57
3.2.2 Infektionsexperimente mit HIV	58

3.2.2.1 Stimulation von PBMC.....	58
3.2.3 Bestimmung der Virustiter mittels neuer TCID50 Bestimmungsmethode	59
3.2.4 EASY-HIT Infektionsinhibitions-Assay	59
3.2.4.1 EASY-HIT mit infizierten PBMC	60
3.2.5 Photostabilitäts-Assay	61
3.2.6 Time-of-Addition Assay	61
3.2.7 Kombinations-Assay	61
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	62
3.3.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	62
3.3.2 Expansion von Plasmiden.....	62
3.3.2.1 Transformation von Bakterien	62
3.3.2.2 Plasmidpräparation aus Bakterien.....	63
3.3.3 Quantitative Analyse integrierter proviraler HIV-DNA	63
3.3.3.1 Extraktion genomischer DNA	64
3.3.3.2 Alu-PCR.....	64
3.3.3.3 Nested-PCR.....	66
3.3.4 Quantitative Analyse relativer Level von HIV-1 Transkripten	67
3.3.4.1 RNA Extraktion	67
3.3.4.2 Synthese komplementärer cDNA	67
3.3.4.3 Real-Time qPCR	68
3.4 Biochemische Methoden.....	70
3.4.1 HIV-Reverse-Transkriptase-Aktivitäts-Assay	70
3.4.2 HIV-Integrase-Aktivitäts-Assay	70
3.4.3 HIV-Protease-Aktivitäts-Assay	71
3.4.4 BCA Protein Assay	71
3.4.5 Qualitativer Nachweis von Proteinen.....	72
3.4.5.1 SDS-PAGE	72
3.4.5.2 Western Blot.....	73

3.4.5.3 Immunproteindetektion	73
3.4.6 Quantitativer Nachweis von Proteinen	73
3.4.6.1 HIV-1 p24 ELISA	73
3.4.6.2 Proteomics.....	74
3.5 Statistische Auswertung	76
4. Ergebnisse	77
4.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen der MAGIC Substanzgruppe	77
4.1.1 Einfluss struktureller Änderungen am Molekül auf den anti-HIV Effekt.....	77
4.1.1.1 Einfluss verschiedener Substituenten am Benzolring auf die anti-HIV Aktivität ...	80
4.1.1.2 Einfluss der Position der Substituenten am Benzolring auf die anti-HIV Aktivität..	81
4.1.1.3 Einfluss des aromatischen Systems und Linkers auf die anti-HIV Aktivität	82
4.1.1.4 Einfluss der Konfigurationsisomerie auf die anti-HIV Aktivität.....	83
4.1.1.5 Einfluss des elektrophilen Zentrums im γ -Pyroneering auf die anti-HIV Aktivität.....	85
4.1.2 Einfluss struktureller Änderungen auf die Photostabilität der MAGIC Substanzgruppe	86
4.1.3 Einfluss struktureller Änderungen auf die Zytotoxizität der MAGIC Substanzgruppe....	88
4.1.4 Wahl der Leitsubstanz.....	90
4.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von Substanz #7 im Vergleich zu klinisch angewandten Medikamenten	92
4.2.1 Untersuchung des Einflusses von Substanz #7 auf die enzymatische Aktivität von HIV-Proteinen	93
4.2.2 Untersuchung der Wirksamkeit von Substanz #7 zu verschiedenen Zeitpunkten des HIV Replikationszyklus	94
4.2.3 Untersuchung des Einflusses von Substanz #7 auf die provirale Integration	99
4.3 Untersuchung des Einflusses von Substanz #7 auf provirale und zelluläre Genexpression	101
4.3.1 Einfluss von Substanz #7 auf die Biosynthese von HIV-Strukturproteinen.....	101
4.3.2 Einfluss von Substanz #7 auf HIV spezifische Transkription	103
4.3.3 Proteomics-Analyse des Effektes von Substanz #7 in PBMC	105

4.4 Untersuchung der anti-HIV Aktivität von Substanz #7 gegen HI Viren mit unterschiedlichem Tropismus.....	108
4.5 Untersuchung der anti-HIV Aktivität von Substanz #7 gegen klinische Virusisolate verschiedener HIV-Genotypen	109
4.5.1 Anti-HIV Aktivität von Substanz #7 gegen verschiedene klinische Isolate.....	109
4.5.2 Anti-HIV Aktivität von Substanz #7 gegen HIV-Isolat aus Patient mit vollständigem Therapieversagen.....	110
4.6 Untersuchung der anti-HIV Aktivität von Substanz #7 in Kombination mit klinisch angewandten Medikamenten	112
5. Diskussion	115
5.1 Substanz #7 wird aufgrund seiner optimierten anti-HIV Aktivität, Toxizität und Photostabilität in den SAR Studien zur zukünftigen Leitsubstanz der neuen Substanzklasse MAGIC.....	115
5.1.1 Pharmakologisch unfavorisierte Nitrogruppe kann besonders durch Fluorierung ohne Verlust der anti-HIV Aktivität ersetzt werden	116
5.1.2 Substituenten in ortho-/para-Position des Benzolrings führen im Vergleich zu gleichen Substituenten in meta-Stellung zu stärker antiviral wirksamen MAGIC Substanzen ...	117
5.1.3 Lineare und rigide Form der Molekülstruktur ist essentiell für die anti-HIV Aktivität der MAGIC Substanzen.....	118
5.1.4 Elektrophiles Zentrum im γ -Pyroneering spielt keine Rolle bei der Bindung an ein mögliches Zielmolekül.....	119
5.1.5 Besonders halogenierte MAGIC Substanzen zeigen eine stark verbesserte Photostabilität.....	120
5.1.6 Austausch der pharmakologisch unfavorisierten Nitrogruppe führt zu einer starken Verbesserung der toxikologischen Eigenschaften der MAGIC Substanzen	121
5.1.7 Leitsubstanz #7 zeigt orale Bioverfügbarkeit in ersten Experimenten mit Mäusen	121
5.2 Substanz #7 inhibiert die HIV Infektion mithilfe einer neuartigen Wirkungsweise auf posttranskriptioneller Ebene der Genexpression.....	123
5.2.1 Substanz #7 zeigt keinen Einfluss auf die HIV Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease	123
5.2.2 Substanz #7 unterscheidet sich hinsichtlich der antiviralen Wirkungsweise von allen in der Klinik eingesetzten Medikamenten	123
5.2.3 Substanz #7 zeigt lediglich einen mäßigen Einfluss auf die provirale Integration in das Wirtsgenom der Zelle.....	126
5.2.4 Substanz #7 inhibiert die HIV Replikation auf posttranskriptioneller Ebene beim Übergang von der frühen in die späte Phase der Genexpression	126

5.2.5 Substanz #7 zeigt allgemeine, sowie HIV spezifische Effekte auf zelluläre Mechanismen und Signalwege	130
5.3 Substanz #7 zeigt ein breites und hochpotentes Wirkspektrum gegen HI Viren aller Genotypen und Wirtstropismen	132
5.4 Substanz #7 zeigt synergistische anti-HIV Aktivität in Kombination mit RT- und Integraseinhibitoren	133
5.5 Substanz #7 als mögliche Basis zur Entwicklung eines neuen Wirkstoffes für die antivirale Therapie	134
6. Zusammenfassung	137
7. Anhang	138
7.1 Abkürzungsverzeichnis	138
7.2 Plasmidkarten	143
7.3 Zusatz zum Photostabilitäts-Assay.....	144
7.4 Übersicht zur Zytotoxizität von MAGIC-Derivaten in LC5-RIC Zellen	145
7.5 Anti-HIV Wirkung von MAGIC-Derivaten in H9 Zellen	147
7.6 Zusatz zur Proteomicsanalyse.....	149
8. Referenzen.....	154
9. Danksagung.....	171
10. Lebenslauf	173
11. Veröffentlichungen	174
11.1 Paper	174
11.2 Vorträge auf Konferenzen	175
11.3 Posterpräsentationen auf Konferenzen.....	175
12. Eidesstattliche Erklärung	176

1. Einleitung

1.1 Humanes Immundefizienz-Virus

1.1.1 Entdeckung und Geschichte von HIV

Die ersten Ausbrüche der Immunschwächeerkrankung AIDS (engl. „Acquired Immune Deficiency Syndrome“) in der Homosexuellenszene in Kalifornien, USA zu Beginn der 1980er Jahre (1) waren gleichzeitig auch die Geburtsstunde der HIV Forschung. Es dauerte nur knapp zwei Jahre bis ein Virus als Verursacher der Erkrankung gefunden wurde. Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier vom französischen Institut Pasteur in Paris war es 1983 gelungen Virionen zu isolieren und im Labor zu kultivieren. Sie beschrieben das neue Virus als eng mit dem Humanen T-lymphotrophen Leukämie Virus I (HTLV-I) verwandt, grenzten diese jedoch klar voneinander ab, da die entnommenen Antikörper aus dem Serum des untersuchten, infizierten Patienten zwar mit Proteinen von HTLV-I reagierten, jedoch typen-spezifische Antiseren von HTLV-I nicht zu einer Präzipitation mit den Proteinen des Virusisolates führten. Daher definierten sie das Virus als ein völlig neuartiges Retrovirus (2).

Allerdings war die französische Arbeitsgruppe nicht alleine mit ihrer Entdeckung. Auch der amerikanische Wissenschaftler Robert Gallo vom National Institute of Health in Bethesda, Maryland, USA beanspruchte den Ruhm der Neuentdeckung des Virus für sich. Er schrieb in einer Publikation, die nicht nur im gleichen Jahr, sondern zudem in derselben Ausgabe des *Science Journals* veröffentlicht wurde, wie auch die Funde von Barré-Sinoussi und Montagnier, von einem neuartigen Virus, welches er als neues Mitglied der HTLV-Viren charakterisierte und als Ursache für AIDS bezeichnete (3).

Am 23. April 1984 trat Robert Gallo zusammen mit der damaligen Gesundheitsministerin der USA bei einer Pressekonferenz auf die Bühne und erklärte HIV/AIDS den Kampf und sich zum Entdecker des Krankheitserregers. Er sprach davon, innerhalb der nächsten zwei Jahre einen Impfstoff entwickeln zu wollen, um die Krankheit besiegen zu können. Wie wir heute wissen, kam alles anders, Gallo kämpfte im Rechtsstreit mit Montagnier, um die Anerkennung und bis zum heutigen Tage ist es nicht gelungen einen Impfstoff oder gar ein Heilmittel gegen HIV zu entwickeln.

Da es zu Beginn der HIV-Forschung noch keine einheitliche Nomenklatur gab, tauchten zu dieser Zeit einige Bezeichnungen für das Virus auf, welche mehr oder weniger Verwendung fanden. Neben LAV für Lymphadenopathie-assoziiertes Virus und HTLV-III, waren auch Namen wie ARV für AIDS-related Virus oder IDAV für Immundefizienz-assoziiertes Virus im Umlauf. Aus diesem Grund wurde 1986 in einem Artikel des *Nature* Magazins dazu aufgerufen den Namen Humanes Immundefizienz Virus (HIV) einheitlich zu verwenden. Begründet wurde die Namensgebung anhand der üblichen Nomenklatur für Retroviren, die an erster Stelle den Wirtsorganismus stellt,

in diesem Falle den Menschen (engl. „human“), im Anschluss steht eine der pathogenen Haupteigenschaften, also Immundefizienz, und daran wird das Wort Virus angehängt (4).

Insgesamt rund 25 Jahre nach der ursprünglichen Entdeckung von HIV wurden Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier 2008 hierfür der Nobelpreis für Medizin verliehen. Robert Gallo wurde dabei nicht berücksichtigt, was in der Virologen-Gemeinschaft damals bis heute sehr gemischt aufgenommen wurde (5,6).

1.1.2 Epidemiologie von HIV

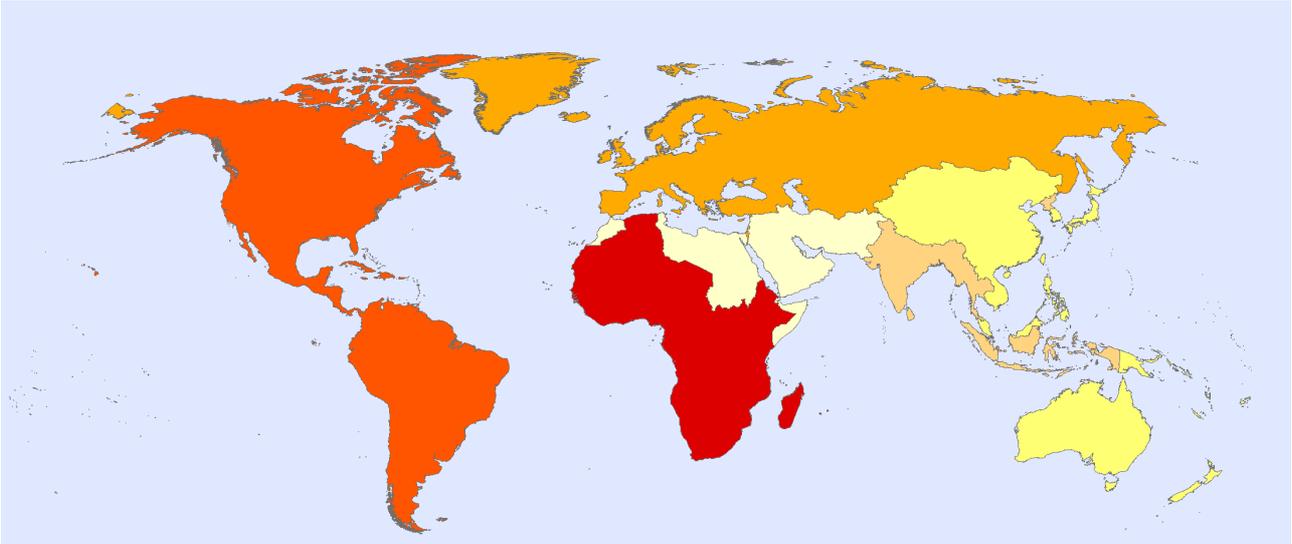
HIV ist es gelungen, sich aufgrund seiner besonderen Charakteristika pandemisch auf der gesamten Welt auszubreiten und zu manifestieren. In diesem Teil der Dissertation soll die Epidemiologie des Virus genauer beleuchtet werden. Hierbei soll Aufschluss über die globale Verbreitung, die möglichen Übertragungswege des Virus, den Krankheitsverlauf nach HIV Infektion, aber auch den Ursprung von HIV gegeben werden.

1.1.2.1 Klinische Prävalenz, Inzidenz und Mortalitätsrate der HIV Infektion

Laut aktuellsten Informationen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren im Dezember 2018 weltweit rund 37,9 Millionen Menschen mit HIV-1 infiziert. Dies entspricht einer Prävalenz von 0,8 % in der Bevölkerungsgruppe der 15- bis 49-Jährigen. In 2018 kam es zu insgesamt rund 1,7 Millionen Neuinfektionen mit HIV, während schätzungsweise 0,77 Millionen Menschen an den Folgen der AIDS Erkrankung verstarben. Im Vergleich zu 2010 ist hierbei die Zahl der Menschen, die mit HIV leben um 20 % gestiegen. Dieser Anstieg ist jedoch vor allem auf die durch die effektive antiretrovirale Therapie stark verminderte Mortalitätsrate und weniger auf eine erhöhte Inzidenz zurückzuführen. Seit 2010 kam es jährlich zu 33 % weniger HIV/AIDS basierten Todesfällen, während die Anzahl der Neuinfektionen pro Jahr im Vergleichszeitraum nur um rund 16 % zurückgegangen ist (7).

Bei einem Blick auf die weltweite Verteilung der HIV infizierten Menschen fällt auf, dass fast zwei Drittel auf dem afrikanischen Kontinent beheimatet sind (Abbildung 1). Jedoch sind die Zahlen für die Inzidenz und die Mortalitätsrate in Afrika seit 2000 insgesamt rückläufig. Wohingegen in den WHO Regionen Europa und Östliche Mittelmeerregion (welche vor allem das nordöstliche Afrika bis Pakistan umfasst) die Zahl an Neuinfektionen im gleichen Zeitraum um 18 % bzw. 31 % gestiegen ist (7).

A - Weltweite Prävalenz der HIV-1 Infektionen 2018



B - 37,9 Mio. Menschen leben weltweit mit HIV-1

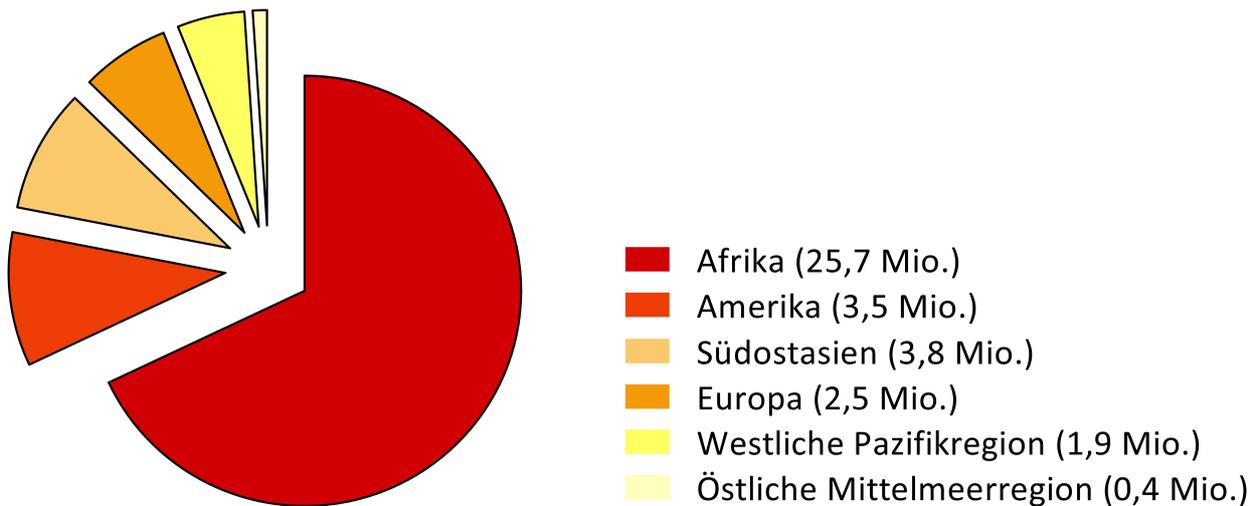


Abbildung 1. Weltweite Prävalenz der HIV-1 Infektionen 2018. (A) Laut WHO beträgt die weltweite Prävalenz von HIV-1 Infektionen in (%) bei 15- bis 49-Jährigen 0,8 [0,6-0,9]; unterteilt in die einzelnen WHO Regionen: Östliche Mittelmeerregion (hellgelb: 0,1 [$<0,1-0,1$]), Westliche Pazifikregion (gelb: 0,1 [0,1-0,2]), Südostasien (hellorange: 0,3 [0,2-0,4]), Europa (orange: 0,4 [0,4-0,5]), Amerika (hellrot: 0,4 [0,4-0,5]) und Afrika (rot: 3,9 [3,3-4,5]) (7). (B) Das Kuchendiagramm zeigt den Anteil Menschen aller Altersgruppen, die mit einer HIV-1 Infektion leben, nach WHO Region. Weltweit leben rund 37,9 Mio. Menschen mit HIV-1. Die Abbildung wurde teils von der WHO übernommen und angepasst (A) bzw. mithilfe von durch die WHO veröffentlichten Zahlen selbst angefertigt (B) (7).

Die WHO verfolgt mit großem Nachdruck das „90-90-90“-Ziel, wonach bis zum Jahr 2020 insgesamt 90 % aller HIV Infizierter über ihren Status informiert sein sollen. Davon sollen weitere 90 % die antiretrovirale Therapie erhalten und bei wiederum 90 % der unter Therapie stehenden Patienten die Virusmenge unterhalb der Nachweisgrenze sein. So könnte die Pandemie unter

Kontrolle gebracht werden. Der aktuelle Stand dieses Zieles in 2018 lautet „79-78-86“, es gilt also in allen Regionen der Welt weiterhin für mehr Aufklärung und Unterstützung zu sorgen, um dieses ambitionierte Ziel noch erreichen zu können (8,9).

1.1.2.2 Übertragung von HIV

HIV lässt sich in bestimmten Körperflüssigkeiten wie Blut, Vaginal-, Rektal- und Samenflüssigkeit, sowie Muttermilch von HIV positiven Menschen nachweisen. Daher gibt es verschiedene Transmissionsrouten, über die es durch Kontakt von kontaminierten Körperflüssigkeiten mit Schleimhäuten, offenen Wunden oder Injektion direkt in die Blutbahn zu einer HIV Infektion kommen kann (10). Die größte Gefahr besteht hierbei vor allem bei ungeschütztem analen oder vaginalen Geschlechtsverkehr mit einer HIV positiven Person (10). Eine erfolgreiche antiretrovirale Therapie der HIV Infektion, wodurch sich die Viruslast des Patienten unter der Nachweisgrenze befindet, verringert die Übertragungsrate bei Paaren mit unterschiedlichem serologischen Status deutlich (11,12). Besonders hohes Risiko besteht auch für Personen, die sich beim Drogenkonsum beispielsweise Spritzen oder Nadeln teilen, die zur Injektion der Drogen dienen (10). Zu Beginn der HIV/AIDS Pandemie, als die genauen Übertragungswege noch nicht bekannt waren, bestand zudem ein hohes Risiko sich durch Bluttransfusionen oder bei Organtransplantationen mit HIV zu infizieren. Heutzutage werden alle Blutkonserven streng kontrolliert und entsprechend auf HIV und andere Krankheitserreger getestet, um die Infektion über diese Transmissionsroute nahezu ausschließen zu können (10). Bei HIV positiven Müttern besteht während der Schwangerschaft, bei der Geburt, sowie beim Stillen des Säuglings die Gefahr einer Übertragung der HIV Infektion auf das Kind. Das Risiko einer solchen Transmission kann durch entsprechende Therapie der Mutter stark minimiert werden (10).

1.1.2.3 Krankheitsverlauf bei HIV/AIDS

Vom Zeitpunkt des ursprünglichen Erstkontaktes mit HIV und der damit einhergehenden Infektion bis hin zum Ausbruch der Krankheit AIDS und dem Tod des Infizierten dauert es ohne Behandlung im Durchschnitt 8-10 Jahre (Abbildung 2). Der Verlauf der HIV Infektion kann in drei Phasen unterteilt werden. Der Zeitraum direkt nach der Infektion bis ungefähr 6-9 Wochen danach bezeichnet man als akute Phase. Hierbei etabliert sich die Infektion im Körper des Infizierten, wodurch sehr hohe Viruslasten von über 10^6 Kopien der HIV RNA im Blut mittels RT-PCR nachgewiesen werden können (13). Diese Phase der akuten Infektion führt zu einem ersten starken Einbruch der Anzahl der von HIV infizierten CD4⁺ T-Lymphozyten. Die am häufigsten auftretenden

Anzeichen ähneln typischen Grippe Symptomen wie Fieber, geschwollenen Lymphknoten oder Hautausschlägen. Aufgrund dieser sehr unspezifischen Symptomen kann eine HIV Infektion nicht ohne einen entsprechenden Test nachgewiesen werden. Hierbei können die HIV RNA oder das Gag-p24 Antigen im Blut mittels RT-PCR bzw. p24-ELISA, sowie vom Immunsystem gebildete Antikörper, jedoch erst rund 6-8 Wochen nach Beginn der Infektion, mithilfe eines HIV-Antikörpertests nachgewiesen werden (13).

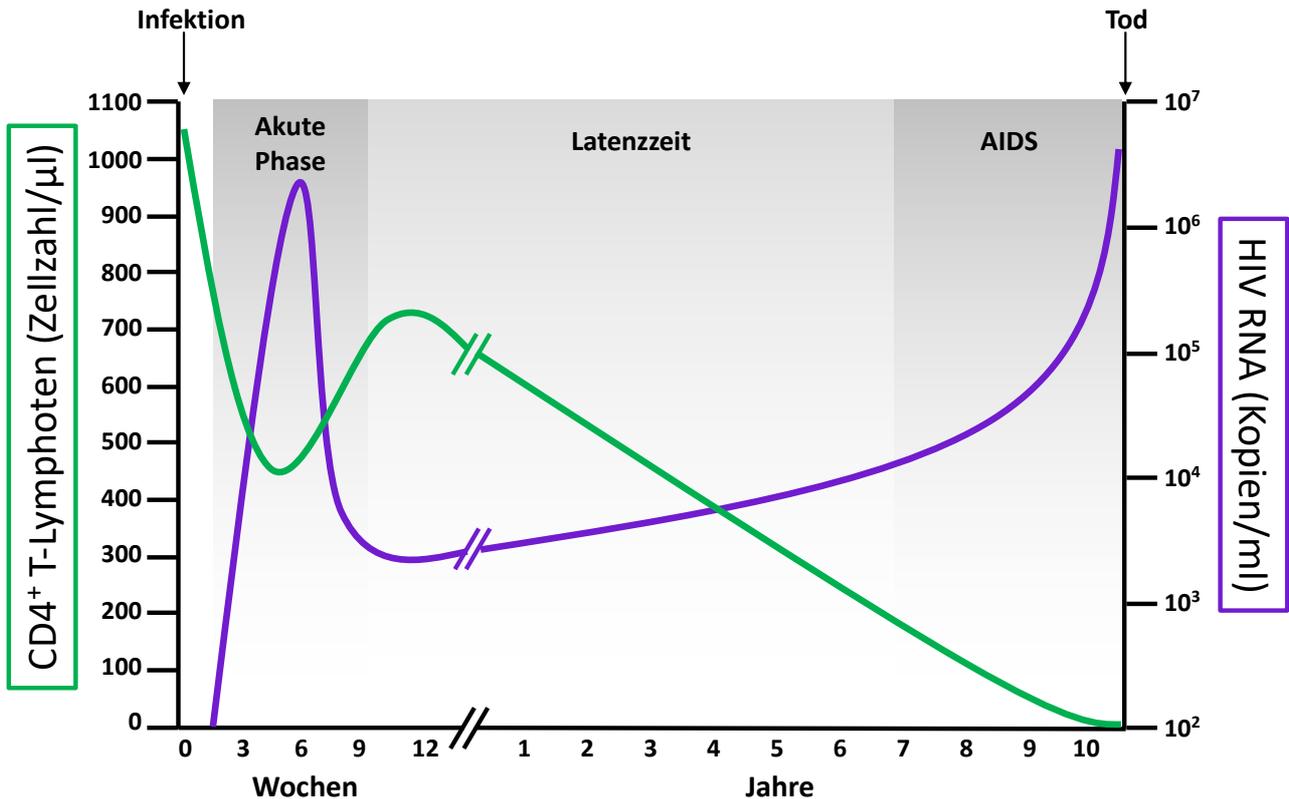


Abbildung 2. Schematischer Verlauf einer HIV Infektion. Gezeigt werden sowohl eine repräsentative Anzahl CD4⁺ T-Lymphozyten (grün), als auch die im Blut nachweisbaren Kopien der HIV RNA (lila) im Verlauf der Jahre einer HIV Infektion vom Zeitpunkt der ursprünglichen Infektion bis hin zum Tod des Patienten. Die HIV Infektion wird in drei Hauptphasen unterteilt: Akute Phase zu Beginn der Infektion, Latenzzeit und der Ausbruch von AIDS. Das Schema entspricht einer adaptierten Form einer Abbildung aus (14).

Im Anschluss an diese akute Phase der Infektion stabilisiert sich die Zahl der CD4⁺ T-Lymphozyten und HIV fällt in einen latenten Zustand (Abbildung 2). In dieser zweiten Phase, der Latenzzeit, werden deutlich geringere Mengen der Virionen produziert. Jedoch sinkt die Zahl der im Patienten vorhandenen T-Helferzellen immer weiter ab, bis es aufgrund des durch HIV immer weiter geschwächten Immunsystems zu einer Anhäufung von opportunistischen Erkrankungen kommt, welche der Körper eines gesunden Menschen eigentlich ohne Probleme ausheilen könnte (15).

Dies führt zum Übergang in das letzte Stadium der Infektion, die Manifestierung der AIDS Erkrankung. Laut WHO gilt eine nachgewiesene HIV Infektion mit gleichzeitigem Auftreten einer AIDS-definierenden Erkrankung, wie beispielsweise die Candidose, eine CMV Infektion, Histoplasmose oder auch ein Kaposi-Sarkom, oder eine nachgewiesene HIV Infektion mit gleichzeitiger Zahl CD4⁺ T-Lymphozyten unter 200 Zellen/ μ l (bzw. <15 % Anteil an allen Lymphozyten) als AIDS. Zuletzt sterben die Patienten aufgrund des durch HIV extremst kompromittierten Immunsystems an den Folgen der opportunistischen Erkrankungen (15,16).

Durch die antiretrovirale Kombinationstherapie kann die Phase der Latenzzeit des Virus stark verlängert werden, wodurch die Infektion zwar nicht besiegt werden kann, jedoch aus einem klaren Todesurteil eine kontrollierbare Erkrankung wird.

1.1.2.4 Phylogenese von HIV

Die HI-Viren lassen sich in zwei Typen unterteilen, HIV-1 und HIV-2. Betrachtet man die Aminosäuresequenzen beider Virustypen, beträgt deren Sequenzhomologie lediglich 45-50 %. Trotz dieses erheblichen Unterschiedes haben beide Viren sehr ähnliche Eigenschaften in Bezug auf ihre Transmissionsroute oder den Krankheitsverlauf – in beiden Fällen führt die Infektion letztendlich zu AIDS. Jedoch ist der Transmissionsgrad bei HIV-2 geringer und auch die Infektion selbst verläuft deutlich verlangsamt und milder als bei HIV-1. Während sich HIV-2 Infektionen auf Westafrika konzentrieren, erstreckt sich HIV-1 über den gesamten Globus (17).

Beide Viren lassen sich weiter in Gruppen und Subtypen unterteilen, die sich mehr oder weniger häufig auf der Welt verbreitet haben. HIV-1 wird in vier Gruppen unterteilt. Hierbei sind Viren der M-Gruppe („Major“) hauptverantwortlich für die HIV Pandemie. Viren der Gruppen N, O und P beschränken sich auf Kamerun und Westafrika (18-20). HIV-1 Gruppe M Viren werden weiter in die Subtypen A, B, C, D, F, G, H, J und K unterteilt, während die Subtypen A und F mit weiteren Sub-Subtypen A1, A2, A3, A4 und A6 bzw. F1 und F2 bezeichnet werden können (21). Subtyp C ist hauptsächlich in Afrika zu finden und ist mit 48,2 % am häufigsten vertreten. Subtyp A (12,0 %) ist in Zentralasien beheimatet, wohingegen Subtyp B mit 11,3 % vorherrschend in Europa und auf dem amerikanischen Kontinent vorkommt. Zudem besteht ein bedeutender Anteil von 20,5 % der HIV-1 Gruppe M Viren aus sogenannten CRFs („Circulating recombinant forms“), also Rekombinanten aus zwei Subtypen (19,21). HIV-2 wird in die nicht-rekombinanten Gruppen A-G unterteilt, die, wie oben erwähnt, hauptsächlich in den Ländern Westafrikas verbreitet sind (22).

Der eigentliche Ursprung von HIV findet sich auf dem afrikanischen Kontinent wieder. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ist der erste Kontakt des Menschen auf zoonotische Übertragungen von SI-Viren (Simianes Immundefizienz-Virus) aus unterschiedlichen Affenspezies zurückzuführen, die

sich im Anschluss durch Mutationen an den menschlichen Organismus angepasst haben. HIV-1 Viren aus den Gruppen M, N und O sind sehr wahrscheinlich aus SIV entstanden, welches ursprünglich von Schimpansen (SIVcpz) übertragen wurde (22,23). HIV-1 Gruppe P Viren mutierte aus zoonotisch transmittierten SIV aus Gorillas (SIVgor) (20), wohingegen HIV-2 Viren von SI-Viren aus Rußmangaben (SIVsmm) abstammt, Primaten aus der Familie der Meerkatzen (22,24). Die engen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen HIV und SIV werden im phylogenetischen Baum in Abbildung 3 noch einmal genauer hervorgehoben.

Es ist nicht ganz geklärt wie genau es zu diesen Zoonosen gekommen ist. Vermutungen legen nahe, dass es zum ersten Kontakt des Menschen mit SI-Viren durch die Jagd und den Verzehr von Affen kam. Beim Ausnehmen der Jagdbeute könnte das Virus in offene Wunden des Jägers eingetreten sein. Die ältesten Proben von HIV-Infizierten stammen aus den Jahren 1959 und 1960 (25,26). Anhand der Analyse beider Proben konnte aufgrund deutlicher sequenzieller Unterschiede festgestellt werden, dass HIV schon lange vor 1960 in Afrika zirkulierte. Das Erstauftreten von HIV wird auf die Jahre zwischen 1902 und 1921 geschätzt (26). Es stellt sich jedoch die Frage, wie sich HIV pandemisch ausbreiten konnte und auf welchem Weg es bis zum ersten dokumentierten Auftreten von AIDS in Kalifornien in die USA gelangen konnte. Die Reportage „AIDS - Erbe der Kolonialzeit“ folgte Dirk E. Teuwen und Michael Worobey, Koautoren des zitierten *Nature* Artikels, auf ihrem Weg zur Aufklärung der Herkunft und des Alters der HIV Infektionen (26,27). Es wird angenommen, dass sich das Virus, besonders durch die Verwendung unsteriler Spritzen im Zuge der Behandlung von Trypanosomiasis (der Schlafkrankheit) während der Kolonialzeit in Belgisch-Kongo Anfang der 1960er Jahre, innerhalb der lokalen Bevölkerung stark verbreiten konnte (27). Im Anschluss an die Kolonialherrschaft wurde HIV von Aufbauarbeit leistenden Haitianern 1967 aus Afrika auf den amerikanischen Kontinent überführt und hiernach über Bluttransfusionen in die USA verschleppt. 1968 wurden beim Patienten Robert Rayford AIDS ähnliche Symptome beschrieben, jedoch konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich damals um eine HIV-1 Infektion handelte (28). Die frühesten serologischen Nachweise in den USA stammen von 1978 und wurden in Gruppen homosexueller Männer in San Francisco und New York City nachgewiesen (29,30).

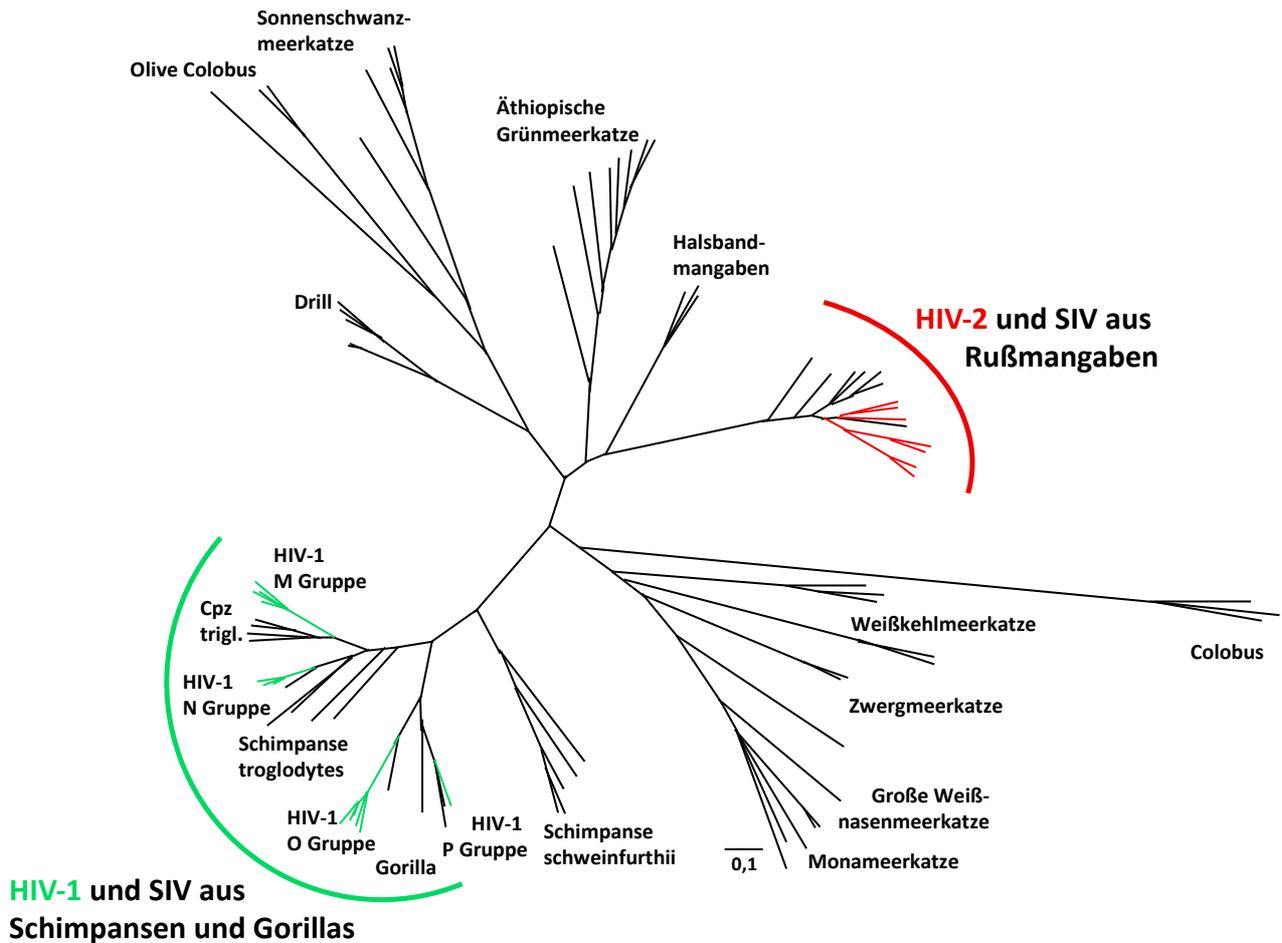


Abbildung 3. Phylogenetischer Baum basierend auf den kompletten Genomen von HI und SI Viren. Die Skala (0,1) steht für 10 % Unterschied auf Nukleotid-Level. **Humane Viren:** HIV-1 M Gruppe (engl. „major group“), wird in Subtypen A, B, C, D, F, G, H, J und K und weiter in die Sub-Subtypen A1, A2, A3, A4, A6, F1, und F2 unterteilt. Gruppe M Viren sind hauptverantwortlich für die Pandemie. HIV-1 O Gruppe (engl. „outlier group“), häufigster Genotyp in Westafrika. HIV-1 N Gruppe (engl. „Not-M, Not-O group“), wurde bisher nur in einer kleinen Gruppe von Infizierten in Westafrika gefunden. HIV-1 P Gruppe, Ursprung aus Zoonose von SIV aus Gorillas, HIV-2 nicht-rekombinante Gruppen A-G, Ursprung aus Zoonose von SIV aus Rußmangaben. **Für Zoonosen verantwortliche Affen-Viren:** SIV aus Schimpansen, *Pan troglodytes troglodytes* und *Pan troglodytes schweinfurthii*, SIV aus Gorillas und SIV aus Rußmangaben. Der phylogenetische Baum wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Brian T. Foley aus der Arbeitsgruppe für theoretische Biologie und Biophysik des Los Alamos National Laboratory, USA angefertigt. Zur Erstellung dieses phylogenetischen Baumes wurden alle Sequenzen aus der Kategorie „other SIV/includes HIV-1 and HIV-2 sequences“ (ohne 5' und 3' LTR Region) der Sequenzdatenbank des Los Alamos National Laboratory, USA verwendet.

1.1.3 Charakteristische Eigenschaften von HIV

1.1.3.1 Taxonomie von HIV

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) gehört zur Ordnung der *Ortervirales* und zur Familie der *Retroviren*. Weiterhin wird es der Unterfamilie *Orthoretrovirinae* und der Gattung *Lentivirus* zugeordnet. Auch der vom Affen abstammende Vorläufer von HIV, das Simiane Immundefizienz Virus (SIV), folgt dieser Taxonomie. Bei HIV handelt es sich um ein behülltes Virus mit komplexer Symmetrie, aufgrund des konisch vorliegenden Kapsids, und als Dimer vorliegendem Einzelstrang-(ss)RNA-Genom mit positiver (+)-Polarität (14).

1.1.3.2 Genomaufbau von HIV

Die gesamte genetische Information des HI Virus wird von einem (+)ssRNA-Genom mit einer Länge von 9.200-9.600 Nukleotiden bei HIV-1, rund 9.800 Nukleotiden bei HIV-2 codiert (31). Jedes Viruspartikel enthält je zwei Kopien des viralen Genoms (31). Um repliziert werden zu können, wird die virale RNA zuerst zu DNA revers transkribiert und als Provirus in das Wirtsgenom integriert (Details s. 1.1.3.5) (14). Das provirale HIV Genom enthält neun offene Leserahmen, sogenannte „open reading frames“ (ORFs), die für insgesamt 15 Proteine codieren (Abbildung 4A). Diese ORFs des Provirus werden zu beiden Seiten von nicht-proteinkodierenden LTR-Sequenzen (engl. „long terminal repeat“) eingefasst, welche den Promotor für die Transkription der viralen Gene enthalten (32). Die 15 Proteine verteilen sich wie folgt auf die neun ORFs (32): Das *gag*-Gen codiert für das Gag-Polyprotein, welches als Vorläufer für das Matrix-Protein p17, das Kapsid-Protein p24, das Nukleokapsid-Protein p7, sowie das Protein p6 dient. Durch proteolytische Spaltung des Gag-Polyproteins entstehen die jeweiligen Einzelproteine. Das *pol*-Gen, welches für die viralen Enzyme Protease (PR, p12), Reverse Transkriptase mit RNase H-Domäne (RT, p66) und Integrase (IN, p32) codiert, überlappt vor allem mit dem ORF des Gens *gag*, weshalb das daraus entstehende Produkt Gag-Pol-Polyprotein genannt wird. Auch dieses Polyprotein wird autokatalytisch von der HIV-Protease gespalten. Das *env*-Gen enthält kodierende Sequenzen für die beiden Oberflächenproteine gp120 und gp41. Hinzu kommen insgesamt sechs ORFs für die regulatorischen Proteine Tat und Rev, welche in jeweils zwei Exons kodiert werden und somit nur durch alternatives Splicing der ursprünglichen mRNA entstehen können (33), sowie die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef (32). Im Falle von HIV-2 wird anstelle des *vpu* Gens das *vpx* Gen codiert (34).

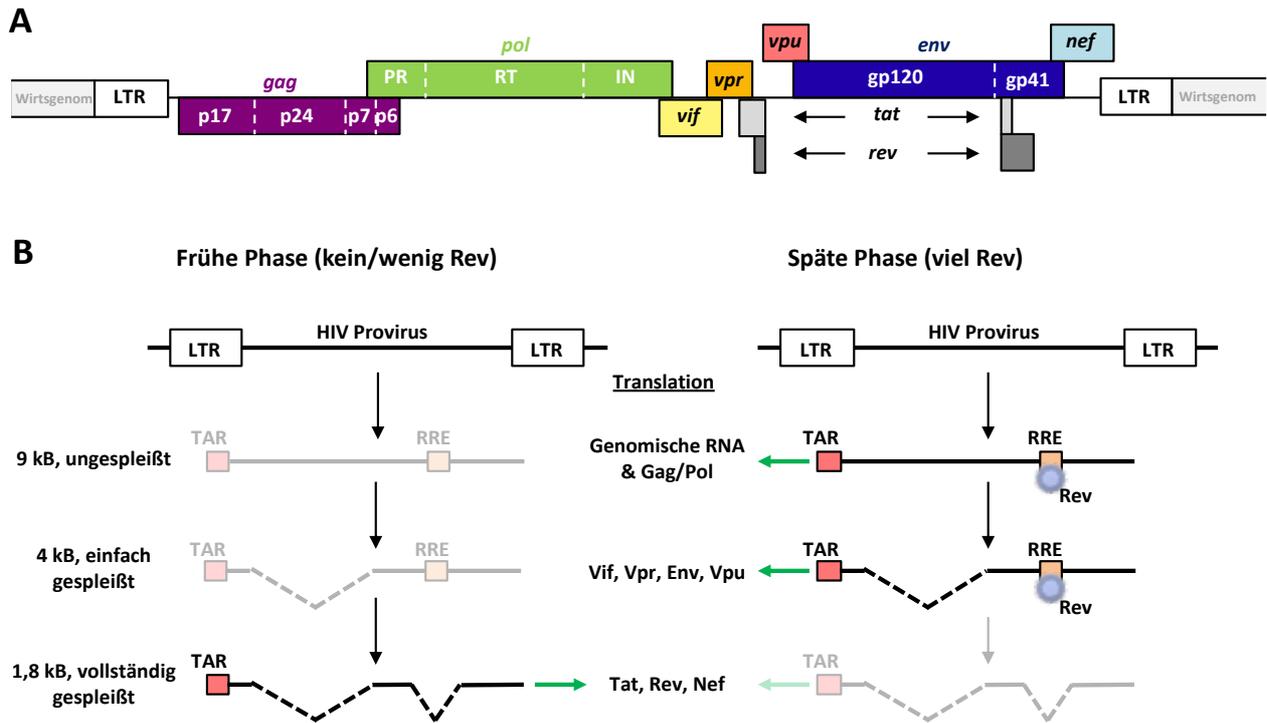


Abbildung 4. Schematische Darstellung des im Wirtszellgenom integrierten Provirus und der Transkripte in früher und später Phase der Expression: (A) Das in das Wirtszellgenom integrierte provirale Genom von HIV beinhaltet insgesamt neun offene Leserahmen, die auf beiden Seiten von nicht-kodierenden LTR Sequenzen (weiß) eingefasst werden (32). Das *gag*-Gen (violett) kodiert hierbei für die Strukturproteine p17 (Matrix), p24 (Kapsid) und p7 (Nukleokapsid), sowie das Protein p6. Der Leserahmen für *pol* (grün) enthält Sequenzen für die HIV-Enzyme Protease (PR, p12), Reverse Transkriptase mit RNase H (RT, p66) und Integrase (IN, p32). Das *env*-Gen kodiert für die beiden Oberflächenproteine gp120 und gp41. Zudem beinhaltet das HIV-Genom noch Leserahmen für die regulatorischen Proteine Tat (hellgrau) und Rev (dunkelgrau), sowie die akzessorischen Proteine Vif (gelb), Vpr (orange), Vpu (rot) und Nef (hellblau). Im Falle von HIV-2 wird anstelle von Vpu das Protein Vpx exprimiert (34). (B) Bei der Transkription des Provirus entsteht zuerst ein ungespleißtes Vollängentranskript, welches in der Folge durch alternatives Splicing in über 40 verschiedene mRNAs prozessiert wird, die in drei Klassen (9 kB/ungespleißt, 4 kB/einfach gespleißt, 1,8 kB/vollständig gespleißt) eingeteilt werden können. Je nach Phase der Expression liegen diese Transkriptspezies in unterschiedlicher Verteilung vor. Solange noch kein Rev produziert wurde bzw. Rev noch in zu geringen Konzentrationen vorliegt, wird das ursprüngliche Vollängentranskript entweder vollständig gespleißt oder abgebaut. Daher werden in der frühen Phase der Expression nur die von der 1,8 kB mRNA codierten Proteine Tat, Rev und Nef produziert. Sobald genügend Rev (blauer Kreis) im Nukleus vorliegt, kann dieses an das RRE (engl. „Rev responsive element“, oranges Quadrat) binden, das Splicing kontrollieren und die 4 kB und 9 kB mRNAs zur Translation ins Zytoplasma transportieren. So können in der späten Phase der Replikation auch die anderen Virusproteine produziert werden (35). Grüne Pfeile deuten an, welche Proteine in der jeweiligen Phase des Replikationszyklus produziert werden. Transparente Transkripte liegen in der jeweiligen Phase der Expression im Vergleich zu den anderen Transkriptspezies vermindert vor.

Um die Expression aller im proviralen Genom enthaltenen und sich überlappenden ORFs zu kontrollieren, ist HIV auf komplexes alternatives Splicing der mRNA angewiesen. Bei der Transkription des Provirus entsteht zuerst ein ungespleißtes Vollängentranskript, welches in der Folge durch alternatives Splicing an den vier Splice-Donor- und acht Splice-Akzeptor-Stellen in über

40 verschiedene mRNAs prozessiert werden kann, die anhand ihrer ungefähren Größe in drei Klassen (9 kB/ungespleißt, 4 kB/einfach gespleißt, 1,8 kB/vollständig gespleißt) eingeteilt werden können (35-37). Je nach Phase der Expression liegen diese Transkriptspezies in unterschiedlicher Verteilung vor (Abbildung 4B) (36,37). Solange noch kein Rev produziert wurde bzw. Rev noch in zu geringen Konzentrationen vorliegt, wird das ursprüngliche Vollängentranskript entweder vollständig gespleißt oder abgebaut, wodurch zum Großteil vollständig gespleißte mRNAs vorliegen (35,36). Da die größeren Transkriptspezies nur mithilfe des viralen Proteins Rev aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert werden können, werden in dieser frühen Phase der Expression nur die von der 1,8 kB mRNA codierten Proteine Tat, Rev und Nef produziert (35,38,39). Die frühen Proteine Tat und Rev wandern im Anschluss in den Zellkern und verstärken dort die Transkriptionseffizienz bzw. beeinflussen den Übergang von der frühen zur späten Phase der Expression. Sobald genügend Rev im Nukleus vorliegt, kann dieses an das RRE (engl. „Rev responsive element“) binden, das Splicing kontrollieren und die 4 kB und 9 kB mRNAs über den CRM1-Exportmechanismus zur Translation ins Zytoplasma transportieren (38,39). So können in der späten Phase der Replikation auch die anderen Virusproteine produziert werden. Die rund 9 kB große mRNA bildet das gesamte virale Genom ab und kann daher entweder als Template für die Translation der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine dienen oder als virales (+)ssRNA-Genom direkt in einen neuen Viruspartikel eingebaut werden. Die einfach gespleißten mRNA Spezies mit einer Größe von 4 kB codieren für die Env-Proteine, sowie die akzessorischen Proteine Vpu, Vif und Vpr (35,40).

Neben den primären genetischen Informationen zur Produktion der viralen Proteine enthält das RNA-Genom von HIV auch hochkonservierte Sekundärstrukturen, die unter anderem für die Aktivierung der Transkription, den Start der reversen Transkription, die Verpackung der RNA im späteren Virion oder auch den Export der verschiedenen mRNAs aus dem Nukleus verantwortlich sind (41,42).

1.1.3.3 Partikelstruktur von HIV

Das reife HIV Virion (Abbildung 5) erscheint durch Vergrößerung mit einem Elektronenmikroskop als sphärischer Partikel mit einem Durchmesser von rund 100-120 nm (31). HIV-2 ist hierbei morphologisch nicht von HIV-1 zu unterscheiden (43). Im Inneren des Viruspartikels befinden sich zwei Kopien der viralen genomischen RNA, welche als nicht-kovalent verbundenes Dimer und zusammen mit dem Nukleoprotein p7 im sogenannten Nukleokapsid/RNA-Komplex vorliegen (44). Das Nukleokapsid enthält rund 50 Kopien der Protease, Reverse Transkriptase und Integrase, die jeweils im Dimer vorliegen, sowie rund 100-200 Kopien des Vpr Proteins, welches durch

Interaktion mit p6 in das Virion aufgenommen wird (45). Im Inneren des Partikels befinden sich zudem die viralen akzessorischen Proteine Vif und Nef (32,46). Der Proteinkomplex wird von einem konischen Kapsid, bestehend aus dem Kapsidprotein p24, umschlossen. Der Kapsidkegel ist über sein spitz zulaufendes Ende mit der äußeren Kapsidmembran verbunden, welche sich aus dem Matrixprotein p17 zusammensetzt (47). Trimere des Matrixproteins binden mittels Myristinsäurereste an die Innenseite einer das Virion umfassenden Phospholipiddoppelschicht und sorgen so für die Stabilität des Viruspartikels (14).

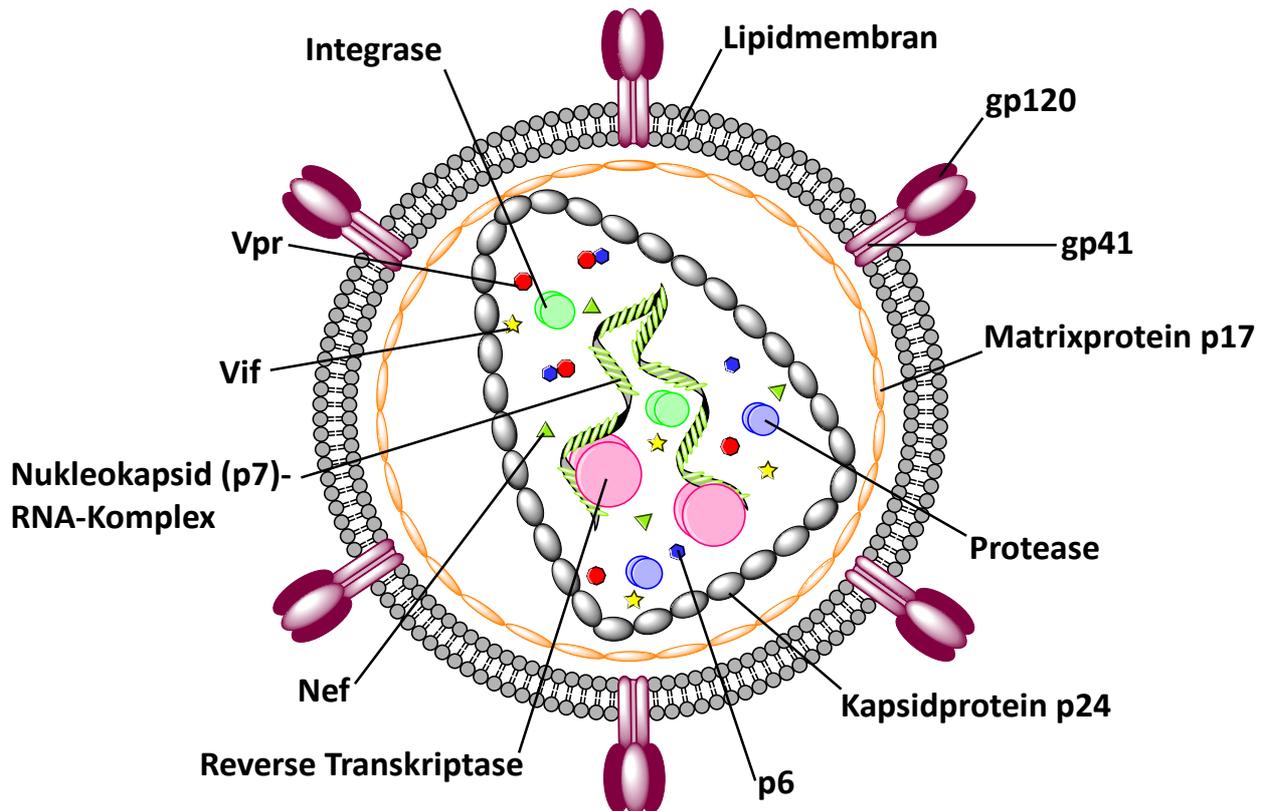


Abbildung 5. Schematische Darstellung eines reifen HIV Virions: Bei HIV handelt es sich um ein behülltes RNA-Virus aus der Familie der Retroviren. Jedes Virion enthält zwei Kopien des (+)ssRNA-Genoms, welches komplexiert mit dem Nukleokapsidprotein p7, sowie der Reversen Transkriptase im Inneren des konisch zulaufenden Kapsids vorliegt, welches sich aus dem Kapsidprotein p24 zusammensetzt. Das Matrixprotein p17 bindet im Inneren über Myristinsäurereste an die Lipidmembran, in der Trimere des Oberflächenproteins gp160, bestehend aus gp120 und gp41, integriert vorliegen. Zudem führt das Viruspartikel die für die Infektion wichtigen Proteine Integrase, Protease, Protein p6, Vif, Vpr, sowie Nef mit sich. gp = Glykoprotein; p = Protein.

Die Virushülle hat ihren Ursprung in der Zellmembran, von der das Virus abknospte. In dieser äußeren Membran verankert befinden sich ungefähr 14 sogenannte Spikes, bestehend aus Trimeren der beiden vom *env*-Gen codierten Proteine (48). Hierbei ist jeweils ein Trimer des Oberflächenproteins gp120 mit einem Trimer des Transmembranproteins gp41 nicht-kovalent

verbunden, worüber die Proteine in die Hüllmembran hineinragen (49-51). Beide Proteine stammen vom Vorläuferprotein gp160 ab, welches durch zelluläre Proteasen gespalten wird.

1.1.3.4 Funktion der HIV Proteine

Das Genom von HIV codiert für insgesamt 15 Proteine, deren Funktion in diesem Abschnitt der Dissertation genauer beschrieben wird.

gag-Gen

Das **Matrix-Protein (p17)** bildet das N-terminale Ende des Gag-Polyproteins, sowie des Gag-Pol-Vorläuferproteins und führt die jeweiligen Polyproteine zum Viruszusammenbau zur Plasmamembran, wo es sich über Myristinsäurereste in der Membran verankert (52). p17 bildet Trimere und trägt zur Stabilität des reifen Viruspartikels bei (14). Zudem hilft das Matrix-Protein beim Einbau des Transmembranproteins gp41 in die Virushüllmembran (53).

Das **Kapsid-Protein (p24)** bildet das konische Kapsid, welches das virale Genom und verschiedene Proteine (s. 1.1.3.3) umschließt (32).

Nukleokapsid-Proteine (p7) ummanteln die virale genomische RNA vollständig und bilden so den Nukleokapsid/RNA-Komplex. Dies führt zur Kondensation der RNA, schützt diese vor Nukleasen und trägt zur Dimerisierung der beiden RNA Moleküle bei (32). Zudem unterstützt p7 die Reverse Transkription der RNA in DNA (45).

Das **Protein p6** bindet an das akzessorische Protein Vpr und führt dieses so während des Viruszusammenbaus in das Virion (54). Zudem ist es bei der Knospung neuer Viruspartikel involviert (55).

pol-Gen

Die **Protease (p10)** ist für die Reifung des Viruspartikels verantwortlich. Dies geschieht durch proteolytische Spaltung des Gag-Polyproteins, sowie des Gag-Pol-Vorläuferproteins in die viralen Strukturproteine p17, p24, p7 und p6, sowie die Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase (31,32).

Die **Reverse Transkriptase** ist ein Heterodimere aus je einem p51- und einem p66-Protein, welche beide aus dem Pol-Polyprotein hervorgehen. Das p66-Protein enthält im Gegensatz zu p51 neben der Polymerasedomäne auch eine RNase H Domäne. Im Heterodimer liegt p66 in seiner offenen, aktiven Form vor, während die p51-Untereinheit durch Konformationsänderungen in seiner geschlossenen, inaktiven Form angehängt ist (56). Das Reverse Transkriptase Dimer katalysiert sowohl die RNA-abhängige, als auch die DNA-abhängige DNA Polymerisation, um die virale RNA vor der Integration ins Wirtsgenom in virale DNA zu transkribieren. Die in p66 zusätzlich vorhandene RNase H Domäne zerschneidet die ursprüngliche virale RNA nach erfolgreicher Transkription des ersten DNA-Stranges und der Bildung eines RNA/DNA-Hybrid Moleküls (56).

Die **Integrase (p32)** ist neben der schon revers transkribierten viralen DNA eine der Hauptkomponenten des Prä-Integrations-Komplexes (PIC) und ist aufgrund seiner enzymatischen Aktivität hauptverantwortlich für die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom der infizierten Zelle (57).

env-Gen

Das **Oberflächenprotein (gp120)** ist eines der beiden Proteine, die durch proteolytische Spaltung des Env-Vorläuferproteins gp160 entstehen. gp120 vermittelt das Andocken des Viruspartikels an Heparansulfate, sowie die Bindung an Oberflächenrezeptoren der Zelle (58,59). Im Detail bindet gp120 spezifisch an CD4-Rezeptoren an der Oberfläche von primären Makrophagen und T-Zellen. Um letztendlich in die Zelle eintreten zu können, ist die Bindung an einen weiteren Korezeptor essentiell. Je nach Viruspartikel kann es hier zu einer Bindung mit den Chemokinrezeptoren CCR5 auf Makrophagen (R5-Tropismus) bzw. CXCR4 auf T-Zellen (X4-Tropismus) kommen (60,61).

Das **Transmembranprotein (gp41)** ist eines der beiden Proteine, die durch proteolytische Spaltung des Env-Vorläuferproteins gp160 entstehen. gp41 ist in der viralen Membran verankert und bindet nicht-kovalent an gp120. Nach der Bindung des Viruspartikels an die Zelle vermittelt gp41 die Fusion von viraler und zellulärer Membran (32).

tat-Gen

Ohne das **Transkriptions-Transaktivator Protein Tat (p14/p16)** verläuft die Transkription des Provirus trotz der Anwesenheit von zellulären Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, Sp1 und TBP sehr ineffektiv (62). Tat rekrutiert den zellulären positiven Transkriptions-Elongationsfaktor P-TEFb zum TAR Element (engl. „Trans-activation Response“), eine RNA Haarnadel-Struktur am 5'-Ende der neu entstehenden viralen mRNA, was zur Hyperphosphorylierung der RNA Polymerase II und somit einer rund 100-fachen Verstärkung der viralen Transkription führt (63-65).

Zudem spielt Tat eine wichtige Rolle in der Regulation des Splicings. Tat verstärkt das Splicing an der Hauptspleißdonorstelle (66) und reguliert in seiner acetylierten Form das Splicing durch Rekrutierung des Spleißregulatorproteins p32, welches als Inhibitor des Spleißfaktors SRSF1 fungiert (67).

rev-Gen

Das **Expressionsregulator-Protein Rev (p19)** spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Splicings der viralen mRNA. Es bindet über ein Arg-reiches Motiv (ARM) an das RRE (engl. „Rev-responsive element“), eine Sekundärstruktur der viralen mRNA, reguliert somit sehr wahrscheinlich das vollständige Splicing der mRNA, wodurch ungespleißte und einfach gespleißte mRNAs stabilisiert werden (35,36). Über den CRM1-abhängigen Export führt Rev diese einfach gespleißten und ungespleißten mRNA Spezies aus dem Nukleus in das Zytoplasma, wo sie in Strukturproteine translatiert werden können (38,39). Zudem reguliert Rev die Provirusmenge pro infizierter Zelle durch Bildung eines integrationsinhibierenden Integrase-Rev-Komplexes, wodurch die Zelle vor dem Zelltod geschützt wird (68).

nef-Gen

Der **Negativ regulierende Faktor Nef (p27)** greift auf verschiedenste Weisen in unterschiedliche Funktionen der Wirtszelle ein und trägt somit zur Pathogenese der HIV Infektion bei. Nef nimmt Einfluss auf die Endozytose, die Signaltransduktion, sowie intrazelluläre vesikuläre Bewegungen (69-71). Dabei erleichtert es Nef durch gezielten lysosomalen Abbau der CD3- und CD4 Rezeptoren, sowie das Herunterregeln der MHC I Komplexe, der zellulären Immunantwort zu entkommen (72-74).

vpr-Gen

Das **Virale Protein R Vpr (p15)** wird durch Bindung an das Protein p6 beim Zusammenbau des Viruspartikels in das Virion aufgenommen (54). Vpr vermittelt den Transport des Prä-Integrations-Komplexes (PIC) zur Nukleusmembran, sowie den Import des PIC in den Nukleus von sich nicht-teilenden Zellen (75,76).

vpu-Gen

Das **Virale Protein U Vpu (p16, nur HIV-1)** verhilft den neu gebildeten Virionen bei der Freisetzung von der Zelloberfläche. Zum einen führt Vpu zur Degradierung neu produzierter CD4-Rezeptoren, die intrazellulär an das Protein gp160 binden könnten (77), zum anderen verhindert es die Retention neuer Viruspartikel an der Zelloberfläche durch Unterbinden des Kontaktes zum zellulären Oberflächenprotein Tetherin (78,79). Vpu reguliert zudem die Produktion von MHC I Proteinen herunter, um so die infizierte Zelle vor dem Immunsystem zu schützen (80).

vpx-Gen

Das **Virale Protein X Vpx (p15, nur HIV-2)** induziert den proteosomalen Abbau des HIV Restriktionsfaktors SAMHD1 (34).

vif-Gen

Der **Virale Infektivitätsfaktor Vif (p23)** spielt eine essentielle Rolle beim viralen Zusammenbau und der Partikelreifung, in dem es zum Abbau der zellulären Restriktionsfaktoren APOBEC-3F und APOBEC-3G beiträgt (81).

1.1.3.5 Replikationszyklus von HIV

Das HI-Virus infiziert eine Zelle über Rezeptor-vermittelte Fusion mit der Zellmembran. In einer ersten Annäherung an die Zelle durch Bindung des Oberflächenproteins gp120 an Heparansulfate, Glykosaminoglykane an der Zelloberfläche, heftet das Virion an der Zelle an (Abbildung 6, Schritt 1) (58,59). Dadurch kann sich das HIV-Partikel den zum Eintritt in die Zelle notwendigen Rezeptoren weiter annähern. HIV nutzt den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche von Makrophagen, T-Helferzellen, Dendritischen Zellen und Astrozyten als Hauptrezeptor (82).

Jedoch kann die Infektion nur durch die zusätzliche Interaktion mit weiteren Korezeptoren stattfinden (Abbildung 6, Schritt 2). Die Bindung an den CD4-Rezeptor führt zu Konformationsänderungen bei gp120, sowie bei CD4, was die zusätzliche Interaktion mit

Korezeptoren ermöglicht (83). Hierbei handelt es sich um die Chemokinrezeptoren CCR5 auf Makrophagen, sowie CXCR4, der sich unter anderem auf der Oberfläche von T-Zellen befindet. Viruspartikel, die den Korezeptor CCR5 benutzen, werden als R5-trope Viren bezeichnet, solche, die mit CXCR4 interagieren, als X4-trop (60,61). Betrachtet man den Tropismus der Viruspartikel im Verlauf einer HIV Infektion im Menschen, werden während der akuten Phase zu Beginn der Infektion hauptsächlich Makrophagen über R5-trope Virionen infiziert. Erst nach einigen Jahren mit Ausbildung der AIDS Erkrankung zeigt sich eine deutliche Erhöhung der X4-tropen Viren (Abbildung 7) (14).

Die Korezeptorbindung des Viruspartikels führt zu einer weiteren Konformationsänderung bei gp120 und infolgedessen beim Transmembranprotein gp41, wodurch es zu einer pH-unabhängigen Fusion von viraler und zellulärer Membran kommt (Abbildung 6, Schritt 3) (84). Das Viruskapsid wird ins Zytoplasma der Zelle freigesetzt und behält dabei seine Struktur bei (Abbildung 6, Schritt 4).

Die Abtrennung einiger Kapsid-Moleküle ermöglicht die Infiltrierung des entstehenden Reverse-Transkriptions-Komplexes durch Nukleotide. Die Reverse Transkriptase ist nun in der Lage das virale RNA Genom über ein RNA-DNA-Hybrid Intermediat in die virale Doppelsträngige DNA umzuschreiben. Mithilfe der RNase H Domäne wird die ursprüngliche RNA abgebaut (56). Der entstehende Druck im Inneren des konischen Kapsids führt zum Uncoating des Nukleoprotein-DNA-Komplexes (Abbildung 6, Schritt 5) (85). Da die Reverse Transkriptase nicht auf korrektes Umschreiben der RNA kontrollieren kann, kommt es mit einer Fehlerrate von 10^{-4} - 10^{-3} pro Base zu Mutationen in der neu entstandenen viralen DNA, was die hohe Mutationsrate bei Retroviren erklärt (86).

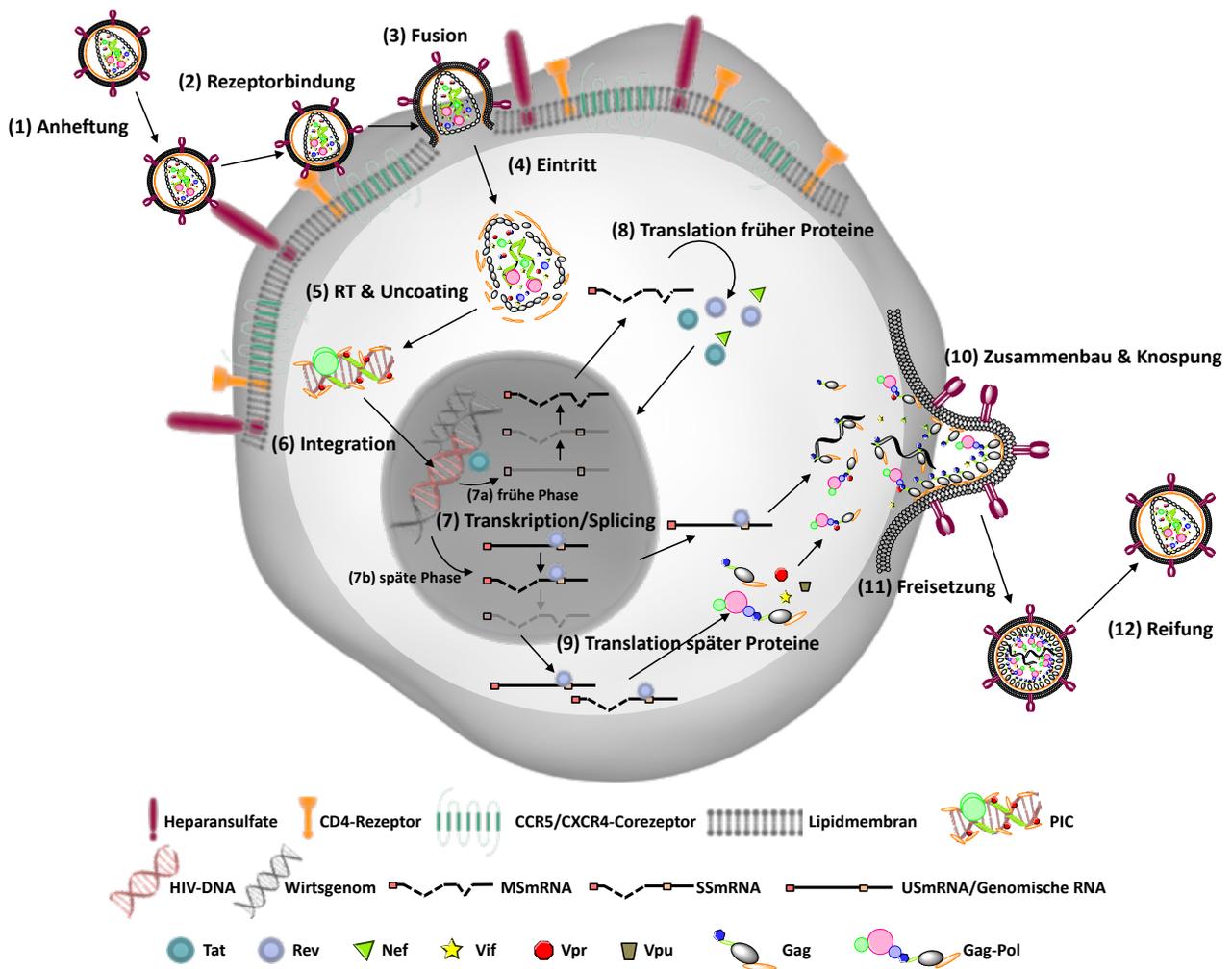


Abbildung 6. Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV: Das HIV Virion nähert sich zuerst über Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane an die Zelloberfläche der Zielzelle an (1. Anheftung), wodurch es in die direkte Umgebung der zur Infektion notwendigen Rezeptoren gelangt. HIV bindet über das Oberflächenprotein gp120 an den zellulären Rezeptor CD4 und einen der Korezeptoren CXCR4 oder CCR5 (2. Rezeptorbindung). Die Interaktion zwischen gp120 und CD4 führt zu einer Konformationsänderung von gp41, wodurch Virus- und Zellmembran miteinander fusionieren (3. Fusion). Beim Eintritt in die Zelle bleibt das Kapsid erhalten und es bildet sich der RT-Komplex (4. Eintritt). Das virale Genom wird nun im Inneren des Kapsids mithilfe der Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben, wodurch der entstehende Druck zur Auflösung des konischen Kapsids und somit zum Uncoating führt (5. RT und Uncoating). Die provirale DNA bildet zusammen mit der Integrase, Vpr und dem Matrix-Protein den Prä-Integrations-Komplex (PIC), wandert in den Nukleus und integriert dort in das Genom der Zielzelle (6. Integration). In der (7a.) frühen Phase der Transkription der proviralen DNA werden zuerst Vollängentranskripte produziert, die nach mehrfachem Splicing zur Translation dieser MSmRNA in die frühen viralen Proteine Tat, Rev und Nef (8. Translation früher Proteine) ins Zytoplasma gelangen. Die regulatorischen Proteine Tat und Rev werden zurück in den Zellkern transportiert, wo sie sowohl die Transkription stabilisieren und verstärken (Tat) als auch den Export von ungespleißten und einfach gespleißten Transkripten ins Zytoplasma vermitteln (Rev), (7b. Späte Phase der Expression). Infolgedessen kommt es nun auch zur Produktion später Proteine (9. Translation später Proteine), die sich an der Zellmembran anlagern und so die Knospung des Virions initiieren (10. Zusammenbau und Knospung). Direkt nach Austritt aus der Zelle liegen noch unreife Viruspartikel vor (11. Freisetzung), in denen sich die Protease selbst autokatalytisch und alle anderen Proteine aus den Gag und Gag-Pol Polyproteinen ausschneidet, um so die Reifung zu einem infektiösen Viruspartikel zu vollziehen (12. Reifung). Die Abbildung wurde mithilfe von <http://www.somersault1824.com> angefertigt.

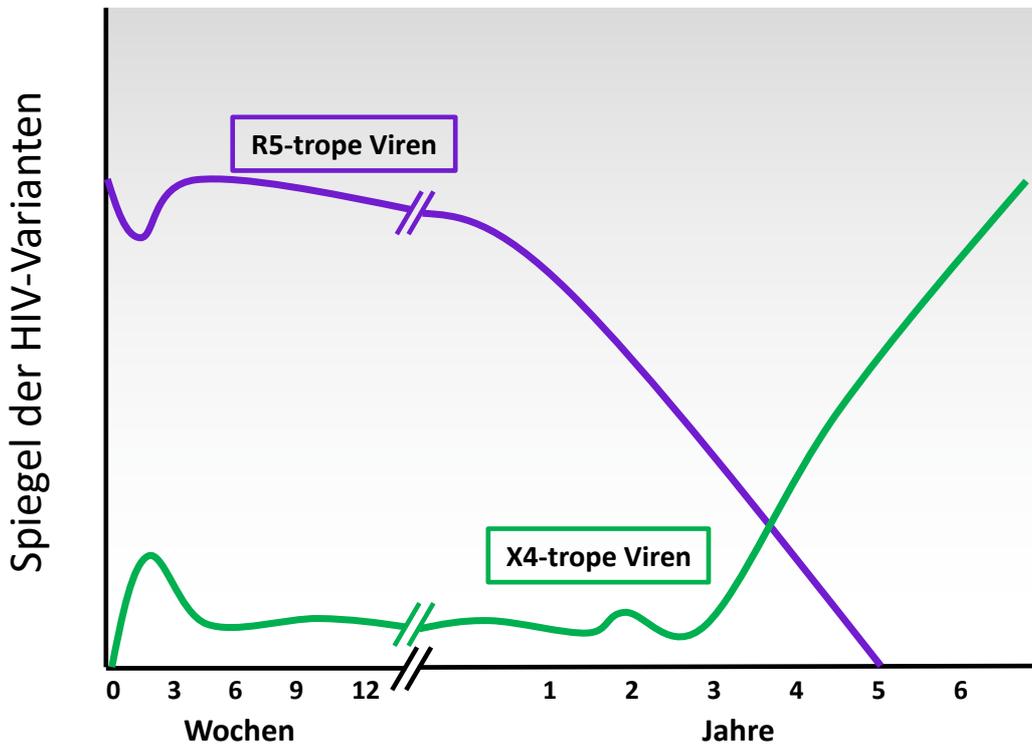


Abbildung 7. Schematische Verlauf der Viruskonzentrationen im Blut mit Bezug auf ihren Tropismus. Zu Beginn der Infektion während der akuten Phase und auch im Verlauf der ersten Jahre ist der Anteil R5-troper HIV Partikel im Blut des Patienten deutlich höher als der Teil X4-troper Viren. Mit Fortlaufen der Infektion sinkt der Anteil R5-troper Virionen immer stärker ab, während die Konzentration an T-Helferzellen infizierender X4-troper Virionen immer weiter zunimmt und mit dem Ausbruch der AIDS Erkrankung einhergeht. Das Schema entspricht einer adaptierten Form einer Abbildung aus (14).

Die nun frei gewordene virale DNA bildet zusammen mit der Integrase und den Proteinen Vpr und Matrix den Prä-Integrations-Komplex (PIC) (57), welcher Vpr/Matrix-Protein vermittelt durch die Kernporen in den Nukleus transportiert wird (75,76). Durch die Aktivität der Integrase wird die virale DNA an einer im Euchromatin zugänglichen Position als Provirus ins Wirtsgenom integriert (Abbildung 6, Schritt 6) (32). Je nachdem an welcher Stelle des Genoms die Integration stattfindet, kann dies zelluläre Gene zerstören oder aktivieren, es beeinflusst aber auch die spätere Transkription des Provirus. In inaktiven Bereichen des Wirtsgenoms kommt es nur selten zur Transkription und die Infektion geht in einen latenten Zustand über, in aktiven Bereichen kommt es durch zelluläre Faktoren zur Transkription des proviralen Genoms (Abbildung 6, Schritt 7a/b) (14). Allerdings wird das Provirus trotz der Anwesenheit von zellulären Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, Sp1 und TBP am LTR-Promotor nur sehr ineffektiv transkribiert, sodass die Transkription häufig nach nur wenigen 100 Basenpaaren abstoppt (62). Kommt es in dieser frühen Phase der Genexpression zur Produktion einer vollständigen prä-mRNA, wird diese nach mehrfachem Splicing zur Translation der frühen viralen Proteine Tat, Rev und Nef ins Zytoplasma transportiert (Abbildung 6, Schritt 7a und 8). Die beiden regulatorischen Proteine Tat und Rev wandern zurück in

den Zellkern, wo sie zum einen die Transkription verstärken (Tat) und zum anderen den Export ungespleißter und einfach gespleißter HIV mRNA Spezies aus dem Zellkern vermitteln (Rev) (Abbildung 6, Schritt 7b). Tat rekrutiert hierbei den zellulären positiven Transkriptions-Elongationsfaktor P-TEFb zum TAR Element (engl. „Trans-activation Response“), eine RNA Haarnadel-Struktur am 5'-Ende der neu entstehenden viralen mRNA, was zur Hyperphosphorylierung der RNA Polymerase II und somit einer rund 100-fachen Verstärkung der viralen Transkription führt (63-65). In der späten Phase der HIV Genexpression bindet Rev im Zellkern über ein Arg-reiches Motiv (ARM) an das RRE (engl. „Rev-responsive element“), eine Sekundärstruktur der viralen mRNA, die in ungespleißten und einfach gespleißten mRNA Spezies vorhanden ist, und vermittelt die Translokation dieser mRNAs über einen CRM1-abhängigen Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma (38,39).

Hierbei codieren die einfach gespleißten mRNAs für die Proteine Env, Vif, Vpr und Vpu, während die ungespleißten mRNAs die genetische Information für die Gag- und Gag-Pol-Polyproteine enthalten und vollständige Kopien der viralen RNA darstellen (32,87). Sowohl das Env-Vorläufer-Protein gp160, als auch Vpu werden an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert und im Anschluss über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Während dieses Transportprozesses wird gp160 von zellulären Proteasen in gp120 und gp41 gespalten (88,89). Vpu führt zur Degradierung neu produzierter CD4-Rezeptoren, die intrazellulär an die Env-Proteine binden könnten (77). Die Translation aller anderen Proteine findet an freien Ribosomen im Zytoplasma der Zelle statt (Abbildung 6, Schritt 9) (88).

Der N'-terminale Matrix-Anteil des Gag- bzw. Gag-Pol-Polyproteins wird myristoyliert und bindet über diesen Rest an die Zellmembran oder die Membran des ER (14). Die ungespleißten Transkripte, welche die gesamte virale RNA enthalten, binden über ein Ψ -Element spezifisch an die Nukleoprotein-Anteile des Gag- bzw. Gag-Pol-Polyproteins (44). Über diesen Vorgang des Zusammenbaus können sich neue virale Partikel von der Zellmembran oder in das ER-Lumen abschnüren. Neben den Gag- bzw. Gag-Pol-Polyproteinen und zwei Kopien der RNA werden auch die Proteine Vpr, Vif und Nef mit in das Virion eingebaut (Abbildung 6, Schritt 10) (32,46). Die neu gebildeten Viruspartikel werden vom zellulären Oberflächenproteinen wie Tetherin zurückgehalten. Die Bindung an Tetherin wird durch das virale Protein Vpu unterbunden, um so die vollständige Freisetzung des Virus von der Zelle gewährleisten zu können (Abbildung 6, Schritt 11) (78,79).

Innerhalb der noch unreifen Viruspartikel liegt nun aufgrund der entsprechenden Aminosäurezusammensetzung der Proteine ein leicht saures Milieu vor (pH 6-6,2), wodurch es der Protease nun möglich wird sich autokatalytisch aus dem Polyprotein herauszuschneiden und diese vollständig proteolytisch zu prozessieren. Dadurch können sich die einzelnen Proteine neu

anordnen und den reifen Viruspartikel mit seinem typischen konischen Kapsid ausbilden (Abbildung 6, Schritt 12) (32).

1.1.4 Behandlungsansätze zur Therapie von HIV Infektionen

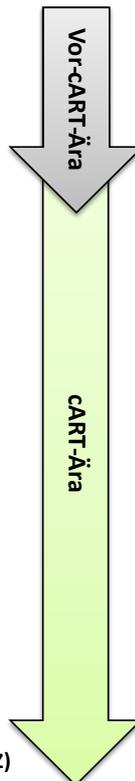
1.1.4.1 Antiretrovirale Kombinationstherapie

Infolge des verstärkten Auftretens von an AIDS erkrankten Patienten und der enormen Ausbreitung von HIV zu Beginn der 1980er Jahre (1), war es von oberster Priorität so schnell wie möglich wirksame anti-HIV Medikamente zu entwickeln. Nach der Entdeckung von HIV-1 durch Barré-Sinoussi und Montagnier 1983 (2) dauerte es bis ins Jahr 1987, bis das erste Medikament für die klinische Anwendung zur Bekämpfung der HIV Infektion zugelassen wurde (Abbildung 8) (90). Zidovudin (AZT), das erste Nukleosidanalogon, blockiert die Reverse Transkription des RNA-Genoms in die virale DNA effektiv. Jedoch führt ein Aussetzen der Behandlung zu einem direkten Rückfall (91). AZT unterdrückt die Infektion nur, es ist aber keine Heilung.

Antiretrovirale Medikamente

- 1987 – Zidovudin (AZT)
- 1991 – Didanosin (ddI)*
- 1992 – Zalcitabin (ddC)*
- 1994 – Stavudin (d4T)*
- 1995 – Lamivudin (3TC), Saquinavir (SQV)*

- 1996 – Indinavir (IDV)*, Nevirapin (NVP), Ritonavir (RTV)
- 1997 – Delaviridin (DLV)*, Nelfinavir (NFV)*
- 1998 – Abacavir (ABC), Efavirenz (EFV)
- 1999 – Amprenavir (APV)*
- 2000 – Lopinavir/Ritonavir (LPV/r)
- 2001 – Tenofovir Disoproxil Fumarat (TDF)
- 2003 – Atazanavir (ATV), Emtricitabin (FTC),
Enfuvirtid (T-20), Fosamprenavir (fAPV)*
- 2005 – Tipranavir (TPV)*
- 2006 – Darunavir (DRV)
- 2007 – Maraviroc (MVC)
- 2008 – Etravirin (ETR), Raltegravir (RAL)
- 2011 – Rilpivirin (RIL)
- 2012 – Elvitegravir/Cobicistat (EVG/COBI)
- 2013 – Dolutegravir (DTG)
- 2015 – Tenofovir Alfenamid (TAF)
- 2018 – Bictegravir (BIC), Doravirin (DOR), Ibalizumab (IBZ)



Vordosierte Zwei- und Dreifachkombinationen

- 1997 – AZT/3TC

- 2000 – AZT/3TC/ABC
- 2002 – d4T/3TC*, d4T/3TC/NVP*

- 2004 – ABC/3TC, TDF/3TC, TDF/FTC
- 2005 – AZT/3TC/NVP
- 2006 – TDF/FTC/EFV₆₀₀
- 2011 – TDF/FTC/RIL
- 2012 – TDF/FTC/EVG/COBI
- 2014 – ABC/3TC/DTG
- 2015 – RAL/3TC, TAF/FTC/EVG/COBI
- 2016 – TAF/FTC, TAF/FTC/RIL
- 2017 – DTG/RIL, TDF/3TC/DTG, TDF/3TC/EFV₄₀₀
- 2018 – TAF/FTC/DRV/COBI, TAF/FTC/BIC, TDF/3TC/DOR

Abbildung 8. Übersicht aller zugelassener anti-HIV Einzelmedikamente und fest vordosierter Kombinationen von 1987-2018. *Wirkstoffe oder Kombinationen, die vom Markt genommen wurden oder nicht mehr für den Einsatz in der antiretroviralen Kombinationstherapie (cART) empfohlen werden. Informationen aus Vitoria *et al.* 2019 (92).

Bis heute wurden 32 weitere anti-HIV Wirkstoffe zugelassen (nur 23 von 33 finden noch klinische Anwendung), die in insgesamt sieben Klassen eingeteilt werden (Abbildung 9) (92):

Bindungsinhibitoren: Maraviroc (MVC), ein CCR5-Antagonist, sowie Ibalizumab (IBZ), ein anti-CD4 monoklonaler Antikörper.

Fusionsinhibitoren: Enfuvirtid (T-20)

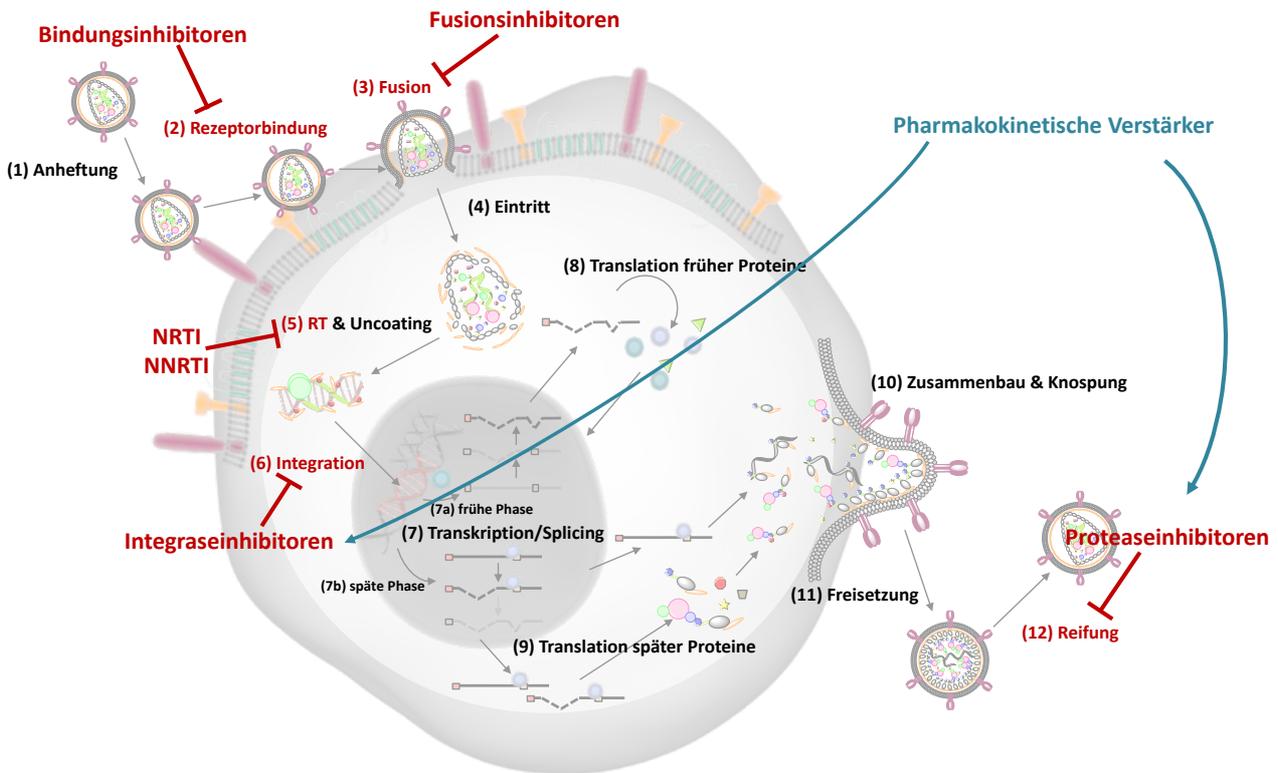


Abbildung 9. Angriffspunkte der antiretroviralen Therapie im Replikationszyklus von HIV. Angegeben sind die momentan verfügbaren Wirkstoffklassen mit ihren Angriffspunkten im HIV Replikationszyklus. Nachfolgend werden die zugelassenen Einzelwirkstoffe aufgelistet, die Teil der Kombinationstherapie sein können. Unterstrichen sind alle Wirkstoffe, die in dieser Dissertation als Vergleichssubstanzen herangezogen wurden. *Bindungsinhibitoren:* Maraviroc, Ibalizumab; *Fusionsinhibitoren:* Enfuvirtid; *NRTI (Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren):* Abacavir, Didanosin*, Emtricitabin, Lamivudin, Stavudin*, Tenofovir-Alafenamid, Tenofovir-Disoproxil-Fumarat, Zalcitabin*, Zidovudin; *NNRTI (Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren):* Delavirdin*, Doravirin, Efavirenz, Etravirin, Nevirapin, Rilpivirin; *Integraseinhibitoren:* Bictegravir, Dolutegravir, Elvitegravir, Raltegravir; *Proteaseinhibitoren:* Amprenavir*, Atazanavir, Darunavir, Fosamprenavir*, Indinavir*, Lopinavir/Ritonavir, Nelfinavir*, Ritonavir, Saquinavir*, Tipranavir*; *Pharmakokinetische Verstärker:* Cobicistat. Rote „T“-Zeichen zeigen an, welcher Schritt des Replikationszyklus inhibiert wird. Blaue Pfeile geben an, welche Inhibitorgruppe von pharmakokinetischen Verstärkern unterstützt werden. *Vom Markt genommene oder nicht mehr empfohlene Medikamente.

Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI): AZT, Abacavir (ABC), Didanosin (ddI), Emtricitabin (FTC), Lamivudin (3TC), Stavudin (d4T), Tenofovir-Alafenamid (TAF), Tenofovir-Disoproxil-Fumarat (TDF) und Zalcitabin (ddC). Wobei ddI, ddC und d4T nicht mehr zur Anwendung kommen. Nukleosidanaloga blockieren die Reverse Transkription der viralen RNA in DNA durch Herbeiführen eines Kettenabbruchs während der Polymerisation.

Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI): Delavirdin (DLV), Doravirin (DOR), Efavirenz (EFV), Etravirin (ETR), Nevirapin (NVP) und Rilpivirin (RIL). Wobei DLV nicht mehr zur Anwendung kommt. NNRTI inhibieren die Reverse Transkriptase durch allosterische Hemmung der Enzymaktivität.

Integraseinhibitoren: Bictegravir (BIC), Dolutegravir (DTG), Elvitegravir (EVG) und Raltegravir (RAL). Alle bisher auf dem Markt befindlichen Integraseinhibitoren wirken nach dem gleichen Wirkmechanismus als sogenannte Strangtransfer-Inhibitoren (INSTIs).

Proteaseinhibitoren: Amprenavir (APV), Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV), Fosamprenavir (fAPV), Indinavir (IDV), Lopinavir/Ritonavir (LPV/r), Nelfinavir (NFV), Ritonavir (RTV), Saquinavir (SQV), Tipranavir (TPV). Wobei APV, fAPV, IDV, NFV, SQV und TPV nicht mehr zur Anwendung kommen.

Pharmakokinetische Verstärker: Cobicistat (COBI). Hierbei handelt es sich nicht direkt um einen anti-HIV Wirkstoff, da dieser nur in Kombination zur Verstärkung anderer Wirkstoffe eingesetzt wird.

Aufgrund schnellen Therapieversagens bei Monotherapie wird seit 1996 die antiretrovirale Kombinationstherapie (cART) angewandt (93), bei der eine Kombination aus drei anti-HIV Wirkstoffen zur Bekämpfung der HIV Infektion zum Einsatz kommen. Die Basis einer solchen Kombination bilden jeweils zwei NRTI, welche zusammen mit einem NNRTI, einem Integrase- oder Proteaseinhibitor eingesetzt werden (92). In manchen Fällen soll die Wirkung mit geringen Dosen von Ritonavir oder Cobicistat gesteigert werden (92). Zu Beginn bestand die „First-Line“ cART-Kombination aus AZT, 3TC und NVP. Diese wurde jedoch von TDF/3TC/EFV abgelöst. Mit der Zulassung des sehr gut verträglichen und hochwirksamen Integraseinhibitors DTG im Jahr 2013 durch die FDA (Food and Drug Administration, USA) wurde EFV durch DTG als „First-Line“ Wirkstoff ausgetauscht (92).

Trotz der enormen Wirksamkeit und der deutlich geringeren Nebenwirkungen der cART und der damit einhergehenden Verbesserung der Lebensqualität der unter Therapie stehenden HIV Patienten, führt die Behandlung nicht zu einer Heilung, weswegen eine lebenslange Therapie unabdingbar ist. Daher gilt es auch in Zukunft weiter an neuen anti-HIV Wirkstoffen zu forschen. Hierbei soll ein besonderes Augenmerk darauf liegen, dass die Therapie für alle Menschen bezahlbar wird und die Anwendung weniger Nebenwirkungen mit sich bringt und vereinfacht wird, um vor allem das Therapieversagen durch zu geringe Therapietreue der Patienten zu verhindern (92). Seit Beginn der cART-Ära hat sich die Menge der Pillen pro Tag und pro Zeitpunkt deutlich verringert, nun stehen vor allem lang-wirksame Wirkstoffe im Fokus, die möglicherweise nur einmal in der Woche oder sogar im Monat verabreicht werden müssen (94). Zudem gibt es laufende Studien für den Einsatz einer Zweifachkombination aus 3TC und DTG anstelle der üblichen cART Dreifach-Zusammensetzung (95,96).

Eine Kombination der beiden NRTI Emtricitabin und Tenofovir (Truvada) kann von HIV-negativen Personen als Safer-Sex-Methode, als sogenannte Prä-Expositions-Prophylaxe (PrEP) angewandt werden. Bei richtiger Anwendung, das heißt einmal täglich, bei Männern zwei Tage, bei Frauen sieben Tage vor einem potentiellen Risikokontakt und im Anschluss an den sexuellen Kontakt für mindestens die gleiche Zeitdauer, vermindert die PrEP das Risiko für eine HIV Infektion um bis zu 92 % (97). Damit schützt eine PrEP so gut wie der Einsatz von Kondomen oder die HIV-Therapie gegen eine HIV Infektion, jedoch nicht gegen andere sexuell übertragbare Erkrankungen. Die PrEP wurde 2012 von der FDA zugelassen, wird seit 2014 von der WHO als Safer-Sex-Methode geführt und ist auch in der Europäischen Union seit 2016 verfügbar (98).

Zur Vermeidung einer HIV Infektion nach einer möglichen Exposition mit HIV, gibt es die Möglichkeit einer Post-Expositions-Prophylaxe (PEP). Schon eine Kontrollstudie mit Angestellten aus dem Gesundheitswesen aus dem Jahr 1997 zeigte, dass eine Behandlung mit Zidovudin als PEP nach potentielltem Kontakt mit HIV eine protektive Wirkung aufweist (99). Heutzutage werden zur PEP üblicherweise Kombinationen aus mindestens drei Medikamenten eingesetzt. Emtricitabin und Tenofovir bilden hier die Basis der Therapie, während Dolutegravir, Raltegravir oder Darunavir als dritter Wirkstoff eingesetzt werden (100). Da die PEP im Vergleich zur PrEP erst nach einem Risikokontakt eingenommen wird, ist die Verabreichung in höheren Dosierungen notwendig. Die PEP bietet nur einen effektiven Schutz, wenn sie bis spätestens 72 h nach dem sexuellen Kontakt und im Anschluss 1-2x täglich für 28 Tage eingenommen wird (101).

1.1.4.2 Resistenzentwicklung bei der antiretroviralen Therapie

Aufgrund des nicht vorhandenen Heilmittels sind HIV Infizierte gezwungen die cART Behandlung ein Leben lang fortzusetzen, um ein Fortschreiten der Erkrankung so lange wie möglich hinauszögern zu können. Solch eine Dauerbehandlung der Infektion birgt das Risiko zur Entwicklung durch Mutationen resistenter Viren (93).

Hierbei gibt es mehrere Mechanismen, die für das Auftreten resistenter Virusstämme verantwortlich sein können. Die Reverse Transkriptase besitzt kein Kontrollsystem zur Fehlererkennung beim Umschreiben der RNA, was mit einer Fehlerrate von 10^{-4} - 10^{-3} pro Base zu Mutationen in der proviralen DNA führt (86,102). Im Falle der Superinfektion einer Zelle mit verschiedenen Virusvarianten kann es zu einer Rekombination der unterschiedlichen Virusgenome kommen (103). Zudem bilden sich, obwohl die ursprüngliche Infektion durch nur eine Variante von HIV ausgelöst wird, innerhalb weniger Wochen unzählige sogenannte Quasispezies aus, wodurch es zur Akkumulation von vielen proviralen Varianten des Virus kommen kann. Resistente Viren können sich nur etablieren, solange auch ein gewisser Selektionsdruck vorliegt. Da eine solche Mutation häufig die Fitness des Virus beeinträchtigt, würde sich ohne Selektionsdruck daher eher das Wildtyp-Virus gegenüber der Resistenzmutante durchsetzen (104-106).

Durch die „90-90-90“ und „Treat all“ (engl. „Behandelt alle“) Offensiven von WHO und UNAIDS bekommen immer mehr Leute auf der ganzen Welt Zugang zur cART. Jedoch ist es sehr häufig aufgrund von hohen Kosten, Aufwand oder auch hoher Temperaturen nicht möglich überall die gleichen Standards für eine geregelte und gleichwertige medizinische Versorgung einzuführen und auch aufrecht zu erhalten. Um Therapieversagen durch Resistenzmutationen vorbeugen zu können, wird in einkommensstarken Ländern standardmäßig nach Erhalt der Erstdiagnose zum Einstellen der richtigen Medikamentenkombination, aber auch bei wiederkehrenden Kontrollen oder Therapieversagen immer wieder auf Resistenzen getestet (107).

Es gibt zwei Möglichkeiten mit denen untersucht werden kann, ob Patienten mit Viren infiziert sind, die gegen verschiedene Medikamente Resistenzen aufweisen. Zum einen gibt es den phänotypischen Ansatz, bei dem zu untersuchende Virusisolate mit einem Standard-Wildtyp-Virus in *in vitro* Zellkulturmodellen mit entsprechenden Wirkstoffen behandelt und anschließend anhand ihrer Konzentrationen, die zu einer Inhibition von 50 % (IC_{50} -Werte) führen, vergleichend dargestellt werden (108,109). Zum anderen gibt es den genotypischen Ansatz, bei dem mittels Sanger oder Next Generation Sequenzierung das virale Genom sequenziert und anschließend mithilfe phylogenetischer Analysen untersucht wird. Aufgrund des Zeit- und Kostenaufwandes bleibt der phänotypische Ansatz, wie auch in dieser Dissertation zu sehen (s. 4.5.2), eher der Wirkstoffentwicklung vorbehalten und wird in der Klinik nicht angewandt (107). In einkommensschwachen Ländern fehlt hierfür häufig die Infrastruktur, um solche Testverfahren

durchführen zu können. Jedoch zeigen Rechenmodelle verschiedener Studien, dass die Einführung solcher genotypischen Resistenztests kostenneutral für das Gesundheitssystem sein könnte. Zumeist wird die Medikamentierung bei Therapieversagen der zuerst eingesetzten *1st line* Wirkstoffkombinationen sofort auf *2nd line* Medikamente umgestellt, wodurch allerdings gleichzeitig auch die Kosten ansteigen (110,111). Jedoch können nur rund 80 % des Therapieversagens auf erworbene Resistenzen zurückgeführt werden. In den meisten anderen Fällen liegt das Versagen der cART an der unzureichenden Therapietreue der Patienten, bei denen daher die Therapie nicht sofort auf die teureren Medikamente umgestellt werden müsste (110,111).

Die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine gegen bestimmte Medikamente resistente Virusmutante während der Infektion etabliert, variiert stark zwischen den einzelnen Wirkstoffen, aber auch innerhalb der einzelnen Wirkstoffklassen. Abbildung 10 verdeutlicht dies durch den Vergleich der antiviralen Potenz der in der Klinik eingesetzten Medikamente mit ihrer jeweiligen genetischen Resistenzbarriere. Je höher diese Resistenzbarriere desto mehr notwendige Mutationen müssen für die Ausbildung einer Resistenz vorliegen, damit es phänotypisch überhaupt zu einer Resistenz gegen einen bestimmten Wirkstoff kommt (107).

Bei der Gruppe der NRTI ist die genetische Resistenzbarriere besonders niedrig, da bei diesen Wirkstoffen nur ein bis zwei Mutationen an der richtigen Stelle ausreichen, damit entsprechend resistente Viren auftreten (Abbildung 10). Die Resistenz kann durch zwei Mechanismen begünstigt werden. Entweder wird es der Reversen Transkriptase durch die Mutationen möglich zwischen den dideoxy-NRTI und den zellulären dNTPs zu unterscheiden oder diese werden schneller aus der viralen DNA entfernt, wodurch der Kettenabbruch verhindert wird (112). Die häufigste Mutation ist die M184V/I Mutation, die zu einer sehr starken Resistenz (200fache Abschwächung) gegen 3TC und FTC führt (113,114). Jedoch werden diese beiden Wirkstoffe zumeist nicht aus der Therapie entfernt, da die entsprechende Virusmutante eine sehr geringe Fitness besitzt und deutlich empfindlicher auf AZT und TDF reagiert (109).

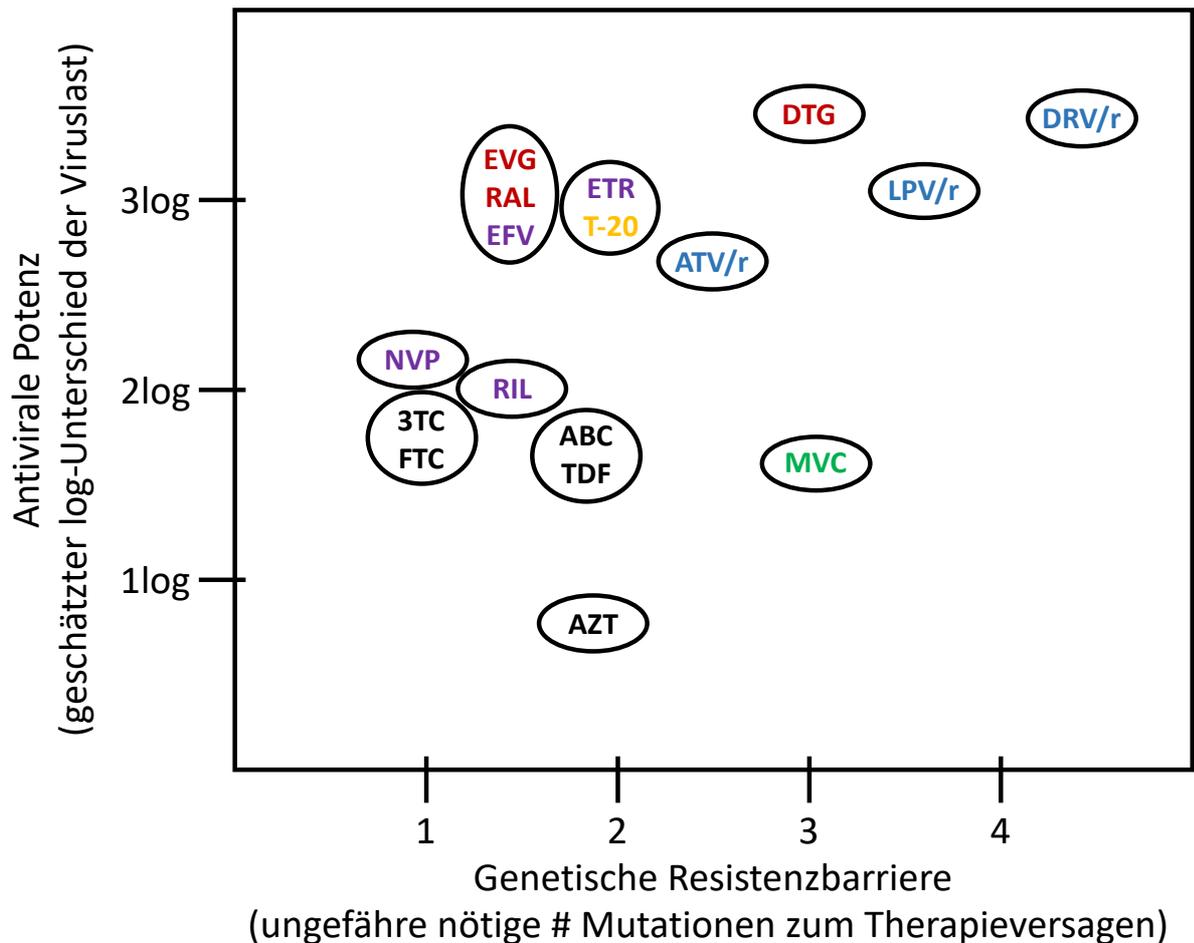


Abbildung 10. Antiretrovirale Potenz und genetische Resistenzbarriere eines HIV-Medikamentes. Bindungsinhibitor (grün): Maraviroc (MVC); Fusionsinhibitor (gelb): Enfuvirtid (T-20); NRTI (schwarz): Abacavir (ABC), Emtricitabin (FTC), Lamivudin (3TC), Tenofovir (TDF), Zidovudin (AZT); NNRTI (lila): Efavirenz (EFV), Etravirin (ETR), Nevirapin (NVP), Rilpivirin (RIL); Integraseinhibitoren (rot): Dolutegravir (DTG), Elvitegravir (EVG), Raltegravir (RAL); Proteaseinhibitoren (blau): Atazanavir (ATV), Lopinavir (LPV), Darunavir (DRV), mit Ritonavir verstärkt (/r). Wirkstoffe innerhalb einer Ellipse haben ungefähr die gleiche antivirale Potenz, sowie genetische Resistenzbarriere. Bei dieser Abbildung handelt es sich um eine adaptierte Version der Abbildung 1 aus (107).

Auch die NNRTI haben eine niedrige genetische Resistenzbarriere (Abbildung 10). Diese Wirkstoffe zeichnen sich durch ein sehr hohes Level an Kreuzresistenzen aus (115). Das bedeutet, dass eine Mutation zu einer Resistenz gegen gleich mehrere Medikamente dieser Wirkstoffklasse führen kann. Kreuzmutationen gibt es nur innerhalb einer Wirkstoffklasse, jedoch nicht zwischen unterschiedlichen Wirkstoffklassen. Das Wissen über Kreuzmutationen ist vor allem wichtig, um nach möglichem Therapieversagen die Medikamentenkombination neu einstellen zu können (109,112,115,116). Wegen seiner höheren Resistenzbarriere wird ETR erst als *2nd line* Wirkstoff verwendet, falls schon Resistenzen gegen die anderen NNRTI vorliegen sollten (117).

Proteaseinhibitoren zeigen in ihrer durch Ritonavir verstärkten Anwendung eine deutlich höhere genetische Resistenzbarriere als ohne RTV Verstärkung und kommen daher vor allem bei Therapieversagen zum Einsatz (118-120). Verschiedene Studien zeigen, dass Patienten mit

Proteaseinhibitoren in ihrer *1st line* cART deutlich seltener Resistenzmutationen gegen die Therapie entwickeln als Kombinationen ohne Proteaseinhibitor. Daher wird hier das Therapieversagen vor allem mit geringer Therapietreue der Patienten erklärt, was unter anderem an den stärkeren Nebenwirkungen von Proteaseinhibitoren liegt (121,122).

Abbildung 10 zeigt für die Integraseinhibitoren ein diverses Bild, während RAL und EVG eine relativ niedrige Resistenzbarriere und hohe Kreuzmutationen aufweisen, ist DTG deutlich robuster gegenüber einer Resistenzentwicklung (123,124).

Der CCR5-Antagonist MVC zeichnet sich durch eine hohe genetische Resistenzbarriere aus, jedoch ist hier das größte Problem, dass dieser nur gegen R5-trope Viren wirken kann und auf X4-trope Viren keinerlei Effekt zeigt. Rund 80 % der Primärinfektionen werden von R5-tropen Viren ausgelöst, jedoch kann sich der Tropismus im Verlauf der Infektion verändern (s. Abbildung 7 in 1.1.3.5), weshalb vor allem bei der Einstellung der Therapie kontrolliert werden muss, ob sich eine Behandlung mit MVC überhaupt lohnt (125,126).

Ein weiteres Problem, dass durch das zunehmende Vorkommen resistenter Viren auftritt, ist die höhere Wahrscheinlichkeit für Primärinfektionen durch bereits resistente HIV Varianten. Besonders in den einkommensstarken Ländern, die schon lange Zugang zur cART haben, kommt es gehäuft zu solchen Fällen. Dies betrifft rund 10 % der Neuinfektionen in Europa und sogar 12-24 % der Primärinfektionen in den USA. Jedoch gibt es auch Fälle in einkommensschwachen Regionen der Welt, wo die Rate noch unter 5 % liegt (127-129).

1.1.4.3 Therapieansätze der Zukunft

Der Hauptgrund weshalb es noch immer keine Heilung für eine HIV Infektion gibt, ist die Fähigkeit des Virus sich ins Wirtsgenom zu integrieren, in einen Zustand andauernder Latenz überzugehen und in sogenannten Reservoirs zu überdauern bis es reaktiviert wird (130). Neben CD4⁺ T-Lymphozyten kann HIV auch Makrophagen und Monozyten (131), sowie Dendritischen Zellen (132) und Astrozyten (133,134) latent infizieren.

Mittels cART ist es zwar möglich die Viruslast im Blut des Patienten unterhalb des Detektionslimits zu senken, jedoch kommt es zu einem direkten Wiederanstieg der Viruslast, sobald die Therapie ausgesetzt wird, da die langlebigen HIV-Reservoirs von den heutigen Medikamenten unangetastet bleiben (91). Solange es keine Möglichkeit gibt diese Reservoirs komplett aus dem Körper zu entfernen, wird es keine Chance auf eine Heilung der HIV Infektion geben (135). In den letzten Jahren haben sich jedoch einige mögliche Herangehensweisen heraus kristallisiert, mit denen es womöglich zu schaffen sein könnte, HIV in seinen Reservoirs auszumerzen. Nachfolgend sind diese Therapiemodelle kurz vorgestellt (Abbildung 11):

„shock & kill“

Bei diesem Ansatz sollen alle latenten Proviren mittels LRAs (engl. „Latency reversing agents“) absichtlich reaktiviert werden („shock“). Durch zusätzlichen Einsatz einer starken cART soll während dieses angeregten Zustandes verhindert werden, dass es zur *de novo* Infektion nicht infizierter Zellen kommt. Es wird davon ausgegangen, dass es so möglich wäre, dass alle Reservoirs enthaltende und reaktivierte Zellen entweder durch das Immunsystem oder durch zytopathische Effekte der Infektion zerstört werden („kill“). In ersten Patientenstudien dieses Ansatzes war es leider nicht möglich die Reservoirs dauerhaft zu eliminieren (136).

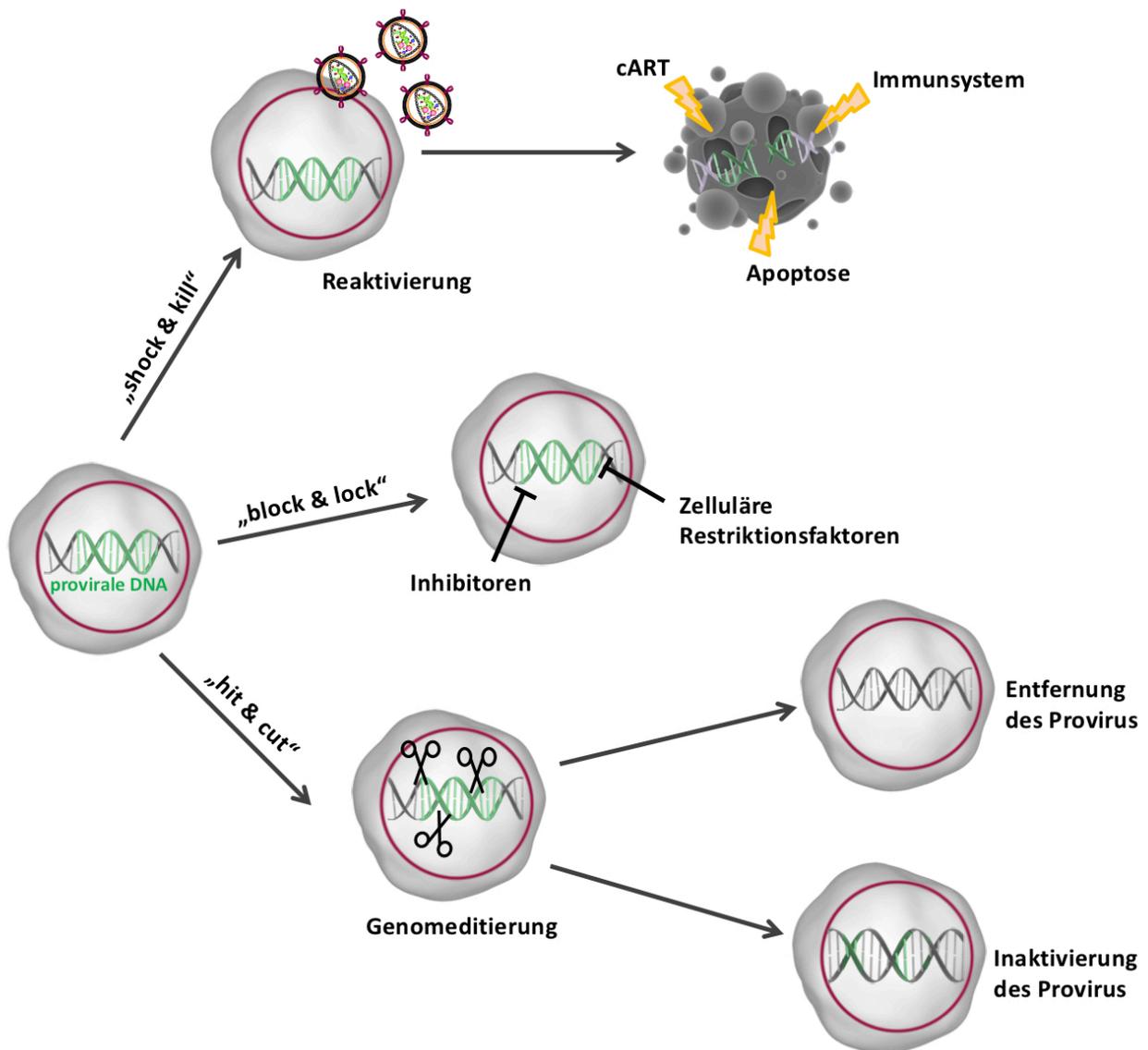


Abbildung 11. Ansätze zur Bekämpfung von latenten HIV-Reservoirs (137).

„block & lock“

Das „block & lock“ Modell geht davon aus, dass es nicht möglich sein wird, alle latenten Proviren aus den Reservoirs im Körper zu entfernen. Daher soll die Reaktivierung des Provirus durch neue Inhibitoren und zelluläre Restriktionsfaktoren, die in die Expression des proviralen Genoms eingreifen, blockiert werden („block“), um so HIV in seinen Reservoirs einzusperren („lock“). Ob es möglich ist, solch eine Methode in die Praxis zu übertragen, konnte bisher noch nicht bewiesen werden (136).

„hit & cut“

Ein weiteres Therapiemodell schlägt vor, die latenten Proviren mithilfe neuer molekularbiologischer Tools, auch molekulare Scheren genannt, wie CRISPR/Cas9, Zinkfingernukleasen oder TALENs gezielt in den Reservoirzellen zu inaktivieren oder gar komplett zu entfernen. Hierbei soll das Schneidewerkzeug über virale Vektoren zielgerichtet in die Reservoirzellen transportiert werden, wodurch dort das provirale HIV Genom spezifisch anvisiert werden kann („hit“), um dieses dann entweder durch gezieltes Entfernen für die Expression wichtiger Elemente still zu legen, bzw. vollständig aus dem Genom herauszuschneiden („cut“) (138).

Der chinesische Wissenschaftler He Jiankui nutzte die CRISPR/Cas9 Technik im Jahr 2018 auch im Kontext mit HIV. Hierbei versuchte er nicht wie im soeben beschriebenen „hit & cut“ Modell eine bereits bestehende HIV Infektion zu bekämpfen, er verwendete CRISPR/Cas9, schon im Keimzellstadium, um eine Mutation im CCR5-Rezeptor-Gen in der befruchteten Eizelle zu implementieren, mit dem Ziel gegen HIV resistente Zellen zu erschaffen. Laut Angaben von He Jiankui, wurden im Herbst 2018 CRISPR/Cas9 behandelte Zwillinge geboren. Jedoch scheinen die Babies die gewünschte Mutation im CCR5-Gen nicht zu tragen. Das Vorgehen wurde sehr kontrovers diskutiert. Da bis heute noch kein wissenschaftlicher Report zu dieser Arbeit veröffentlicht wurde, besteht keine Möglichkeit diesen Vorgang nachvollziehen zu können (139). Sowohl bei der Anwendung solcher Tools zur Zerstörung des proviralen Genoms, als auch in anderen Bereichen, ist es von höchster Priorität, unspezifisches Schneiden in der nicht-HIV-DNA zu vermeiden, um keinen weiteren Schaden in der Zielzelle zu verursachen. Daher müssen diese Techniken bis zu ihrem Einsatz im Patienten genauestens evaluiert und ausgereift werden und sollten nicht vorschnell in Experimenten am Patienten, wie im Fall der CRISPR-Babies, eingesetzt werden (140).

1.2 Entwicklung von neuen Wirkstoffen

Seit Jahrtausenden strebt der Mensch danach Antworten auf all die Leiden und Krankheiten zu finden, die ihm widerfahren (141). Die Suche nach Heilmitteln und Wirkstoffen war im Laufe der Zeit einem starken Wandel unterworfen. Während die Forschung anfänglich noch allein darauf aus war, herauszufinden, womit man einer Erkrankung Herr werden kann, reicht dies in der heutigen Zeit nicht mehr aus. Heute liegt der Fokus verstärkt in der Aufklärung und dem genauen Verstehen der Wirkmechanismen neuer Wirkstoffe, noch bevor diese beim Patienten zum Einsatz kommen (142). Zudem sollen Nebenwirkungen auf ein Geringstes minimiert werden, damit Patienten nicht wegen daraus resultierender fehlender Therapietreue ihre Behandlung unzureichend fortführen. Auch im Verlauf dieser Dissertation wurde diesen grundlegenden Fragen der Wirkstoffforschung nachgegangen, weswegen die nachfolgenden Abschnitte einen einleitenden Überblick über verschiedenste Strategien und Herangehensweisen bei der Suche nach neuen Wirkstoffen geben sollen.

1.2.1 Ansätze und Herausforderungen in der Wirkstoffentwicklung

Bei der Entwicklung eines Wirkstoffes gibt es auf dem Weg von der ursprünglichen Idee bis hin zur Behandlung eines Patienten einige Hürden zu meistern und Entscheidungen zu treffen (Abbildung 12). Zu Anfang steht die Frage nach der Indikation des zu suchenden Wirkstoffes. In der vorliegenden Dissertation steht hierbei die Bekämpfung der HIV Infektion im Vordergrund. In den meisten Fällen werden heutzutage große Substanzbibliotheken bemüht, bei denen mittels Hochdurchsatz-Screening nach ersten möglichen Treffern oder „Hits“ gesucht wird. An diesem Punkt stellen sich entscheidende Fragen nach der Art des Screenings und des Testsystems. Soll beispielsweise die Aktivität eines ganz bestimmten Enzyms reguliert werden, das im Zentrum des Wirkstoffmechanismus stehen soll, ist das System schon auf dieses eine Enzym optimiert („Target-based Drug Discovery“) (143). Im Falle von HIV könnte zum Beispiel mit einfachen biochemischen Assays die Wirkung der zu testenden Substanzen auf die virale Reverse Transkriptase, Integrase oder Protease bestimmt werden (s. 3.4.1, 3.4.2 oder 3.4.3). Eine andere Herangehensweise besteht im Durchführen eines phänotypischen Screenings, bei dem der Fokus weniger auf der Aktivität einer Substanz gegen ein ausgewähltes Biomolekül, sondern viel mehr auf der allgemeinen Wirkung auf ein ganzheitliches, physiologisch relevantes System liegt, wie beispielsweise einem entsprechenden Tier- oder Zellkulturmodell („Phenotypic Drug Discovery“) (143). Der Ursprung dieser Arbeit liegt in einem solchen phänotypischen Screening, bei dem die antivirale Wirkung von über 10.000 Substanzen einer Naturstoffbibliothek in einem zellulären HIV-Replikationssystem, dem EASY-HIT System (144), untersucht wurde. Dieser Ansatz gibt eine direkte

Aussage darüber, ob ein möglicher Hit auch in ein ganzheitliches HIV-Replikationssystem eingreifen kann und nicht nur bei direktem Kontakt zum ausgewählten Zielmolekül seine Wirkung entfaltet. In der heutigen Zeit steht der molekulare, Zielmolekül-basierte Ansatz verstärkt im Fokus (143,145). Jedoch zeigt sich in Anbetracht der angewandten Ansätze, die allen Wirkstoffen zugrunde liegen, welche zwischen 1999-2008 von der FDA zugelassen wurden, dass eine phänotypische Herangehensweise gerade im Bereich der „First-in-class“ Medikamente, die einen völlig neuen Mechanismus aufweisen, viel häufiger zum Erfolg führt. Im angegebenen Zeitraum wurden insgesamt 259 Wirkstoffe zugelassen, wovon 75 in die „First-in-class“ Kategorie fallen. Hiervon basierten 37 % auf einem phänotypischen Ansatz, nur 23 % auf der Zielmolekül-basierten Methode. Die übrigen Anteile verteilen sich auf „Biologics“ (33 %) und modifizierte Naturstoffe (7 %). Das Hauptargument für die in dieser Phase der Entwicklung verstärkte Nutzung des phänotypischen Ansatzes liegt in der unvoreingenommenen Herangehensweise bei der Identifikation des Wirkmechanismus (142,145). Bei Nachfolger-Wirkstoffen hingegen, also „Second-in-class“ Wirkstoffen mit gleichem Wirkmechanismus, verändert sich dieses Bild deutlich, während ein phänotypisches Screening als Basis der Wirkstoffidentifikation nur noch 18 % der zugelassenen Medikamente zugrunde liegt, bilden Wirkstoffe aus Zielmolekül-basierten Screenings den Hauptanteil von 51 % (142,145). Beispiele für Medikamente, die einem phänotypischen Screening entsprungen sind der HDAC-Inhibitor Vorinostat oder das Antibiotikum Linezolid. Während besonders HIV Medikamente wie der CCR5-Inhibitor Maraviroc oder der Integrase-Inhibitor Raltegravir aus Zielmolekül-basierten Screenings hervorgingen (143,145).

Dem phänotypischen Ansatz stellt sich jedoch die Aufgabe, im Laufe der Entwicklung eines neuen Wirkstoffes auch dessen genauen Wirkmechanismus aufzuklären oder gar ein gesondertes Zielmolekül angeben zu können, da ansonsten die mögliche Akzeptanz und Einführung eines solchen Wirkstoffes auf den Markt sehr unwahrscheinlich zu werden droht. In der Entwicklung neuer Medikamente besitzt das genaue Verständnis des Wirkstoffes oberste Priorität, während für den letztendlichen Einsatz im Patienten nur zählt, dass die Therapie einfach anwendbar, höchst effektiv und mit geringst möglichen Nebenwirkungen abläuft (145). Eine Gratwanderung, die es zu bewältigen gilt.

Nach Auswahl und Durchführung des bevorzugten Screeningansatzes resultiert das Hochdurchsatz-Screening im optimalen Falle in einem oder mehreren Treffern, die nun auf verschiedene Parameter analysiert und optimiert werden müssen, um am Ende aus einem solchen Hit auch eine Leitsubstanz oder „Lead“ entstehen zu lassen (Abbildung 12). Hierbei stehen vor allem Eigenschaften wie Effektivität, Toxizität und Stabilität der Substanz im Vordergrund. Um diese Parameter genauer untersuchen zu können, wird zumeist eine ganze Reihe zur Ausgangssubstanz

chemisch unterschiedlicher Derivate synthetisiert und diese mittels Struktur-Wirkungsbeziehung-Studien (SAR, vom englischen „structure activity relationship“) genauer analysiert (146).

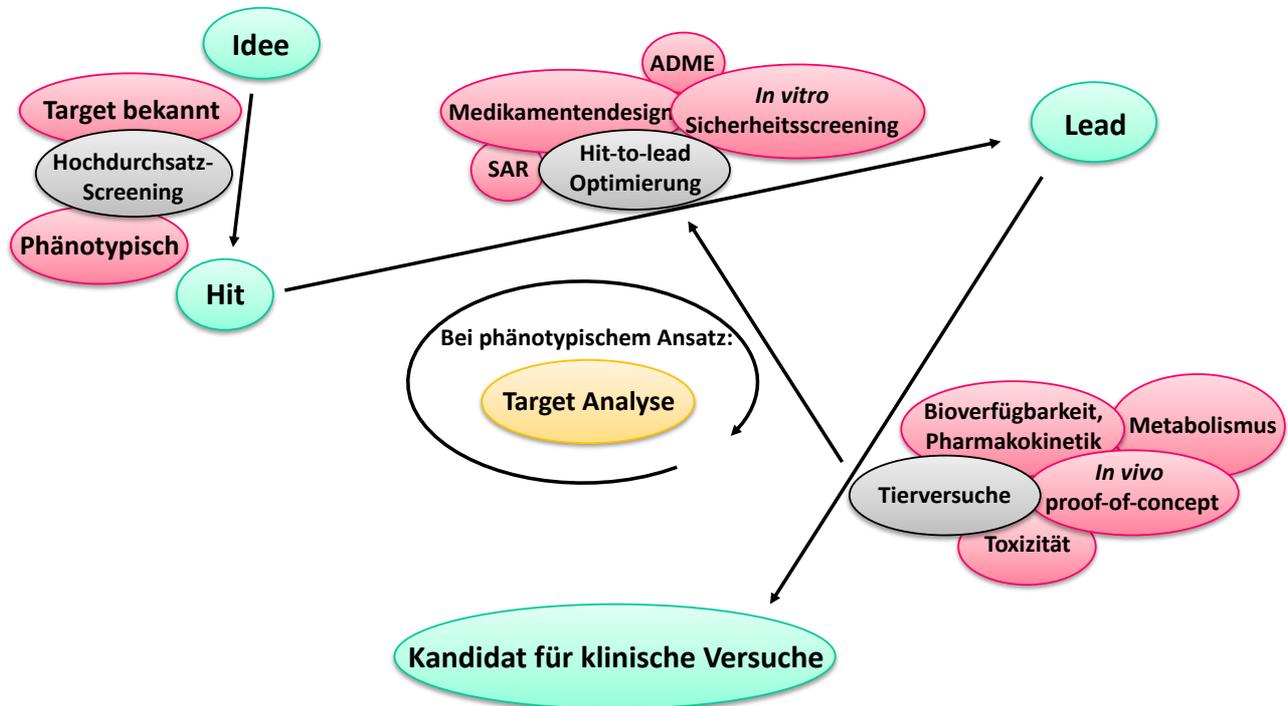


Abbildung 12. Schematischer Ablauf der präklinischen Wirkstoffentwicklung - Von der Idee bis zur klinischen Erprobung.

Bevor die Entscheidung für eine oder mehrere Leitsubstanzen, die nach Möglichkeit im Anschluss in ersten *in vivo* Tierversuchen eingesetzt werden, getroffen werden kann, sollten die sogenannten ADME-Parameter noch *in vitro* untersucht werden. ADME steht für A = Administration, D = Distribution/Verteilung, M = Metabolismus und E = Exkretion. Hierbei können verschiedenste Parameter wie beispielsweise die Bindung an Plasmaproteine, Stabilität in Plasma oder Lebermikrosomen, sowie Inhibition verschiedener CYP450 Isoformen analysiert werden (147).

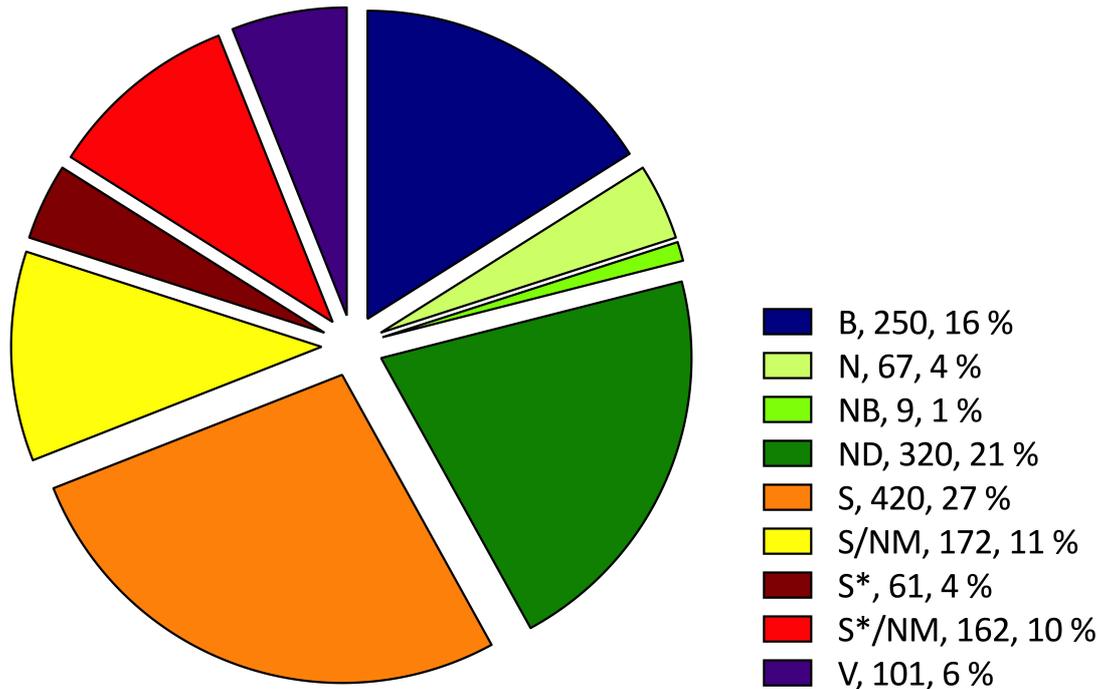
Nach erfolgreicher „Hit-to-Lead“ Optimierung können Leitsubstanzen nun in einem entsprechenden Tiermodell weiterführend getestet werden. Hierbei gilt es nicht nur die Wirkung auf das Zielmolekül *in vivo* zu bestätigen („proof-of-concept“), sondern auch herauszufinden, ob die Substanz beispielsweise oral, subkutan oder intravenös appliziert werden kann (Bioverfügbarkeit bei unterschiedlichen Administrationstechniken), welche Dosierungen des Wirkstoffs eingesetzt werden können oder welche Halbwertszeit die Substanz im Organismus besitzt (Pharmakokinetik). Auch Parameter wie Metabolismus und Toxizität sind von äußerster Wichtigkeit. Ob Substanzen eher über die Leber oder die Niere abgebaut bzw. ausgeschieden werden, kann wichtige Anhaltspunkte und Erklärungen für mögliche toxische Nebeneffekte liefern.

Im absoluten Idealfall kristallisiert sich im Verlauf der Tierversuche heraus, ob eine Substanz das Potential besitzt, um im Anschluss auch in der klinischen Phase und somit in Humanversuchen eingesetzt werden zu können. In den meisten Fällen scheitern Substanzen jedoch aufgrund ihrer zu hohen *in vivo* Toxizität, nur rund 23 % der Leads schaffen den Übergang in klinische Studien, die klinische Phase der Wirkstoffentwicklung (148). Daher sind meist weitere Optimierungsrunden notwendig, um am Ende die optimale Leitsubstanz zu erhalten. Dies kann nicht nur von der Wahl des richtigen, sondern auch von der Verfügbarkeit eines für die jeweilige Fragestellung geeigneten Tiermodells abhängen.

1.2.2 Naturstoffe als Grundlage der Wirkstoffentwicklung

Wie im einleitenden Abschnitt 1.2 erwähnt, wird Wirkstoffforschung seit jeher betrieben. Schon in den Anfängen bedienten sich Heiler antiker Völker in der Natur und suchten dort nach Pflanzen und Kräutern mit heilenden oder schmerzlindernden Eigenschaften. Zu einem der ältesten medizinischen Schriftstücke gehört das Papyrus Ebers aus einer Zeit um 1500 v. Chr., welches Anweisungen zur Nutzung und Anwendung verschiedener Kräuter enthält, die unter anderem bei Diabetes mellitus oder zur Schwangerschaftsverhütung eingesetzt werden können (141). Diese Erkenntnisse aus der direkten Anwendung von Naturprodukten in der frühen Medizin bildet bis heute die Grundlage der Wirkstoffentwicklung. Mit heutigen Techniken und Verfahren ist es nun in den meisten Fällen auch möglich, die für die eigentliche Wirkung verantwortlichen Moleküle aus Pflanzen, Bakterien oder Pilzen zu extrahieren, um deren genaue Wirkmechanismen zu studieren und auf Basis dieser Naturstoffe neue, potentere Wirkstoffe entwickeln zu können. Trotz neuer, hoch gehandelter Ansätze wie beispielsweise der kombinatorischen Chemie, bei der durch Kombination unterschiedlichster von Wirkstoffen bekannter Molekülbausteine *de novo* neue chemische Entitäten erschaffen werden sollen, bleiben Naturstoffe bis heute ein fester Bestandteil in der Entwicklung von neuen Arzneimitteln (149).

A



B

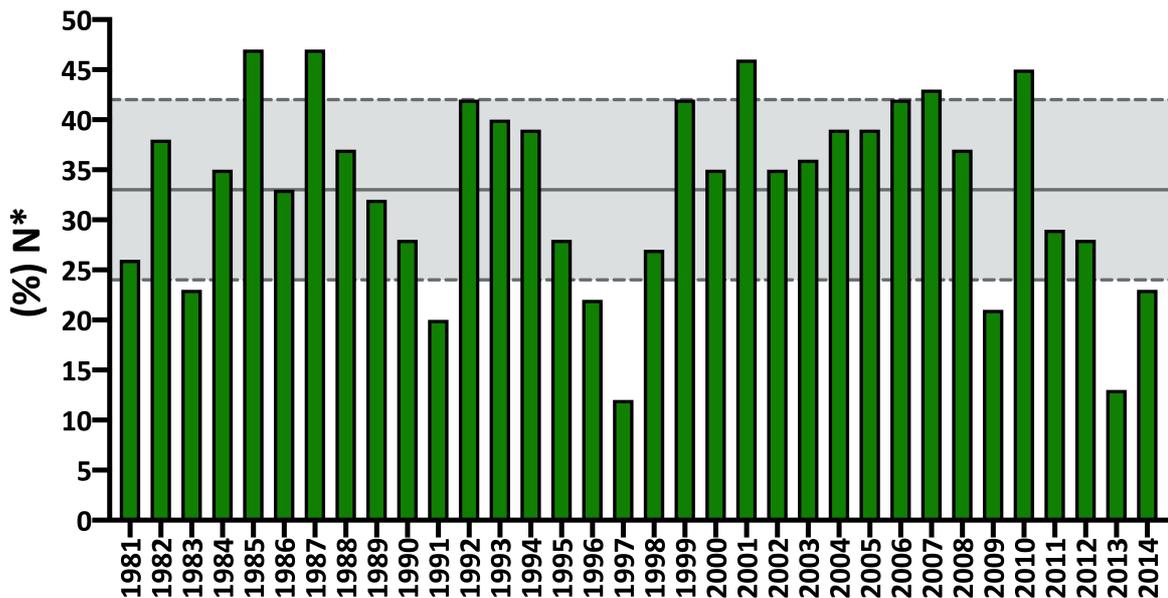


Abbildung 13. Naturstoffe als Grundlage der Wirkstoffentwicklung in den Jahren 1981-2014. (A) Anteilige Übersicht aller im Zeitraum von 1981-2014 zugelassener Wirkstoffe ($n = 1562$). B, biologische Makromoleküle; N, unveränderte Naturstoffe; NB, botanische Wirkstoffe; ND, Naturstoffderivate; S, synthetische Wirkstoffe; S/NM, synthetische Wirkstoffe/Naturstoffimitat; S*, synthetische Wirkstoffe, deren Pharmakophor von Naturstoffen abstammt; S*/NM, synthetische Wirkstoffe, deren Pharmakophor von Naturstoffen abstammt/Naturstoffimitat; V, Impfstoffe. **(B)** Prozentanteil der „small molecule“ Wirkstoffe aus der Kategorie N* (N/NB/ND) im Vergleich zur Gesamtmenge aller zugelassener Wirkstoffe im Zeitraum von 1981-2014, aufgeteilt in die einzelnen Jahre. Der durchschnittliche Anteil der N* Wirkstoffe im angegebenen Zeitraum beträgt $33 \pm 9 \%$ (grauer Bereich). Alle Zahlen entstammen dem Review von Newman und Cragg, 2016 (149).

Newman und Cragg behandeln in ihren Reviews den Anteil von Naturstoffen an allen Wirkstoffen, die im Zeitraum von 1981-2014 zugelassen wurden (149-153). Hierbei werden alle 1562 Medikamente unterschiedlichen Gruppen zugeordnet: B für „biologische Makromoleküle“, N für „unveränderte Naturstoffe“, NB für „botanische Wirkstoffe“, ND für „Naturstoff-Derivate“, S für „synthetische Wirkstoffe“, S/NM für „synthetische Wirkstoffe/Naturstoffimitat“, S* für „synthetische Wirkstoffe*“, deren Pharmakophor von Naturstoffen abstammt, S*/NM für „synthetische Wirkstoffe*/Naturstoffimitat“, deren Pharmakophor von Naturstoffen abstammt, sowie V für „Impfstoffe“. Abbildung 13A zeigt die Prozentanteile der angegebenen Kategorien im Zeitraum von 1981-2014, wobei die Hauptnaturstoffkategorien N (4 %), NB (1 %) und ND (21 %) zusammen rund ein Viertel aller zugelassener Wirkstoffe stellen. Wenn man deren Anteil auf alle zugelassenen „small molecules“ bezieht, handelt es sich sogar um rund 33 ± 9 % der zugelassenen Medikamente (149). Bei Betrachtung der Anteile in den einzelnen Jahren, zeigt sich, dass Naturstoffe über den gesamten Zeitraum die stabile Basis der Wirkstoffentwicklung sind (Abbildung 13B). Bezieht man auch alle Naturstoffimitate mit in die Berechnungen ein, zu denen hier auch beispielsweise Nucleosidanaloga zählen, bilden Naturstoffe einen Anteil von rund 70 % an allen im Zeitraum zugelassenen Medikamenten, was einmal mehr die Wichtigkeit von Naturstoffen hervorhebt.

Der Großteil aller zugelassener Naturstoffe beschränkt sich auf die fünf großen medizinische Anwendungsbereiche: Infektionskrankheiten (bakteriell, viral, fungal), Krebs, Bluthochdruck, Entzündungen und Diabetes. Besonders interessant für diese Dissertation ist vor allem der Bereich der Infektionserkrankungen, bei der rund 30 % der zugelassenen Medikamente auf Naturstoffen beruhen. Hierbei finden die meisten Wirkstoffe antibakteriellen Einsatz; 50 % aller antibakteriellen Arzneimittel basieren auf Naturstoffen. Newman und Cragg ordnen die im Labor synthetisierten Nucleotidanaloga der S* (synthetische Wirkstoffe, deren Pharmakophor von Naturstoffen abstammt) und nicht den Naturstoff-basierenden N* Kategorien zu (149), wodurch bei antiviralen Wirkstoffen nur rund 3 % der Medikamente auf die N* Kategorien entfallen, den größten Anteil bilden hier die Impfstoffe (44 %). Seit 2007 kommt es zu einem starken Anstieg der nicht-„small molecules“, besonders biologische Makromoleküle und Impfstoffe bilden mit durchschnittlich 36 % den größten Anteil. Trotz allem sind Naturstoff-basierte „small molecule“ Wirkstoffe weiterhin gefragt (149) und stehen auch im Fokus dieser Dissertation.

Die bei der Suche nach neuen Wirkstoffen verwendeten Substanzbibliotheken aus teilweise über 10.000 Einzelsubstanzen werden heutzutage nicht mehr bevorzugt für Hochdurchsatz-Screenings verwendet. Viele Firmen versuchen ihre Substanzbibliotheken auf Größen von rund 100-3.000 Moleküle zu optimieren und setzen hierbei verstärkt auf eine hohe Diversität der wichtigsten

Strukturen von Naturstoffen vor allem im Hinblick auf Heteroatome und chirale Zentren („diversity oriented synthesis“) (154,155).

Naturstoffe werden in der Medizin auch heutzutage nicht ausschließlich als Einzelmoleküle verabreicht, sondern finden ihren Einsatz vor allem in der Volksmedizin als Stoffgemische in Auszügen von Pflanzen. Beispielsweise werden Extrakte der südafrikanischen Heilpflanze *Pelargonium sidoides* oder auch der im Mittelmeerraum beheimateten Pflanzenart *Cistus incanus* zur Behandlung von Halsbeschwerden oder Durchfall angewandt. Die Wirkung wird hierbei auf die adstringierenden Eigenschaften der in großen Mengen enthaltenen Polyphenole zurückgeführt. In der virologischen Forschung wurden die Polyphenolextrakte beider Pflanzen hinsichtlich möglicher antiviraler Eigenschaften schon genauer untersucht und im Zellkulturmodell gezeigt, dass sie sowohl Influenza A Viren (156), HIV (157,158), als auch mit Oberflächenproteinen des Ebola- bzw. Marburg-Virus pseudotypisierte Lentiviren (158) an ihrem Eintritt in die Zelle hindern. Jedoch gibt es bisher keinerlei klinische Daten zu einer möglichen prophylaktischen Anwendbarkeit der Extrakte, weswegen bisher keines der beiden Produkte eine Zulassung als antivirales Medikament erhalten hat.

1.2.3 Multiple Antiviral γ -Pyrone Inspired Compounds

Der Grundstein für diese Dissertation wurde von Dr. Markus Helfer gelegt, der mittels Hochdurchsatz-Screening einer 10.000 Naturstoffe umfassenden Substanzbibliothek im EASY-HIT System (144) nach Treffern mit hochaktiven anti-HIV Eigenschaften suchte. Hierbei kristallisierten sich die beiden γ -Pyrone Neoareothin (#0) und Areothin (#1) mit IC_{50} -Werten unter 6 nM als die interessantesten und aussichtsreichsten Kandidaten für weiterführende Charakterisierungen heraus.

Areothin wurde erstmals 1953 aufgrund antibiotischer Wirkungen erwähnt (159). Die Struktur des von den Bakterien *Streptomyces thioluteus* produzierten Naturstoffes wurde 1961 von Hirata *et al.* beschrieben (160). Wie in Abbildung 14, #1 dargestellt, handelt es sich hierbei um ein „small molecule“ bestehend aus einer γ -Pyroneinheit, an die ein Tetrahydrofuranring anschließt, der über einen Dien-Linker mit einem 4-Nitro-Phenylrest verbunden ist. Neoareothin oder auch Spectinabilin genannt wurde erst 1976 entdeckt und aus *Streptomyces spectabilis* isoliert (161). Die Struktur dieses Moleküls (Abbildung 14, #0) unterscheidet sich lediglich in der Länge des Linkers von der von Areothin, welcher bei Neoareothin eine Kettenlänge von sieben Kohlenstoffatomen statt drei und insgesamt vier Doppelbindungen statt derer zwei bei Areothin aufweist.

Aufgrund der schon in der Literatur beschriebenen Photolabilität von Neoaureothin (162) und der in beiden Molekülen enthaltenen und in der Wirkstoffentwicklung wegen ihrer potentiellen Toxizität unvorteilhaften Nitrogruppe (163) am Benzolring, wurden zu Beginn und im weiteren Verlauf dieser Dissertation eine Sammlung von insgesamt 33 Aureothin-Derivaten (Abbildung 14, #2-34) in enger Zusammenarbeit mit dem Medizinalchemiker Dr. Manfred Rösner, der maßgeblich zum Design der Moleküle beigetragen hat, entworfen und von den Experten aus der Firma Bicol Biotechnology Co Ltd., Shanghai, China (Substanzen #2-21, sowie #30-34) und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Plettenburg vom Institut für Medizinalchemie des Helmholtz Zentrum München (Substanzen #22-29) synthetisiert. Die Entscheidung für Aureothin und gegen Neoaureothin als Basis zur Entwicklung neuer Derivate beruht unter anderem auf der schon im Detail beschriebenen Chemie zur Totalsynthese von Aureothin (164-166). Auch bei anderen Arbeitsgruppen stand Aureothin schon vermehrt im Fokus, um die biochemische Synthese genauer zu beschreiben. Hierbei entstanden mittels kombinatorischer Biosynthese einige wenige semisynthetische Derivate von Aureothin, bei denen eine antimykotische und antiproliferative Aktivität nachgewiesen wurde (167,168).

Im Falle der in dieser Dissertation bearbeiteten Aureothin-Derivate wurde die Synthese der einzelnen Substanzen auf der Grundlage des Reaktionsprinzips nach Jacobsen *et al.* durchgeführt (164,169). Zusammengefasst wurden passend substituierte Benzaldehyde zu entsprechend substituierten 2,2-Dibromovinylbenzenen umgewandelt und mithilfe des Boronesters des Schlüsselintermediates γ -Pyrone-Furanon (Abbildung 14, #2) und anschließender Br-Methyl-Konversion mit den Katalysatoren $Zn(CH_3)_2$ und Pd-Phosphin zu den jeweiligen Endprodukten abreagiert.

Diese chemisch komplett neue Substanzgruppe wurde im Laufe dieser Dissertation aufgrund ihrer starken antiviralen Wirkung und des Hauptbausteines γ -Pyrone mit dem Akronym **Multiple Antiviral Gamma-Pyrone Inspired Compounds** oder kurz **MAGIC** benannt.

Mit dieser breiten Auswahl an chemisch sehr unterschiedlichen und mehr Medikamenten-ähnlicheren MAGIC Substanzen sollten SAR-Studien durchgeführt werden, um optimiertere Derivate herausfiltern zu können. Beim Design dieser Moleküle wurden hauptsächlich Änderungen am Benzolring vorgenommen. Die unerwünschte Nitrogruppe sollte weichen und wurde durch Elektronen ziehende oder schiebende, lipophile oder polare Substituenten nicht nur in para-, sondern auch in ortho- oder meta-Position am Benzolring ersetzt.

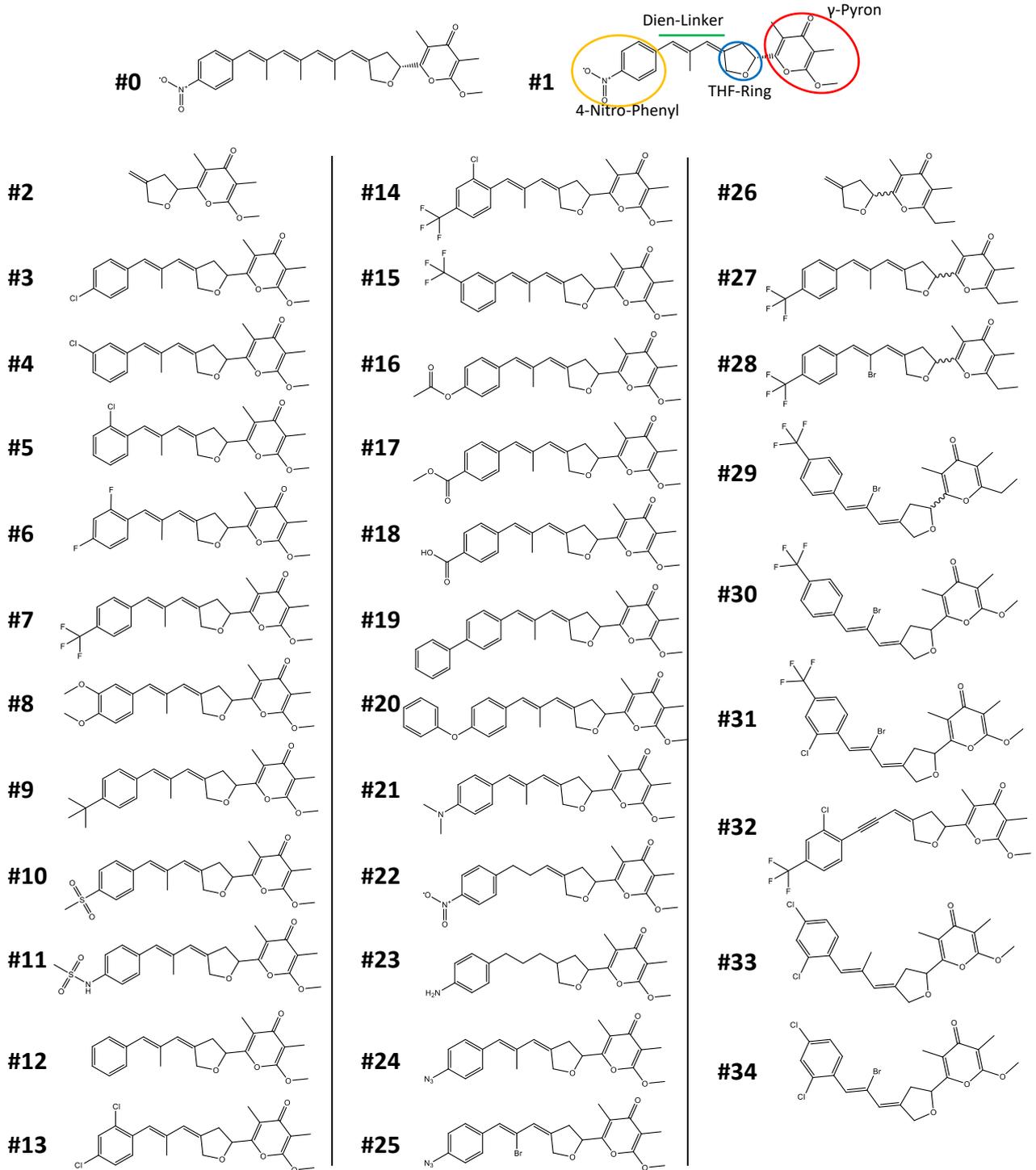


Abbildung 14. Übersicht aller MAGIC-Derivate. Gezeigt sind die Strukturformeln von Neoaureothin (#0), Aureothin (#1) und allen Aureothin-Derivaten (#2-34). Anhand der Struktur von #1 werden die einzelnen Strukturelemente von Aureothin erläutert: 4-Nitro-Phenylrest (gelb), Dien-Linker (grün), Tetrahydrofuranring (THF; blau), γ -Pyrone (rot).

1.3 Zielsetzung der Dissertation

Auch heute noch, fast 40 Jahre nach der ersten AIDS Diagnose, bleibt HIV/AIDS eines der größten Gesundheitsprobleme der Menschheit. Da es noch immer kein Heilmittel gegen die Infektionskrankheit gibt, sind die rund 38 Millionen Menschen, die weltweit mit HIV infiziert sind, auf die tägliche antiretrovirale Therapie angewiesen. Die hochwirksame cART wandelt zwar ein sicheres Todesurteil in eine kontrollierbare Erkrankung um, jedoch treten durch die Dauerbehandlung und die hohe Mutationsrate des Virus immer häufiger resistente Viren auf, was letztendlich zu einem Therapieversagen bei manchen Patienten führen kann. Daher ist es von größter Wichtigkeit immer wieder nach neuen Wirkstoffen im Kampf gegen HIV zu suchen.

Hierbei bieten Naturstoffe ein reichhaltiges Angebot an Strukturen, die sich die Wirkstoffforschung zu Nutze machen kann, um neuartige Arzneimittel zu entwerfen. Auch die Grundlage dieser Arbeit basiert auf einem Naturstoff, Aureothin, das von Dr. Markus Helfer im Hochdurchsatz-Screening einer Naturstoffbibliothek auf Substanzen mit anti-HIV Wirkung ausgewählt wurde.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand darin, Aureothin und die Gruppe der MAGIC Substanzen mittels Struktur-Wirkungsbeziehung-Studien genauer zu charakterisieren, um im Anschluss auf Basis einer daraus hervorgehenden Leitsubstanz die antivirale Wirkungsweise dieser neuen Substanzgruppe auf die Replikation von HIV im Detail zu analysieren und aufzuklären. Zudem sollten sowohl die anti-HIV Eigenschaften der MAGIC Substanzen im Vergleich und im Zusammenspiel mit zugelassenen Medikamenten, als auch ein mögliches breites Wirkungsspektrum gegen unterschiedliche Genotypen von HIV untersucht werden.

Mithilfe der in dieser Dissertation erarbeiteten Charakterisierung der neuen MAGIC Substanzklasse sollte die Basis für eine neuartige anti-HIV Wirkstoffgruppe bereitet werden, die möglicherweise Teil einer zukünftigen anti-HIV-Therapie werden könnte. Schließlich verlangt es auch weiterhin nach neuen anti-HIV Wirkstoffen mit bisher noch unbekanntem Mechanismen, die sich perfekt in die bestehende Kombinationstherapie einfügen und diese ergänzen und durch die es möglich ist, die gesamte Bandbreite der HI-Viren zu bekämpfen. Letztendlich ist dies der Schlüssel zum Erfolg im Kampf gegen die HIV Pandemie und AIDS.

2. Materialien

2.1 Geräte und Software

Tabelle 1. Geräte und Software.

Bezeichnung	Hersteller
Accu-jet® pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Acquity UPLC M-Class HSS T3 Säule, 1,8 µm, 75 µm x 250 nm	Waters, Eschborn, Deutschland
Bakterienschüttler - Minitron	Infors HT, Basel, Switzerland
BLAST	NCBI, Bethesda, MD, USA
Blotting Maschine - Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
CO ₂ Inkubator - HERAcCell™ 150i	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Durchflusszytometer - FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, TN, USA
Faden-Schere	Droh, Mainz, Deutschland
Feinwaage	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
FigTree Software	http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree , UK
Fluoreszenzmikroskop - IX81	Olympus, Tokyo, Japan
Fusion FX Chemolumineszenz Detektor	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ulm, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Gel Bildgebungssystem - ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Gelelektrophoreseeinheit - Mini-PROTEAN Tetra cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Grafiksoftware - ChemDraw® Professional	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
Graphen- und Analysesoftware - Prism7	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
HandyStep® electronic	Brand, Wertheim, Deutschland
Kombinations-Analysesoftware - CompuSyn	ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ulm, Deutschland
Laborwaage - L310	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Lampe (2x Philips Master PL-S-9W/840/2P)	Philips, Amsterdam, Niederlande
Lichtmikroskop - Primovert	Carl-Zeiss, Jena, Deutschland
Light Cycler® 480II 96 (Version 1.5.0.39)	Roche, Basel, Schweiz
Magnetrührer mit Heizeinheit - RCT basic	IKA, Staufen, Deutschland
Microplate reader - Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microplate reader software - i-control™	Tecan, Männedorf, Schweiz

2. Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
Minischüttler - IKA® MS3 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Multikanalpipette - Research Plus (100 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Pipetten - Research Plus (2,5/10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettiersystem - Liquidator™ 96	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Primer BLAST	NCBI, Bethesda, MD, USA
Progenesis QI Software v3.0, Nonlinear Dynamics	Waters, Eschborn, Deutschland
Protein- und Genlistenanalyse Software	Genomatix AG, München, Deutschland
QExactive HF Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Schlauch-Klemme	Droh, Mainz, Deutschland
Serial Cloner 2.6.1	Serial Basics, Boulder, CO, USA
Sicherheitswerkbank S2 - HERAsafe Heraeus™	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Sicherheitswerkbank S3 - Z100	Schulz Lufttechnik, Sprockhövel, Deutschland
SnapGene®	GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA
Thermocycler - peqSTAR 96 universal gradient	VWR, Radnor, PA, USA
Thermomixer - 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge - Minifuge Sprout	HeathrowScientific, Nottingham, UK
Ultimate 3000 RSLC nano-HPLC	Dionex, Sunnyvale, CA, USA
Ultraschallbad - S10 Elmasonic	Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Deutschland
Vakuum Zentrifuge - Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe - VACUSAFE Comfort	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Vortexer - Orbit 300	Labnet international inc., Edison, NJ, USA
Vortexer - Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Wasserbad	GFL, Hannover, Deutschland
Zentrifuge - 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge - Heraeus™ Multifuge™ X3R	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Zentrifuge - Hettich® Rotanta 460 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2. Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Cellstar® (6/12/24/48/96-well), Flachboden, farblos	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® (96-well), V-Boden, farblos	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® aerologische Pipetten (2/5/10/25/50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® µClear (96-well), Flachboden, weiß	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® µClear (96/384-well), Flachboden, schwarz	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Combitips Plus (1/5/10 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläser, rund	Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Falcon® FACS Röhrchen (5 ml)	VWR, Radnor, PA, USA
Filtropur S 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glasausstattung	Schott DURAN, Wertheim, Deutschland
Handschuhe - KIMTECH Science Purple Nitrile	Kimberly-Clark, Irving, TX, USA
Handschuhe - Semperclean™ MC7.5	Sempermed, Singapore
Handschuhe Nitrit NextGen®	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Kryoflakon	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Nitrocellulose Blotting Membran Amersham™ Protran™	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Objektträger	Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Parafilm®	Bemis Company Inc., Oshkosh, WI, USA
PCR Platte - FrameStar® (96-well)	4titude® Ltd., Wotton, UK
Pipettenspitzen - Liquidator™ 96 (20/200 µl)	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter - Tip One (2.5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland
QIASHredder Säule	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reagenzreservoir	Sorensen BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Reagenzröhrchen (15/50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml) - amber/safe-lock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röntgenfilm	KODIAK, Hamburg, Deutschland
Schutzanzug - KleenGuard A50	Kimberly-Clark, Irving, TX, USA
Zellkulturlaschen (T25/75/175)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellzählkammer - Fast-Read 102®	Immune Systems Ltd., Paignton, UK

2.3 Chemikalien, Lösungen und Kits

Tabelle 3. Chemikalien und Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller
(VLE)-RPMI 1640 Medium mit Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
2-log DNA Standard	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
ACK Lysepuffer	Gibco, Paisley, UK
Agarose NEEQ Ultra-Quality	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Gibco, Paisley, UK
Antibiotic-Antimycotic (100x)	BioWest, Nuaille, Frankreich
Biocoll Trennlösung	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CaCl ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	Roche, Basel, Schweiz
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM mit Glutamin und 4,5 g/L Glucose	Gibco, Paisley, UK
DMSO mit Zellkulturgüte	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DNase I	Qiagen, Hilden, Deutschland
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FBS, Hitze-inaktiviert	Gibco, Paisley, UK
Geneticin®	Gibco, Paisley, UK
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hepes	Gibco, Paisley, UK

2. Materialien

Bezeichnung	Hersteller
hIL-2	Roche, Basel, Schweiz
Hygromycin B	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
KCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamine (100x)	Gibco, Paisley, UK
Light Cycler® 480 SYBR Green I Mastermix	Roche, Basel, Schweiz
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Milli-Q Wasser	Merck-Millipore, Billerica, MA, USA
Mowiol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaOH	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvate (100x)	Gibco, Paisley, UK
NEAA	Gibco, Paisley, UK
NP40	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PAGERuler Prestained Protein Standard (#26619)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, UK
PFA (2 % in PBS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>PfuUltra</i> II Fusion HS DNA Polymerase	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
<i>PfuUltra</i> II Reaktionspuffer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
PHA	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Pierce™ ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Protease Inhibitor Complete	Roche, Mannheim, Germany
Rekombinantes HIV-1 Protease Protein	Abcam, Cambridge, UK
RNase-freie DNase	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAasin RNase-Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Bezeichnung	Hersteller
Triton-X100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Trypanblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin(0,05 %)-EDTA(0,02 %) (1x)	Gibco, Paisley, UK
Trypton	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
X-treme Gene 9 DNA Transfektionsreagenz	Roche, Basel, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 4. Kits.

Bezeichnung	Hersteller
CellTiter-Blue® Zellviabilitätsassay	Promega, Madison, WI, USA
CellTiter-Glo® 2.0 Zellviabilitätsassay	Promega, Madison, WI, USA
CellTox™ Green Zelltoxizitätsassay	Promega, Madison, WI, USA
Colorimetric Reverse Transcriptase Assay Kit	Roche, Basel, Schweiz
DNA Extraktion - QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
HIV Protease Substrate 1 Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HIV-1 Integrase Assay Kit	XpressBio, Frederick, MD, USA
HIV-1 p24 Antigen Capture Assay	Advanced Bioscience Laboratories, Rockville, MD, USA
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Plasmid DNA Maxiprep - NucleoBond® PC500	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Plasmid DNA Miniprep - NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
RNA Extraktion - RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript II First-Strand Synthesis System	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
SuperSignal™ West Femto Substrat Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA

2.4 MAGIC und Referenzsubstanzen

Tabelle 5. MAGIC und Referenzsubstanzen.

Bezeichnung	Hersteller
Abacavir (ABC; Cay14746-10)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Aureothin (AUR)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Dolutegravir (DTG; T6198)	TargetMol, Wellesley Hills, MA, USA
Efavirenz (EFV; 14412)	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Emtricitabin (FTC; ab145045)	Abcam, Cambridge, UK
Enfuvirtid (T-20; SML0934)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Flavopiridol (FLV; S1230)	Biozol, Eching, Deutschland
Lamivudin (3TC; T0682)	TargetMol, Wellesley Hills, MA, USA
MAGIC-Derivate	Alle MAGIC-Derivate wurden entweder per Auftrag von der Firma Bicol Biotechnology Co Ltd., Shanghai, China oder von Oliver Plettenburg, Helmholtz-Zentrum München, Hannover, Deutschland synthetisiert.
Neoareothin (NeoAUR; 170BIA-N1058-1)	Tebu-bio, Offenbach, Deutschland
Saquinavir (SQV; 9001893)	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA

2.5 Zellen und Zelllinien

2.5.1 LC5-RIC und LC5-RIC-R5 Zelllinie

Sowohl die LC5-RIC (RIC = red infected cells) als auch die LC5-RIC-R5 Zelllinie sind ursprünglich von HeLa Zellen abgeleitete Zelllinien, die im Falle der LC5-RIC die Zelloberflächenrezeptoren CD4 und CXCR4, im Falle der LC5-RIC-R5 zusätzlich noch CCR5 stabil auf der Zelloberfläche exprimieren (144,170). Durch die Expression der Oberflächenrezeptoren werden die Zellen empfänglich für eine HIV Infektion. Während LC5-RIC Zellen nur durch X4-trope HIV Stämme infiziert werden können, sind LC5-RIC-R5 Zellen sowohl für X4- als auch R5-trope Virusstämme empfänglich. Zudem enthalten beide Zelllinien ein Reporterogen, welches in Anwesenheit von und unter Aktivierung durch die HIV Proteine Tat und Rev das rot fluoreszierende Reporterprotein DsRed1 exprimiert (Abbildung 15) (144).

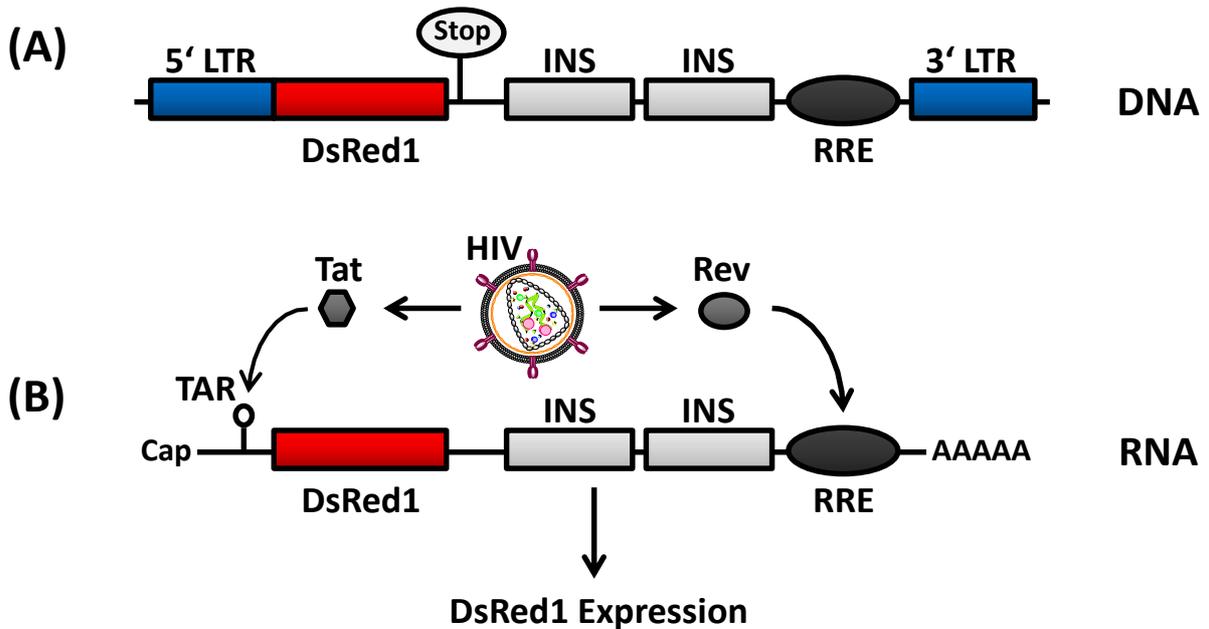


Abbildung 15. Schema des HIV Tat und HIV Rev abhängigen Reporterkonstrukts in LC5-RIC und LC5-RIC-R5 Zellen (144). (A) Das integrierte Reporterkonstrukt beinhaltet den für die HIV Tat induzierte Transkription wichtigen 5'-LTR-Promotor von HIV (blau), daran angeschlossen eine für das rot fluoreszierende Protein DsRed1 kodierende Sequenz (rot), sowie für HIV Rev abhängige Expression notwendige inhibitorische Sequenzen (INS) aus dem HIV-1 *gag*-Gen (p17/p24 Region) und RRE (Rev Response Element) Sequenzen aus dem HIV-1 *env*-Gen (171). (B) Die Infektion der Zellen durch HIV führt in der frühen Phase der viralen Expression zur Produktion der HIV Proteine Tat und Rev. Infolgedessen können Tat an das *Trans*-activation Response Element (TAR) und Rev an das RRE der Reporter mRNA binden, wodurch die Expression des Reporterproteins DsRed1 initiiert wird. Die Abbildung wurde adaptiert von (144).

2.5.2 HEK293T/17 Zelllinie

Die HEK293T/17 Zelllinie ist ein Derivat der HEK293 Zelllinie aus humanen fetalen Nierenzellen. Die HEK293T Zelllinie ist ein sehr gut transfizierbarer Klon der HEK293 Zelllinie, dem das temperatursensitive Gen des SV40 T-Antigens hinzugefügt wurde. Aus der HEK293T Zelllinie wurden mehrere Derivate kloniert, um eine Zelllinie zu generieren, die besonders zur Produktion von hohen Titern infektiöser Retroviren herangezogen werden kann, den hier verwendeten Klon HEK293T/17 (172). Die Zelllinie wurde von der ATCC bezogen (ATCC® CRL-11268™).

2.5.3 H9 Zelllinie

Die T-Zelllymphoma Zelllinie H9 ist ein klonaler Abkömmling der HuT 78 Zelllinie. Der H9 Klon wurde speziell für die Replikation von HIV-1 ausgewählt, um HIV-1 aus dem Blut von infizierten Patienten zu isolieren und zu vermehren (173,174). Auch in dieser Dissertation wurde die H9 Zelllinie unter anderem zur Vermehrung der verwendeten Patientenisolate (s. 2.6 und 3.2.1.2) benutzt. Die Zelllinie wurde von der ATCC bezogen (ATCC® HTB-176™).

2.5.4 PBMC

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, auch PBMC genannt, beschreiben die Gesamtheit der einkernigen Zellen des Blutes wie beispielsweise Lymphozyten oder Monozyten. Die in dieser Arbeit verwendeten PBMC wurden aus vom Deutschen Roten Kreuz zur Verfügung gestellten Blutproben isoliert. Details zur Isolation von PBMC siehe Methoden 3.1.1.1.

2.6 Viren und Bakterien

Tabelle 6. Viren und Bakterien. Alle HIV Patientenisolate wurden freundlicherweise von Lutz Gürtler und Josef Eberle, Max von Pettenkofer Institut, München, zur Verfügung gestellt (18,158).

Bezeichnung	Beschreibung
E. coli DH5α	Kompetente, gram-negative Bakterien zur Transformation und Produktion des HIV-Plasmids pLAI.2; Endonuklease- (<i>endA</i>) and Rekombinationsdefizient (<i>recA</i>); Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
HIV-1 _{AD8}	R5-troper HIV-1 Laborstrang, produziert durch Transfektion des proviralen Plasmids pNL(AD8) in HEK293T/17 Zellen (s. 3.2.1.1)
HIV-1 _{LAI}	X4-troper HIV-1 Laborstrang, produziert durch Transfektion des proviralen Plasmids pLAI.2 in HEK293T/17 Zellen (s. 3.2.1.1)
HIV-1M _{MVP899-87}	Klinisches Patientenisolat, HIV-1, Hauptgruppe M
HIV-1O _{MVP5180-91}	Klinisches Patientenisolat, HIV-1, Untergruppe O
HIV-1 _{V13-03413B}	Multiresistentes klinisches Patientenisolat aus einem Patienten mit gescheiterter cART, HIV-1, Hauptgruppe M, Subtyp B; Sequenzanalyse zeigte mehrfache Resistenzmutationen in für Reverse Transkriptase (RT) und Protease (PR) kodierenden Regionen: <i>RT</i> : T69I, V75I, L100I, K103N, Y115F, V118I, Q151M, V179L, M184V, L210F, K219E, H221Y; <i>PR</i> : L10I, V11I, K20R, V32I, L33F, E35D, M46I, I54L, Q58E, A71V, G73T, V82A, I84V, L90M
HIV-2 _{MVP10668-93}	Klinisches Patientenisolat, HIV-2

2.7 Plasmide

Tabelle 7. Plasmide. Detaillierte Informationen zu den Plasmiden befinden sich im Anhang 7.2 und in (175,176).

Bezeichnung	Hersteller
pLAI.2	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, von Dr. Keith Peden
pNL(AD8)	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, von Dr. Eric O. Freed

2.8 Medien und Pufferlösungen

Tabelle 8. Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

Zur Kultivierung von	DMEM	RPMI	FBS	Anti-Anti	Natrium-pyruvate
H9	-	500 ml	56 ml	5,6 ml	-
HEK293T/17	500 ml	-	56 ml	5,6 ml	5,6 ml
LC5-RIC	500 ml	-	56 ml	5,6 ml	5,6 ml
LC5-RIC-R5	500 ml	-	56 ml	5,6 ml	5,6 ml
PBMC	-	500 ml	56 ml	5,6 ml	-

Tabelle 9. Zusammensetzung der Pufferlösungen und Bakteriennährmedien. Detaillierte Informationen zum Laemmli Puffer befinden sich in (177).

Puffer/Nährmedium	Zusammensetzung
2x Towbin Puffer	50 mM Tris, 400 mM Glycin, 0,1 % SDS, 40 % Methanol
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	2 M Tris-Acetat, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl
5x Laemmli Puffer	250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 0,5 % Bromphenolblau, 50 % Glycerol
FACS Puffer	PBS, 1 % FBS
HIV-Protease Aktivitätsassay Puffer	100 mM NaAcetat, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % DMSO, 1 mg/ml BSA, pH 7,4
LB ₀ Nährmedium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl ₂ , pH 7,5
LB _{AMP} Selektionsmedium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl ₂ , 100 mg/ml Ampicillin, pH 7,5
Lysepuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 150 mM NaCl, 1 % Glycerol, 1 % NP40, 0,5 % Deoxycholsäure, 0,1 % SDS, 0,1 % Triton-X100

Puffer/Nährmedium	Zusammensetzung
PBS-T Puffer	PBS, 0,1 % Tween-20
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 9,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 2x H ₂ O, 2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Tris-Glycine-SDS Puffer (TGS)	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS

2.9 Primer

Tabelle 10. Primer. Alle Primer wurden von Metabion, Planegg, Deutschland synthetisiert. Primer wurden entweder selbst mithilfe der Serial Cloner Software entworfen oder entstammen aus nachfolgenden Quellen ¹(178), ²(134), ³(179), ⁴(180).

Primer	Sequenz (5' → 3')
Vollständig gespleißte HIV-1 Transkripte, MS forward	ATG GAG CCA GTA GAT CCT AG
Vollständig gespleißte HIV-1 Transkripte, MS reverse ¹	AGT CTC TCA AGC GGT GGT
Einfach gespleißte HIV-1 Transkripte, SS forward ¹	GGC GGC GAC TGG AAG AAG C
Einfach gespleißte HIV-1 Transkripte, SS reverse ¹	CTA TGA TTA CTA TGG ACC ACA
Ungespleißte HIV-1 Transkripte, US forward ¹	CTG AAG CGC GCA CGG CAA
Ungespleißte HIV-1 Transkripte, US reverse ¹	GAC GCT CTC GCA CCC ATC TC
„alle HIV-1 Transkripte“ (Nef ORF), forward ²	GTG TGT GGT AGA TCC ACA GAT CAA GG
„alle HIV-1 Transkripte“ (Nef ORF), reverse ²	CCA GTC ACA CCT CAG GTA CCT TTA AGA CC
RNA Polymerase II Transkripte, Pol II forward ³	GCA CCA CGT CCA ATG ACA T
RNA Polymerase II Transkripte, Pol II reverse ³	GTG CGG CTG CTT CCA TAA
L-M667 (R Region des LTR) ⁴	ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCT GGC TAA CTA GGG AAC CCA CTG
Alu 1 ⁴	TCC CAG CTA CTG GGG AGG CTG AGG
Alu 2 ⁴	GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G
Lambda T ⁴	ATG CCA CGT AAG CGA AAC T
AA55M (U5-LTR) ⁴	GCT AGA GAT TTT CCA CAC TGA CTA A
β-Globin, forward ⁴	ACA CAA CTG TGT TCA CTA
β-Globin, reverse ⁴	CAA CTT CAT CCA CGT TCA

2.10 Antikörper

Tabelle 11. Antikörper.

Zielmolekül	Host/Typ	Verdünnung	Typ	Hersteller
Anti-hGAPDH	Maus	1:10.000	Monoklonal	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Anti-HIV p24	Maus	1:10.000	Monoklonal	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Anti-Maus-Peroxidase	Ziege	1:10.000	Monoklonal	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK (#115-035-068)

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Zellen und Zelllinien

Um Zellen aus 1 ml Kryostocks in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen zügig im Wasserbad aufgetaut, in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt und 9 ml des entsprechenden vorgewärmten Mediums (s. 2.8, Tabelle 8) hinzupipettiert, wodurch die für die Zellen toxischen 10 % DMSO des Einfriermediums verdünnt wurden. Hiernach wurden die Zellen für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 12 ml frischem Medium resuspendiert und in T75 oder T175 Zellkulturflaschen überführt, wobei in der großen Flasche auf 25 ml Medium aufgefüllt wurde. PBMC wurden nicht aus Kryoproben in Kultur genommen, sondern immer aus frischen Blutproben des Deutschen Roten Kreuzes isoliert (s. 3.1.1.1).

Alle Zellen wurden bei Standardbedingungen in einem Zellkulturbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Mit Ausnahme der PBMC, die aufgrund ihres Primärzellstatus nicht für eine Dauerkultivierung ausgelegt sind, wurden alle Zelllinien alle 3-4 Tage gesplittet. Beim Splitvorgang wurde zwischen adhärennten Zellen (LC5-RIC, LC5-RIC-R5, HEK293T/17) und Suspensionszellen (H9) unterschieden. Die H9 Zellen wurden in der Flasche resuspendiert, 90 % der Zellsuspension für Experimente entnommen oder verworfen und anschließend wieder mit frischem Medium versorgt. Um adhärennte Zellen splitten zu können, müssen diese erst vom Flaschenboden gelöst werden. Hierzu wurde das gesamte Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und zum Ablösen mit 1 ml (T75) bzw. 2,5 ml (T175) einer Trypsin(0,05 %)-EDTA(0,02 %)-Lösung für 1-2 min im Zellkulturbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um die enzymatische Reaktion des Trypsin abzustoppen und die Zellen zu splitten, wurde auf 10 ml mit Medium aufgefüllt und die Zellen durch wiederholtes Resuspendieren vom Flaschenboden abgespült und vereinzelt, um dann 90 % der Zellsuspension entweder für Experimente zu entnehmen oder zu werfen. Hiernach wurde wieder auf die Ausgangsmenge mit Medium aufgefüllt.

Bei LC5-RIC und LC5-RIC-R5 Zellen wurde bei jeder zweiten Passage zusätzlich 0,74 mg/ml Geneticin und 0,125 mg/ml Hygromycin B hinzugegeben, um auf Zellen mit Reporter- und Oberflächenrezeptorgenen zu selektionieren.

Um Zellen für die Langzeitaufbewahrung zu präparieren, wurden diese wie oben beschrieben aus den Zellkulturflaschen entnommen, für 5 min bei 200 g pelletiert, in Einfriermedium (Medium mit 10 % DMSO und 20 % FBS) resuspendiert und bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff weggefroren.

3.1.1.1 Isolation von PBMC mittels Ficoll-Gradient

Die verwendeten PBMC wurden immer frisch aus Blutproben des Deutschen Roten Kreuzes isoliert. Hierfür wurden die rund 30 ml Blut aus dem Blutbeutel mit Hilfe von Schlauchklemme und Schere in eine T75 Zellkulturflasche überführt und auf 100 ml mit PBS verdünnt. Daraufhin wurden je 15 ml einer in einem 50 ml Röhrchen vorgelegten Ficoll-Lösung (Biocoll, Dichte 1,077 g/ml) mit je 25 ml der Blut-PBS Lösung vorsichtig überschichtet und für 20 min bei 900 g ohne Bremse zentrifugiert. Hierbei wird das Blut mithilfe des Ficoll-Gradienten in Plasma, Buffy-Coat und Erythrozyten/Thrombozyten aufgetrennt. Die Buffy-Coats aus je zwei Röhrchen wurden nun vorsichtig und ohne zu viele Erythrozyten aufzunehmen in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 500 g, mit Bremse) wurden die Zellpellets in je 2 ml ACK Lysepuffer aufgenommen und für maximal 2 min bei ZT inkubiert, um die übrig gebliebenen Erythrozyten zu lysieren. Die Zellsuspensionen wurden wieder zum Waschen auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und für 10 min bei 300 g mit Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in Zellkulturmedium (s. 2.8, Tabelle 8) aufgenommen, in einer T75 Zellkulturflasche vereinigt und wie in 3.1.1 angegeben kultiviert.

3.1.2 Zählen und Aussäen von Zellen für Experimente

Nachdem die Zellen wie in 3.1.1 gesplittet wurden, wurden die lebenden Zellen mithilfe einer Zellzählkammer ausgezählt und in entsprechender Anzahl 24 h vor Start des Experimentes in Zellkulturplatten ausgesät (Tabelle 12). PBMC wurden immer kurz vor Beginn des jeweiligen Experimentes gezählt und ausgesät. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension 1:10 in 80 µl Medium und 10 µl Trypanblau verdünnt. Das Trypanblau wurde benutzt, um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden, da dieses durch die geschädigte Membran toter Zellen diffundieren kann und die Zellen so anfärbt.

Tabelle 12. Aussäen von Zellen. Aufgeführt sind Zelltyp, Zellkulturplattenformat mit Mediumvolumen und die dazugehörige Anzahl Zellen, die pro Well ausgesät wurden.

Zelltyp Format	6-well/2 ml	12-well/1 ml	24-well/0,5 ml	48-well/0,25 ml	96-well/0,1 ml
LC5-RIC	2x10 ⁵	1x10 ⁵	5x10 ⁴	2x10 ⁴	1x10 ⁴
LC5-RIC-R5	-	-	-	-	1x10 ⁴
HEK293T/17	3x10 ⁵	-	-	-	-
H9	2x10 ⁵	1x10 ⁵	5x10 ⁴	2x10 ⁴	1x10 ⁴
PBMC	-	5x10 ⁶	-	-	5x10 ⁵

3.1.3 Zelltoxizitäts- und Zellviabilitätsassays

Um den Grad der toxischen Wirkung einzelner Substanzen und ihren Einfluss auf die Viabilität der Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Assays durchgeführt, die zum einen die direkte Toxizität (CellTox™ Green) und zum anderen den Einfluss auf sowohl den allgemeinen (CellTiter-Blue®) als auch auf den eher mitochondrienspezifischen Metabolismus (CellTiter-Glo®) beleuchten (181). Im Folgenden sind die einzelnen Assays im Detail beschrieben. Im Verlauf der Arbeit wurden alle drei Assays konsekutiv innerhalb eines experimentellen Ansatzes und nach einer Inkubationszeit der Testsubstanzen von 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ durchgeführt, um direkt miteinander vergleichbare Datensätze zu generieren. Aufgrund der Eigenschaften der verwendeten Assays wurden zuerst die beiden Fluoreszenz basierten Assays, beginnend mit CellTox™ Green, dann CellTiter-Blue®, durchgeführt. Da die Zellen während des CellTiter-Glo® Assays lysiert werden, um die intrazellulären ATP Level zu messen, war dies der terminale Schritt der Testreihe.

3.1.3.1 CellTox™ Green Toxizitätsassay

Der CellTox™ Green Assay macht sich die Fähigkeit eines Cyaninfarbstoffes mit freier DNA zu interkalieren zu Nutze. Der Farbstoff kann nur durch die gestörte Membranintegrität, die bei toten Zellen auftritt, in die Zellen diffundieren und so mit der Zell-DNA interagieren, wodurch es zum Anstieg messbarer Fluoreszenz kommt und ein direkter toxischer Effekt der Testsubstanzen auf die Zellen gemessen werden kann (181).

Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Vor Beginn des Assays wurden zum Zwecke einer Positivkontrolle drei Wells mit 5 µl Lysepuffer für 30 min unter Standardbedingungen im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Wells ohne Zellen dienen als Hintergrundkontrolle. Der CellTox™ Green Farbstoff wurde in einer 2x Konzentration in Assaypuffer angesetzt und

anschließend 1:1 zum schon vorhandenen Zellkulturüberstand hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei ZT und im Dunkeln wurde die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes mittels Tecan Microplate Readers gemessen (Anregungswellenlänge = 485 nm, Emissionswellenlänge = 530 nm). Es ist hierbei wichtig, die Messung in schwarz-wandigen Platten durchzuführen, da diese zu starke Lichtstreuung verhindern, wodurch die Fluoreszenzmessung einen geringeren Hintergrundwert und somit ein besseres Signal:Rauschen-Verhältnis liefert.

3.1.3.2 CellTiter-Blue® Viabilitätsassay

Der CellTiter-Blue® Assay beruht auf der Fähigkeit der Zellen den Indikatorfarbstoff Resazurin metabolisch durch Reduktion in Resorufin umzuwandeln, welches anschließend fluoreszenzspektrometrisch nachgewiesen werden kann (181,182).

Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Zellkulturüberstand wurde hierfür abgenommen und eine 1:5 Verdünnung des CellTiter-Blue® Reagenz in Medium ohne Phenolrot auf die Zellen gegeben. Wells ohne Zellen dienen hierbei als Hintergrundkontrolle, Wells mit unbehandelten Zellen als Positivkontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 1 h (LC5-RIC, LC5-RIC-R5, H9) bzw. 2,5 h (PBMC) im Zellkulturbrutschrank wurde die Fluoreszenz des metabolischen Produktes Resorufin mithilfe des Tecan Microplate Readers gemessen (Anregungswellenlänge = 550 nm, Emissionswellenlänge = 600 nm). Es ist hierbei wichtig, die Messung in schwarz-wandigen Platten durchzuführen, da diese zu starke Lichtstreuung verhindern, wodurch die Messung einen geringeren Hintergrundwert und somit ein besseres Signal:Rauschen-Verhältnis liefert.

3.1.3.3 CellTiter-Glo® Viabilitätsassay

Der CellTiter-Glo® Assay misst den ATP-Gehalt und somit hauptsächlich die metabolische Aktivität der Mitochondrien, basierend auf der enzymatischen Aktivität der Luciferase, durch die Luciferin, Sauerstoff und ATP reagieren und unter anderem photometrisch messbares Lumineszenzlicht abgestrahlt wird (183).

Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurde der Zellkulturüberstand entfernt und eine 1:1 Mischung aus Medium ohne Phenolrot und CellTiter-Glo®-Reaktionsgemisch auf die Zellen pipettiert. Wells ohne Zellen dienen hierbei als Hintergrundkontrolle, Wells mit unbehandelten Zellen als Positivkontrolle. Die Zellkulturplatte wurde im Dunkeln für 10 min bei ZT schüttelnd inkubiert. Das nun entstandene Zelllysat wurde in weiß-wandige Zellkulturplatten überführt (verstärkt das Lumineszenzsignal), um anschließend darin die Lumineszenz am Tecan Microplate Reader zu messen.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Produktion von HIV

Die in dieser Dissertation verwendeten HIV Stämme wurden entweder aus Plasmiden oder Patientenisolaten hochgezogen. Im Nachfolgenden werden die beiden Methoden detailliert besprochen.

3.2.1.1 Produktion von HIV Laborstämmen aus Plasmiden

Zur Produktion von HIV aus Plasmiden wurden HEK293T/17 Zellen in 6-well Platten ausgesät und 24 h bei Standardbedingungen kultiviert. Produziert wurden HIV-1_{LAI} aus pLAI.2 und HIV-1_{AD8} aus pNL(AD8) (Plasmidkarten s. Abbildungen A1 und A2 in 7.2). Zur Transfektion der Plasmid-DNA in die Zellen wurde ein Mastermix mit je 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNA, 3 µl X-treme Gene Transfektionsreagenz und 200 µl DMEM ohne Zusätze pro well angesetzt, gevortext und für 15 min bei ZT inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium in jedem Well erneuert und je 200 µl Mastermix auf jedes Well pipettiert. Nach 48 h Kultivierung wurde die Virusproduktion noch einmal durch das Hinzufügen 1 ml frischen Mediums pro well gesteigert. Nach weiteren 24 h Inkubationszeit im Zellkulturbrutschrank wurde der HIV-haltige Zellkulturüberstand aller Wells in 50 ml Röhren vereinigt, für 10 min bei 300 g zentrifugiert, um restliche Zellen zu entfernen, und anschließend in 1 ml Aliquots in Kryoröhren bei -80 °C gelagert. Vor der Nutzung für Infektionsexperimente wurde der Virustiter mittels TCID₅₀ Methode, wie in 3.2.3 beschrieben, bestimmt.

3.2.1.2 Expansion von HIV Patientenisolaten

Die in dieser Dissertation eingesetzten HIV Patientenisolate HIV-1_{MVP899-87}, HIV-1_{MVP5180-91}, HIV-2_{MVP10668-93} und HIV-1_{V13-03413B} wurden, wie in Rebenburg *et al.* (158) beschrieben, expandiert. In Kürze, es wurden jeweils eingefrorene Zellstocks HIV-infizierter H9 Zellen in Kultur genommen und über rund sechs Passagen in T75 Flaschen kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde ungefähr die Hälfte der infizierten Zellpopulation und 75 % des Zellkulturüberstandes durch uninfizierte H9 Zellen und frisches Medium ersetzt. Nach sechs Passagen wurden die Zellen abzentrifugiert und sowohl der zellfreie HIV-haltige Überstand als auch die infizierten Zellen mit Medium zu je 1 ml aliquotiert und bei -80 °C weggefroren. Vor der Nutzung für Infektionsexperimente wurde der Virustiter der zellfreien HIV-Stocks mittels TCID₅₀ Methode, wie in 3.2.3 beschrieben, bestimmt.

3.2.2 Infektionsexperimente mit HIV

In dieser Arbeit wurden sowohl HIV Infektionsexperimente mit den Zelllinien LC5-RIC, LC5-RIC-R5 und H9 als auch mit PBMC durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen, wie in 3.1.2 beschrieben, am Vortag bzw. kurz vor der Inokulation ausgesät. Um PBMC für eine HIV Infektion empfänglich zu machen, ist eine vorhergehende Stimulation notwendig, die im Detail in 3.2.2.1 beschrieben wird. Der verwendete Virusstock wurde vor der Inokulation für 1 h bei 37 °C inkubiert, um die Maturation noch unreifer Viruspartikel durch die HIV Protease zu aktivieren. Der Reifungsprozess darf nicht zu lange fortgesetzt werden, da der Virusstock sonst wieder an Infektiosität verliert. Hiernach wurden die Zellen mit einer MOI von 0,5 inokuliert. Die MOI oder Multiplizität der Infektion definiert die Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle. Mittels MOI, Titer des Virusstocks, Volumen des Zellkulturüberstands und Anzahl ausgesäter Zellen kann das zur Infektion benötigte Volumen des Virusstocks pro Well anhand der nachfolgenden Formel berechnet werden:

$$V_{\text{Virusstock}} [\text{ml}] = \frac{\text{MOI} \times V_{\text{Überstand}} [\text{ml}] \times \text{Zellen} [1/\text{ml}]}{\text{Virustiter} [1/\text{ml}]}$$

3.2.2.1 Stimulation von PBMC

Da nur der Anteil CD4⁺ T-Lymphozyten empfänglich für eine HIV Infektion ist, wurden die verwendeten PBMC mit dem humanen T-Zell-Wachstumsfaktor Interleukin-2 (hIL-2; 20 IU/ml) und dem Lektin Phytohämagglutinin (PHA; 1 µg) stimuliert, um speziell die Zellteilung der T-Lymphozyten zu aktivieren und somit die Population HIV empfänglicher Zellen zu erhöhen. Nach einer Inkubationszeit von 48-72 h im Zellkulturbrutschrank wurden die Zellen, wie in 3.1.2 und 3.2.2 beschrieben, für das entsprechende Experiment ausgesät und inokuliert.

3.2.3 Bestimmung der Virustiter mittels neuer TCID₅₀ Bestimmungsmethode

Die „Tissue Culture Infectious Dose 50“ oder TCID₅₀ beschreibt die Menge eines Pathogens, die notwendig ist, um pathologische Veränderungen in 50 % der infizierten Zellkultur herbeizuführen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine für HIV Infektionen neue Methode entwickelt, um die TCID₅₀ und somit den Virustiter eines Virusstocks virologisch zu bestimmen. Je nach Tropismus des zu bestimmenden Virus, diente entweder die LC5-RIC (X4-trope Viren) oder die LC5-RIC-R5 (R5-trope Viren) Zelllinie als Grundlage für diesen neuen Assay.

Je zu titrierendem Virusstock wurden, wie in 3.1.2 beschrieben, LC5-RIC oder LC5-RIC-R5 Zellen in eine schwarze 96-well Platte ausgesät und für 24 h kultiviert. Vor Beginn des Experimentes wurde der zu titrierende Virusstock, wie in 3.2.2 beschrieben, vor der Inokulation zur Maturation für 1 h bei 37 °C inkubiert. Hiernach wurde eine 12-stufige Verdünnungsreihe der Virussuspension angesetzt. Für die Ausgangsverdünnung (1:6) wurden 200 µl Virusstock in 1 ml Medium verdünnt, für jede weitere Verdünnungsstufe (1:5) je 200 µl der vorigen Verdünnung in 800 µl Medium überführt und gevortext. Der Zellkulturüberstand der am Vortag ausgesäten Zellen wurde abgenommen und durch jeweils 6x100 µl jeder Verdünnungsstufe ersetzt, wobei in die Wells der obersten und untersten Reihe der Platte je 100 µl Medium ohne Virus pipettiert wurde (negativ Kontrolle). Nach 48 h Inkubation im Zellkulturbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Anzahl DsRed1 positiver und somit HIV positiver Wells am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Ein Well galt als positiv, wenn nur eine einzige Zelle DsRed1 positiv war. Anschließend wurde die TCID₅₀, wie von Reed (184) beschrieben, kalkuliert.

3.2.4 EASY-HIT Infektionsinhibitions-Assay

Der EASY-HIT Assay ist ein exploratorisches Vollreplikations-Assay System zur Identifizierung und Analyse von HIV Inhibitoren (144). Das System basiert auf den in 2.5.1 beschriebenen Reporterzelllinien LC5-RIC und LC5-RIC-R5 Zellen, die unter HIV Infektion das Reporterfluorophor DsRed1 exprimieren, wodurch inhibitorische Effekte von Testsubstanzen durch Reduktion der Fluoreszenz gemessen werden können (144).

Je nach Tropismus des eingesetzten HIV-Stammes wurden entweder LC5-RIC (X4-trope Viren) oder LC5-RIC-R5 Zellen (R5-trope Viren), wie in 3.1.2 beschrieben, in schwarze 96-well Platten ausgesät und kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen simultan zur Inokulation (s. 3.2.2) mit einer 1:2 Substanzverdünnungsreihe in einem finalen Volumen des Zellkulturüberstands von 120 µl behandelt und für weitere 48 h im Zellkulturbrutschrank kultiviert. Hierbei wurde die Substanz in Triplikaten und mindestens sechs unterschiedlichen Konzentrationen

eingesetzt. Als Positivkontrolle für 100 % Infektion wurden Zellen mit Virus inokuliert und einer äquivalenten Menge DMSO ohne Testsubstanz behandelt. Als Hintergrundkontrolle dienten Zellen, die weder Virusinokulum noch Testsubstanz erhielten. Anschließend wurde die Expression des Reporters DsRed1 anhand des Fluoreszenzsignals in jedem Well mithilfe eines Tecan Microplate Readers gemessen (Anregungswellenlänge = 552 nm, Emissionswellenlänge = 596 nm). Dieser erste Schritt des EASY-HIT Assays, im weiteren Verlauf der Arbeit auch *1st step* genannt, beschreibt die HIV Tat und Rev abhängige Expression des Reporterfarbstoffes, wodurch inhibitorische Wirkungen aller Substanzen nachgewiesen werden können, die im Verlauf des Replikationszyklus spätestens an der Expression der frühen HIV Proteine und deren Funktion eingreifen.

Um nun auch die Produktion infektiöser Nachkommenviren analysieren zu können, wurden in einem zweiten Schritt des EASY-HITs (*2nd step*) uninfizierte Zellen mit Zellkulturüberstand des *1st step* inokuliert. Hierfür wurden 20 µl des Zellkulturüberstandes auf am Vortag frisch ausgesäte LC5-RIC bzw. LC5-RIC-R5 Zellen überführt und die Zellen für weitere 72 h im Zellkulturbrutschrank kultiviert. Nun wurde noch einmal wie oben beschrieben die Expression des Reporters DsRed1 gemessen.

Der relative anti-HIV Effekt der Testsubstanz wurde durch Subtraktion der Hintergrundkontrolle und anschließender Normalisierung auf die Positivkontrolle berechnet. Mithilfe der GraphPad Prism7 Analysesoftware wurden zusätzlich die inhibitorischen Konzentrationen für 50 % (IC₅₀) und 90 % (IC₉₀) Inhibition kalkuliert.

3.2.4.1 EASY-HIT mit infizierten PBMC

Das EASY-HIT System wurde in leicht abgewandelter Form auch zur Untersuchung der inhibitorischen Effekte der Testsubstanzen in primären Zielzellen herangezogen. Hierfür wurden PBMC, wie in 3.1.2 und 3.2.2 beschrieben, ausgesät und mit Virus inokuliert. Aufgrund des fehlenden Reporterkonstruktes in PBMC konnte hier kein *1st step*, sondern nur der *2nd step* des EASY-HITs, und somit die Produktion infektiöser viraler Partikel, gemessen werden. In Experimenten mit PBMC wurden 35 µl Zellkulturüberstand auf uninfizierte LC5-RIC bzw. LC5-RIC-R5 übertragen und sonst wie in 3.2.4 beschrieben verfahren.

3.2.5 Photostabilitäts-Assay

Zur Untersuchung der Photostabilität der MAGIC Substanzen wurde ein Experimentansatz basierend auf dem in 3.2.4 beschriebenen EASY-HIT Assay gewählt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Substanzen in ihrer IC_{90} -Konzentration in Medium verdünnt, in Triplikaten von je 110 μ l auf eine durchsichtige 96-well Platte aufgetragen und für 24 h bei ZT entweder im Dunkeln oder unter direkter Beleuchtung durch eine handelsübliche Schreibtischlampe (2x Philips Master PL-S-9W/840/2P, ca. 30 cm Entfernung zwischen Lampe und Proben; Lichtspektrum s. Abbildung A3 in 7.3) inkubiert. Anschließend wurde ein EASY-HIT Assay mit *1st step* und *2nd step* und HIV-1_{LAI} Inokulation für alle beleuchteten und unbeleuchteten Proben durchgeführt (s. 3.2.4). Die relative Photostabilität der einzelnen Testsubstanzen wurde durch Normalisierung der verbliebenen anti-HIV Aktivität von beleuchteten auf unbeleuchtete Substanzen kalkuliert.

3.2.6 Time-of-Addition Assay

Beim Time-of-Addition Assay oder auch TOA werden HIV inokulierte Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation mit Testsubstanzen behandelt, um so ein zeitabhängiges Wirkprofil zu erhalten, von dem Anhaltspunkte für einen Wirkmechanismus innerhalb des Replikationszyklus abgeleitet werden können.

In dieser Arbeit wurde der TOA, wie auch in Rebensburg *et al.* beschrieben (158), basierend auf dem EASY-HIT Assay durchgeführt. Am Vortag ausgesäte LC5-RIC Zellen wurden mit HIV-1_{LAI} inokuliert und mit MAGIC- oder Kontrollsubstanzen (Konzentration $>5x IC_{50}$) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (0-16 h) behandelt. In diesem Versuchsansatz beschränkte sich der EASY-HIT Assay auf den *1st step*. Als Kontrollsubstanzen wurden der Fusionsinhibitor Enfuvirtid, die Reverse Transkriptase Inhibitoren Abacavir und Efavirenz, der Integraseinhibitor Dolutegravir, sowie der experimentelle Expressionsinhibitor Flavopiridol verwendet.

3.2.7 Kombinations-Assay

Um die Möglichkeit einer zukünftigen Kombinationstherapie zwischen MAGIC Substanzen und klinisch eingesetzten Substanzen in der cART zu evaluieren, wurden Kombinations-Assays auf Grundlage des in 3.2.4 beschriebenen EASY-HIT Assays durchgeführt. Im Folgenden werden die Abweichungen genauer beschrieben. In diesem Ansatz werden sowohl von Einzelsubstanzen als auch von Substanzkombinationen 1:2 Verdünnungsreihen mit je 12 verschiedenen Konzentrationen erstellt, mit denen HIV-1_{LAI} inokulierte LC5-RIC Zellen simultan zur Inokulation

behandelt werden. Die Startkonzentration jeder Substanz übersteigt den jeweiligen IC_{90} sowohl in Einzel- als auch in Kombinationsbehandlungen. Der EASY-HIT Assay wird mit *1st step* und *2nd step* durchgeführt. Um die Interaktion der Substanzen in Kombinationsbehandlungen genauer zu untersuchen, wurden die Daten aus dem *2nd step* mithilfe der CompuSyn Software (185), deren mathematische Grundlage auf dem Kombinations-Index-Theorem (186) beruht, analysiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung wurde photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 260 nm mithilfe eines NanoDrop™ 2000 Spektrophotometers bestimmt. Destilliertes Wasser diente als Hintergrundkontrolle. Die Reinheit von Nukleinsäurelösungen kann je nach Extraktionsverfahren sowohl von Proteinen (Absorptionswellenlänge von 280 nm) als auch von phenolhaltigen Lösemitteln (Absorptionswellenlänge von 230 nm) beeinträchtigt werden. Zur Reinheitskontrolle wird daher das Verhältnis aus OD_{260}/OD_{280} für Protein- bzw. OD_{260}/OD_{230} für Phenolverunreinigungen berechnet. Liegen die Quotienten in beiden Fällen zwischen 1,8 und 2,0, spricht dies für eine hohe Nukleinsäurequalität in der Lösung.

3.3.2 Expansion von Plasmiden

Um die zur Virusproduktion benötigten Plasmide pLAI.2 und pNL(AD8) (Plasmidkarten s. Abbildungen A1 und A2 in 7.2) zu expandieren, wurde zuerst Plasmid-DNA in kompetente Bakterien transformiert, die Bakterien zum Wachstum inkubiert und die Plasmid-DNA am Ende wieder aus den Bakterien präpariert. Im Folgenden sind diese Schritte im Detail erklärt.

3.3.2.1 Transformation von Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde in *E.coli DH5 α* transformiert. Hierzu wurde die Plasmid-DNA mit einer dünnen Pipettenspitze resuspendiert, nur die adhärente DNA mit 50 μ l Bakteriensuspension vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien erst für exakt 45 s bei 42 °C hitzegeschockt, 2 min auf Eis abgekühlt und dann mit 400 μ l S.O.C. Medium für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zur Selektion auf einer ampicillinhaltigen LB_{Amp}-Agaroseplatte ausgestrichen und für 16 h bei 37 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde eine gut definierte Einzelkolonie gepickt und in 5 ml LB_{Amp} Medium resuspendiert und für 8 h bei 37 °C inkubiert. Die Vorkultur wurde in einen Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB_{Amp} Medium überführt und ÜN bei 37 °C geschüttelt.

3.3.2.2 Plasmidpräparation aus Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde mithilfe des NucleoBond® PC500 Präparationskits nach Angaben des Herstellers aus der Bakteriensuspension isoliert. In Kürze, die Bakterienkultur wurde in 50 ml Röhren aufgeteilt und für 20 min bei 4 °C und 5.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 12 ml RNaseA-haltigem S1 Puffer resuspendiert, durch Zugabe von 12 ml S2 Puffer nach mehrmaligem Invertieren für 2-3 min bei ZT lysiert und nach Hinzupipettieren von 12 ml S3 Puffer invertiert und 5 min auf Eis gekühlt. Für jede Probe wurden Säulen mit 6 ml N2 Puffer äquilibriert und Filter mit 1 ml N2 Puffer angefeuchtet. Die lysierte Bakteriensuspension wurde durch den Filter auf die vorbereiteten Säulen geladen, an die nun die Plasmid-DNA binden kann. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 15 ml N5 Puffer von der Säule in ein 50 ml Röhren mit vorgelegten 11 ml Isopropanol eluiert, invertiert und für 1 h bei 4 °C und 4.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 30 min bei ZT und 4.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet unter dem Abzug luftgetrocknet und die Plasmid-DNA abschließend in 500 µl ddH₂O aufgenommen. Die DNA Konzentration wurde wie in 3.3.1 beschrieben photometrisch gemessen und die Probe bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.3.3 Quantitative Analyse integrierter proviraler HIV-DNA

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss von MAGIC Substanzen auf die provirale Integration von HIV-1_{LAI} in das Genom infizierter Zielzellen mittels 2-Schritt-Alu/Nested-PCR untersucht (180). In den nachfolgenden Abschnitten wird diese Methode im Detail beschrieben.

Es wurden LC5-RIC Zellen, wie in 3.1.2 und 3.2.2 beschrieben, in 12-well Platten ausgesät, mit HIV-1_{LAI} inokuliert und simultan zur Inokulation behandelt. Als Referenzsubstanzen wurden der RT-Inhibitor Efavirenz, der Integraseinhibitor Dolutegravir und der experimentell genutzte Expressionsinhibitor Flavopiridol verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 48 h im Zellkulturbrutschrank, wurde die genomische DNA aus den Zellen extrahiert.

3.3.3.1 Extraktion genomischer DNA

Um den Anteil integrierter proviraler HIV-DNA nachweisen zu können, wurde zuerst die genomische DNA mithilfe des QIAamp® DNA Mini Kit nach Angaben des Herstellers aus den Versuchsproben isoliert. Hierzu wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und in 200 µl PBS aufgenommen. Zum Lysieren der Zellen wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl ALT Puffer hinzupipettiert, resuspendiert und für 10 min bei 56 °C inkubiert. Bevor das Zelllysat auf eine Säule gegeben werden kann, wurden je 100 µl Ethanol zur Probe pipettiert, wodurch die DNA im Anschluss an die Säule binden kann. Hiernach wurden die Säulen in einem Auffangröhrchen für 1 min bei 6.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die auf der Säule gebundene DNA wurde mit 500 µl AW1 Puffer gewaschen, für 1 min bei 6.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde mit 500 µl AW2 Puffer gewaschen, für 3 min bei 6.000 g zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Die DNA wurde einmal für 1 min bei 6.000 g trocken zentrifugiert, bevor diese mit 30-50 µl ddH₂O (1 min inkubieren, dann für 1 min bei 6.000 g zentrifugieren) in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert wurde. Die DNA Konzentration wurde wie in 3.3.1 beschrieben photometrisch gemessen und die Probe bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.3.3.2 *Alu*-PCR

Um die relative Menge integrierter proviraler HIV-1 DNA zu bestimmen, wurde eine 2-Schritt-*Alu*/Nested-PCR durchgeführt (Abbildung 16) (180). In einem ersten Amplifikationsschritt, der *Alu*-PCR werden sich die im humanen Genom hochkonservierten *Alu*-Sequenzen zu Nutze gemacht und eine PCR mit einer Kombination aus Primern gefahren, die zum einen in der R Region des HIV-LTR (*L-M667*, Primersequenz s. 2.9, Tabelle 10) und zum anderen an *Alu*-Sequenzen binden (*Alu 1*, *Alu 2*, Primersequenzen s. 2.9, Tabelle 10). Als Hintergrundkontrolle wurde ein zweiter PCR Ansatz durchgeführt, der nur mit dem *L-M667* Primer gestartet wurde. Es wurde Wasser als Negativkontrolle eingesetzt. Im Folgenden sind der PCR Ansatz und das verwendete PCR Programm aufgeführt:

PCR Ansatz *Alu*-PCR:

10 µl	SYBR Green I Mastermix
2 µl	100 nM <i>L-M667</i> Primer
2 µl	300 nM <i>Alu 1</i> Primer
2 µl	300 nM <i>Alu 2</i> Primer
2 µl	ddH ₂ O
2 µl	gDNA (50 ng)

PCR Programm:

Initiale Denaturierung:	95 °C, 8 min
Periodische Amplifizierung, 12 Zyklen:	
Denaturierung:	95 °C, 10 s
Primer Annealing:	60 °C, 10 s
Elongation:	72 °C, 170 s

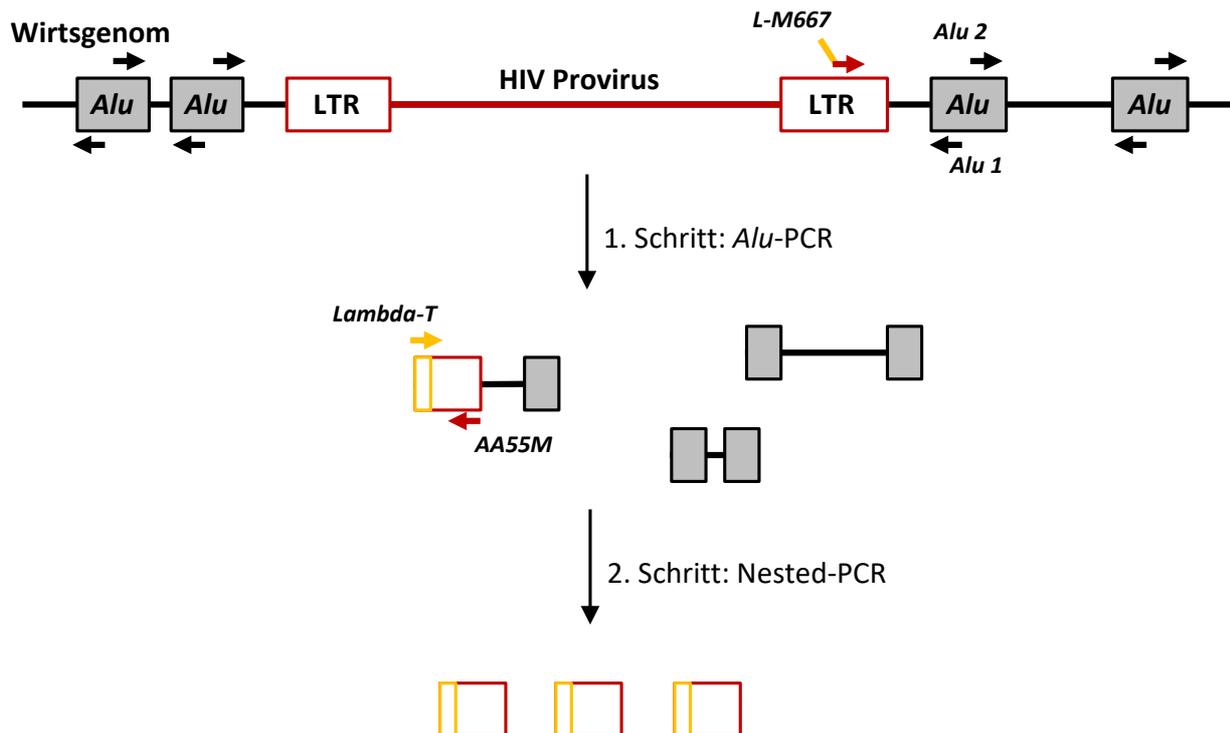


Abbildung 16. Schematische Darstellung der 2-Schritt-*Alu*/Nested-PCR zur Analyse integrierter proviraler HIV-DNA.

Im ersten Amplifikationsschritt werden sich die im humanen Genom hochkonservierten *Alu*-Sequenzen zu Nutze gemacht und eine *Alu*-PCR mit einer Kombination aus Primern durchgeführt, die zum einen in der R Region des HIV-LTR (*L-M667*, gelb-roter Pfeil) und zum anderen an *Alu*-Sequenzen im Wirtsgenom binden (*Alu 1*, *Alu 2*, schwarze Pfeile). Im zweiten Schritt, der Nested-PCR, werden mittels spezieller Primer spezifisch die HIV/*Alu* Produkte (gelb/rot-grau) und nicht die *Alu-Alu* Produkte (grau-grau) amplifiziert. Der *Lambda-T* Primer (gelber Pfeil) bindet spezifisch an die zuvor per *L-M667* Primer eingeführte Lambda-Phasensequenz, während der *AA55M* Primer (roter Pfeil) HIV Genom spezifisch bindet (180).

3.3.3.3 Nested-PCR

Der in der *Alu*-PCR verwendete *L-M667* Primer ist um eine Lambda-Phagen spezifische Sequenz verlängert, die nun in der zweiten PCR genutzt wurde, um spezifisch die HIV-*Alu* Produkte zu amplifizieren, die in der ersten PCR produziert wurden (Abbildung 16). Es wurden der *Lambda T* Primer (vorwärts orientiert, Primersequenz s. 2.9, Tabelle 10), der an die eingefügte Lambda-Phagensequenz bindet, und der *AA55M* (rückwärts orientiert, Primersequenz s. 2.9, Tabelle 10) Primer, der im Bereich des HIV-U5-LTR ansetzt, verwendet. Es wurde Wasser als Negativkontrolle eingesetzt. Im Folgenden sind der PCR Ansatz und das verwendete PCR Programm aufgeführt:

PCR Ansatz Nested-PCR:

10 µl	SYBR Green I Mastermix
2 µl	300 nM <i>Lambda-T</i> Primer
2 µl	300 nM <i>AA55M</i> Primer
4 µl	ddH ₂ O
2 µl	Amplifikat aus <i>Alu</i> -PCR

PCR Programm:

Initiale Denaturierung:	95 °C, 10 min
Periodische Amplifizierung, 45 Zyklen:	
Denaturierung:	95 °C, 10 s
Primer Annealing:	60 °C, 5 s
Elongation:	72 °C, 10 s

Mit diesem PCR Ansatz und Programm wurde auch das Housekeeping Gen *β-Globin* (4 µl 10 µM *β-Globin* Primer-Mix, Primersequenzen s. 2.9, Tabelle 10) quantifiziert, das als Referenzgen verwendet wurde.

Die relative Menge integrierter proviraler HIV-1 DNA in behandelten gegen unbehandelte Proben wurde unter Verwendung der $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ Methode (187) kalkuliert ($\Delta C_t = C_t(\text{HIV}) - C_t(\beta\text{-Globin})$; $\Delta\Delta C_t =$ Werte behandelter Proben, normalisiert auf unbehandelte Proben).

3.3.4 Quantitative Analyse relativer Level von HIV-1 Transkripten

Um den Einfluss von MAGIC Substanzen auf die HIV spezifische Transkription infizierter Zielzellen zu untersuchen, wurden HIV Transkripte mittels RTqPCR quantifiziert. In den nachfolgenden Abschnitten wird diese Methode im Detail beschrieben.

Es wurden LC5-RIC bzw. H9 Zellen, wie in 3.1.2 und 3.2.2 beschrieben, in 12-well Platten ausgesät, mit HIV-1_{LAI} inokuliert und simultan zur Inokulation behandelt. Als Referenzsubstanz wurde der experimentell genutzte Expressionsinhibitor Flavopiridol verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 48 h im Zellkulturbrutschrank, wurde die RNA aus den Zellen extrahiert.

3.3.4.1 RNA Extraktion

Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und die RNA mithilfe des RNeasy Mini Kits nach Herstellerangaben isoliert. Hierfür wurden die geernteten Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 350 µl β-Mercaptoethanolhaltigem RLT Puffer lysiert. Mithilfe des im Lysepuffer enthaltenen, höchst denaturierend wirkenden Guanidiniumthiocyanats wurden zum Schutz der zu isolierenden RNA die in der Probe enthaltenen RNasen inaktiviert. Anschließend wurden die Proben auf QIAshredder Säulen geladen und für 2 min bei 9.600 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 350 µl 70 % Ethanol gemischt, daraufhin auf eine RNeasy Mini Spin Säule pipettiert und für 15 s bei 9.600 g zentrifugiert, wodurch die RNA an der Säulenmembran bindet. Um unspezifisch gebundene Biomoleküle wie Kohlenhydrate, Proteine oder Fettsäuren von der RNA zu trennen, wurde die Säule mit 350 µl guanidiniumsalz- und ethanolhaltigen RW1 Puffer gewaschen (15 s, 9.600 g). Um die in der Probe verbliebene DNA zu entfernen, wurde die DNA durch direkte Zugabe von 80 µl DNase I Inkubationsmix (10 µl DNase I, 70 µl RDD Puffer) auf die Säule für 15 min bei ZT verdaut. Die Proben wurden erneut mit 350 µl RW1 Puffer (15 s, 9.600 g) und daraufhin zweimal mit 500 µl RPE Puffer (15 s, 9.600 g; 2 min 9.600 g) gewaschen. Um die RNA in ein frisches RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß zu eluieren, wurde die RNA unter Zugabe von 30 µl nukleasefreiem Wasser für 1 min bei 9.600 g zentrifugiert. Die RNA Konzentration wurde wie in 3.3.1 beschrieben photometrisch gemessen und die Probe bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

3.3.4.2 Synthese komplementärer cDNA

Die vorliegende RNA wurde mithilfe der SuperScript II Reverse Transkriptase nach Angaben des Herstellers in ihre komplementäre cDNA revers transkribiert. Dazu wurde 1 µg RNA mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 7 µl verdünnt, 1 µl 10 mM dNTPs und 2 µl Random

Hexameren hinzupipettiert und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach einem weiteren Inkubationsschritt von 1 min auf Eis wurden 9 µl eines Reaktionsmixes (2 µl 5x RT Puffer, 4 µl 25 mM dNTPs, 2 µl 0,1 mM DTT, 1 µl RNase OUT) zu jedem Ansatz hinzugegeben und für 2 min bei ZT inkubiert. Hiernach wurde die Reverse Transkription durch die Zugabe von 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase (50 U/µl) initiiert. Die cDNA Synthese wurde durch eine Inkubation von zuerst 10 min bei 25 °C und weiteren 50 min bei 42 °C durchgeführt. Die Reverse Transkriptase wurde durch einen Hitzeschritt für 15 min bei 70 °C inaktiviert. Die Proben wurden für mindestens 2 min bei 4 °C gekühlt, kurz abzentrifugiert und dann die verbliebene RNA mit je 0,7 µl RNase H für 20 min bei 37 °C verdaut. Die cDNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.3.4.3 Real-Time qPCR

Die Inhibition viraler Transkription wurde abschließend durch RTqPCR mithilfe eines LightCyclers analysiert. Hierfür wurde die Transkription von sowohl ungespleißten, einfach gespleißten und vollständig gespleißten HIV Transkripten als auch von „allen“ HIV Transkripten mit der RNA Polymerase II (RP II) als Referenzgen verglichen (Primersequenzen s. 2.9, Tabelle 10; Ansatzpunkte der HIV Transkript-spezifischen Primer s. Abbildung 17). Es wurde Wasser als Negativkontrolle eingesetzt. Im Folgenden sind der PCR Ansatz und das verwendete PCR Programm aufgeführt:

PCR Ansatz qPCR:

5 µl	SYBR Green I Mastermix
1 µl	fw Primer
1 µl	rv Primer
1 µl	ddH ₂ O
2 µl	1:5 verdünnte cDNA Probe

PCR Programm:

Initiale Denaturierung:	95 °C, 5 min
Periodische Amplifizierung, 45 Zyklen:	
Denaturierung:	95 °C, 10 s
Primer Annealing:	60 °C, 10 s
Elongation:	72 °C, 10 s

Die relative Menge an HIV-1 Transkripten in behandelten gegen unbehandelte Proben wurde unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode (187) kalkuliert ($\Delta C_t = C_t(\text{HIV}) - C_t(\text{RP II})$; $\Delta\Delta C_t =$ Werte behandelter Proben, normalisiert auf unbehandelte Proben).

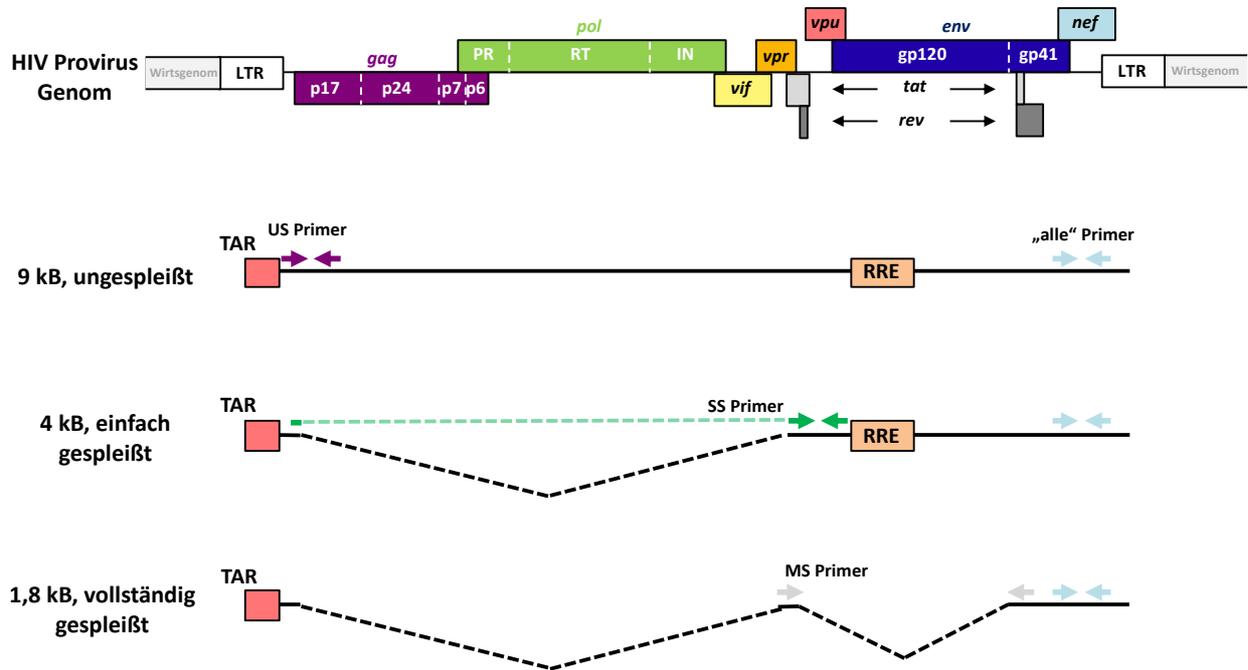


Abbildung 17. Übersicht der Ansatzpunkte aller HIV spezifischer Primer an den verschiedenen mRNA Transkripten.

Im Verlauf der Expression von HIV liegen aufgrund des extensiven alternativen Splicings viele unterschiedliche HIV Transkripte vor, die anhand ihrer Größe in drei Klassen eingeteilt werden können: 9 kB, ungespleißte (US) mRNA; 4 kB, einfach gespleißte (SS) mRNA; 1,8 kB, vollständig oder mehrfach gespleißte (MS) mRNA. Zur quantitativen Analyse der relativen Level an HIV-1 Transkripten wurde eine RTqPCR durchgeführt. Um verschiedene Transkriptspezies zu analysieren, wurden folgende Primerpaare verwendet (Primersequenzen s. 2.9, Tabelle 10): US Primer (violette Pfeile), welche durch das Binden im Anfangsbereich des *gag*-Gens ausschließlich ungespleißte Transkripte detektieren; SS Primer (grüne Pfeile), mit deren Hilfe ausschließlich einfach gespleißte mRNA Spezies amplifiziert werden. Der Forward Primer kann nur binden, wenn der *gag/pol*-Bereich durch Splicing entfernt wurde, während der Reverse Primer im *env*-Gen bindet, welches nur vorhanden ist, solange die mRNA nicht vollständig gespleißt wurde; MS Primer (graue Pfeile), welche die *Tat/Rev* Exons überspannend ansetzen und somit nur vollständig gespleißte Transkripte binden; „alle“ Primer (hellblau), welche im Bereich des *nef*-Gens binden und somit alle Transkripte detektieren.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 HIV-Reverse-Transkriptase-Aktivitäts-Assay

Um den direkten Einfluss der MAGIC Substanzen auf die HIV Reverse Transkriptase (RT) genauer zu bestimmen, wurde das kolorimetrische Reverse Transkriptase Assay Kit von Roche, Basel, Schweiz, wie vom Hersteller angegeben, durchgeführt. In Kürze, es wurden entweder je 4 ng pro Reaktion der beiliegenden, in 20 µl Assay-Lysepuffer verdünnten, rekombinanten HIV-1 RT oder 20 µl Assay-Lysepuffer ohne HIV-1 RT (Negativkontrolle) zusammen mit je 20 µl einer Reaktionsmischung (Template/Primerhybrid poly (A) x oligo (dT)₁₅, Digoxigenin- oder Biotin-markierte Nukleotide) und mit entweder 20 µl einer in Assay-Lysepuffer verdünnten 3x Testsubstanzlösung oder 20 µl reinem Assay-Lysepuffer (Positivkontrolle) vermischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die gesamte Reaktionsmischung auf eine im Kit enthaltene Streptavidin-beschichtete 96-well Platte überführt, mit Folie versiegelt und noch einmal für 1 h bei 37 °C inkubiert. Hiernach wurden die Wells fünf mal mit Waschpuffer gewaschen, 200 µl anti-DIG-POD (anti-Digoxigenin-Peroxidase) Antikörperlösung auf jede Reaktion pipettiert und erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem neuerlichen Waschschrift wurden je 200 µl einer ABTS Substratlösung für 20 min bei Raumtemperatur auf die Wells gegeben. Abschließend wurde die Absorption jedes Wells bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenzwellenlänge = 490 nm) mithilfe eines Tecan Microplate Readers gemessen.

3.4.2 HIV-Integrase-Aktivitäts-Assay

Um den direkten Einfluss der MAGIC Substanzen auf die HIV-Integrase genauer zu bestimmen, wurde das HIV-1 Integrase Assay Kit von XpressBio, Frederick, MD, USA, wie vom Hersteller empfohlen, durchgeführt. In Kürze, zuerst wurden die beiliegenden Streptavidin-beschichteten 96-well Platten mit je 100 µl einer 1x Doppelstrang-HIV-1-LTR-U5-Donorsubstrat(DS)-DNA-Lösung (mit Biotinlabel) pro Well für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Wells mit 200 µl eines Blockpuffers für weitere 30 min bei 37 °C geblockt. Hiernach wurden die Wells dreimal mit Reaktionspuffer gewaschen, bevor entweder 100 µl Reaktionspuffer (Negativkontrolle) oder 100 µl einer Vollängen-HIV-1-Integrase-Lösung (1:300 in Reaktionspuffer) zur Inkubation (30 min bei 37 °C) hinzupipettiert wurden. Die Wells wurden erneut mit Reaktionspuffer gewaschen, danach entweder 50 µl einer 2x in Reaktionspuffer verdünnten Testsubstanzlösung oder 50 µl reiner Reaktionspuffer (für Positiv- und Negativkontrolle) dazugegeben und für 5 min bei ZT inkubiert. Darauf folgend wurden 50 µl 1x Doppelstrang-Targets substrat(TS)-DNA mit 3'-Endmodifikation direkt auf die Puffer/Substanz-Lösungen gegeben

und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit katalysiert die HIV-1 Integrase eine Strang-Transfer-Rekombinationsreaktion, bei der die DS-DNA in die TS-DNA integriert wird. Die Integrationseffizienz wurde mithilfe eines HRP-(Meerrettich-Peroxidase) Antikörpers, der direkt an die TS 3'-Endmodifikation bindet, quantifiziert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurde überschüssiger Antikörper durch vermehrtes Waschen entfernt, TMB Peroxidase-substratlösung hinzupipettiert und nach genau 10 min bei ZT die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm am Tecan Microplate Reader gemessen.

3.4.3 HIV-Protease-Aktivitäts-Assay

Um den direkten Einfluss der MAGIC Substanzen auf die HIV Protease genauer zu bestimmen, wurden 100 ng rekombinanter HIV-1 Protease mit in HIV-Protease-Aktivitäts-Assay-Puffer (Zusammensetzung s. 2.8, Tabelle 9) gelöster Testsubstanz für 1 h bei ZT und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben zu 2,5 µM eines in HIV-Protease-Aktivitäts-Assay-Puffer gelösten und in einer schwarzen 96-Well Platte vorgelegten HIV Protease Substrates 1 hinzupipettiert. Die HIV Protease kann nun das Substrat proteolytisch schneiden, an das sowohl das Fluorophor EDANS (5-(2-Aminoethylamino)-1-Naphthalensulfonat) als auch das Akzeptorchromophor DABCYL (4'-Dimethylamino-azobenzol-4-Carboxylat) an gegenüberliegenden Seiten der Schnittstelle (Tyr-Pro) binden. Durch das Zerschneiden des Substrates werden DABCYL und EDANS voneinander getrennt, wodurch die Fluoreszenz von EDANS nicht mehr gequencht wird und nun bei 490 nm gemessen werden kann. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 37 °C wurde der Fluoreszenzanstieg mithilfe eines Tecan Microplate Readers gemessen (Anregungswellenlänge = 340 nm, Emissionswellenlänge = 490 nm).

3.4.4 BCA Protein Assay

Mithilfe des BCA Protein Assays kann die Proteinkonzentration in einer Lösung oder einem Zelllysat nachgewiesen werden. Zur Lyse wurden die Zellen zuerst einmal mit PBS gewaschen und anschließend 10 min bei 4 °C in Lysepuffer lysiert. Das Zelllysat wurde im Well resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, gevortext, für 20 min bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Um die Proteinkonzentration im Zelllysat zu bestimmen wurde der BCA Protein Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden je 25 µl Proteinlysat oder BSA Standard in Lysepuffer (2.000/1.500/1.000/750/500/250/125/25/0 µg/ml) in einer 96-well Platte vorgelegt und

mit je 200 µl einer Reaktionspufferlösung (Reaktionspuffer A:B im Verhältnis 50:1) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption per Tecan Microplate Reader bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration mithilfe des BSA Standards berechnet. Die Proteinlysate wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.4.5 Qualitativer Nachweis von Proteinen

3.4.5.1 SDS-PAGE

Um Proteine elektrophoretisch anhand ihrer molekularen Masse aufzutrennen, wurde eine Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese, auch SDS-PAGE genannt, durchgeführt. Aufgrund des denaturierenden Effektes von Natriumdodecylsulfat (SDS) und eines Hitzeschrittes bei 95 °C entfalten sich Proteine in ihre lineare Struktur und können so durch Anlegen eines elektrischen Feldes allein anhand der Länge ihrer Polypeptidkette aufgetrennt werden (188).

Das Gel einer SDS-PAGE besteht aus einem übereinander gegossenen Sammel- und Trenngel. Hierbei wurde mithilfe des Protean® Gelgießsystems von Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA zuerst ein Trenngel gegossen und während der Polymerisierung mit einer 1 ml Isopropanolschicht bedeckt, um Luftblasen zu vermeiden und eine gerade Kante zu gewährleisten. Nachdem das Trenngel fest geworden war, wurde das Sammelgel mit Probenkamm daraufgegossen. Die Zusammensetzung der Gele wird in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13. Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.

	15 % Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	2,3 ml	6,8 ml
30 % Acrylamid Mix	5,0 ml	1,7 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	1,25 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml

Für die SDS-PAGE werden je 3 µg Probe mit 5x Laemmli Puffer gemischt, für 3 min bei 95 °C denaturiert und in die Taschen des vorbereiteten Gels geladen. Als Proteinstandard wurden 4 µl PageRuler™ geladen. Hiernach wurde das beladene Gel in eine mit TGS Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt und die Proteine für 90 min bei 15 mA pro Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.4.5.2 Western Blot

Die durch SDS-PAGE im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Hierfür wurden vier Whatman-Paper, zwei Schwämme und eine Nitrocellulosemembran für 2 min in Towbin Puffer getränkt, bevor sie zusammen mit dem Proteingel in nachfolgender Reihenfolge auf eine Mini Trans-Blot® Zelle von Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA gestapelt wurden: Anode, Schwamm, 2x Whatman-Paper, Proteingel, Transfermembran, 2x Whatman-Paper, Schwamm, Kathode. Die Proteine wurden nun für eine Dauer von 1 h durch Anlegen einer Stromstärke von 0,4 A vom Proteingel auf die Membran übertragen.

3.4.5.3 Immunproteindetektion

Nachdem die Proteine auf die Membran übertragen worden waren, wurden diese per Immundetektion qualitativ nachgewiesen. Hierzu wurde die Membran für 1 h bei ZT in 5 % BSA in PBS-T geblockt, dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden Primärantikörper in 5 % BSA in PBS-T inkubiert (Antikörperverdünnung s. 2.10, Tabelle 11). Anschließend wurde die Membran weitere dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen, bevor sie für 1 h bei 4 °C mit Sekundärantikörper in 5 % BSA in PBS-T inkubiert wurde (Antikörperverdünnung s. 2.10, Tabelle 11). Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Membran für 1 min mit einem Luminol-basierten chemilumineszenten Pierce™ ECL Western Blotting Substrat getränkt, um anschließend das emittierte Licht der an den Sekundärantikörper gebundene HRP mittels Fusion FX Chemolumineszenz Detektor zu detektieren.

3.4.6 Quantitativer Nachweis von Proteinen

3.4.6.1 HIV-1 p24 ELISA

In dieser Arbeit wurden mithilfe des HIV-1 p24 Antigen Capture Assays (Advanced Bioscience Laboratories, Rockville, MD, USA) die intrazellulären Konzentrationen an HIV p24 in HIV inokulierten und behandelten Proben untersucht. Hierzu wurden LC5-RIC bzw. H9 Zellen, wie in 3.1.2 und 3.2.2 beschrieben, in 12-well Platten ausgesät, mit HIV-1_{LAI} inokuliert und simultan zur Inokulation mit Testsubstanzen behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h im Zellkulturbrutschrank wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und mit 200 µl 5 % Triton X-100 in PBS für 5 min bei ZT lysiert. Nachdem die Zelllysate für 5 min bei 400 g zentrifugiert

worden waren, wurden diese 1:10.000 verdünnt und zur Analyse in den HIV-1 p24 ELISA eingesetzt.

Zuerst wurden je 25 µl Disruptionspuffer zusammen mit je 100 µl der verdünnten zu analysierenden Probe oder des HIV-1 p24 Standards (100/50/25/12,5/6,25/3,125/0 pg/ml in 5 % Triton X-100/PBS) in die microELISA Platte pipettiert und mit einer Folie versiegelt für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Wells der microELISA Platte sind mit zwei murinen monoklonalen Antikörpern beschichtet, die spezifisch an das HIV-1 p24 Protein binden können. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurden Pufferreste durch sanftes Abklopfen an einem Papiertuch entfernt, je 100 µl Konjugatlösung hinzugegeben und mit frischer Folie versiegelt für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Konjugatlösung enthält einen peroxidasegelabelten humanen anti-p24 Antikörper, der an im Well gebundenes HIV-1 p24 binden kann. Nach erneutem Waschen wurden je 100 µl Peroxidase-Substrat hinzupipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert, was zu einer bläulichen Färbung der Lösung führte. Im Anschluss wurde die Reaktion mit je 100 µl Stopplösung abgestoppt (Farbumschlag zu gelb) und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mithilfe eines Tecan Microplate Readers gemessen. Aufgrund der linearen Beziehung zwischen Absorption und Menge gebundenen HIV-1 p24 konnte die p24 Konzentration in den Testproben mittels linearer Regressionsanalyse der Standardkurve ermittelt werden.

3.4.6.2 Proteomics

In dieser Arbeit wurde das intrazelluläre Proteom von HIV inokulierten und behandelten PBMC in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thomas Werner von der University of Michigan und Dr. Stefanie Hauck aus der Proteomicsabteilung des Helmholtz Zentrums München analysiert. Hierzu wurden nach 3.2.2.1 stimulierte PBMC, wie in 3.1.2 und 3.2.2 beschrieben, in 12-well Platten ausgesät, mit HIV-1_{LAI} inokuliert und simultan zur Inokulation mit Testsubstanzen behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h im Zellkulturbrutschrank wurde zum einen ein *2nd step* EASY-HIT Assay durchgeführt, um die anti-HIV Aktivität der eingesetzten Substanzen zu überprüfen (s. 3.2.4.1) und zum anderen die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und mit 300 µl Lysepuffer für 10 min bei 4 °C lysiert. Nachdem die Zellreste für 20 min bei 4 °C und 16.000 g abzentrifugiert worden waren, konnte das Proteinlysate zur weiteren Verwendung abgenommen werden. Hiernach wurde die Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay (s. 3.4.4) bestimmt und jeweils 10 µg jeder Probe mit Trypsin mithilfe einer modifizierten Filter-unterstützten Präparationsmethode (FASP) proteolysiert (189,190).

Die LC-MSMS Analyse und Auswertung wurde von Dr. Stefanie Hauck mittels QExactive HF Massenspektrometer durchgeführt, das direkt an eine Ultimate 3000 RSLC nano-HPLC gekoppelt wurde. Die Proben wurden automatisch eingespritzt und auf die C18 Fallen-Säule geladen. Nach 5 min wurden die Proben wieder eluiert und durch die C18 Analyse-Säule mittels nicht-linearem Acetonitril-Gradienten über einen Verlauf von 90 min bei einer Flussrate von 250 nl/min aufgetrennt (191). Die MS-Spektren wurden bei einer Auflösung von 60.000 aufgenommen und nach jedem MS1 Zyklus wurden die zehn häufigsten Peptidionen zur Fragmentierung ausgewählt. Die erhaltenen Rohdaten wurden jeweils separat für jeden Spender in die Progenesis Q1 Proteomicssoftware geladen und mittels MS1 Intensitäts-basierten Label-freien Quantifizierung analysiert (191). Im Anschluss wurden die MSMS Spektren exportiert und unter Verwendung der Mascot Suchmaschine (Version 2.6.2) in der SwissProt Human Datenbank, mit hinzugefügten HIV-1_{LAI} Sequenzen („spiked“, 20.221 Sequenzen), gesucht. Die Sucheinstellungen waren wie folgt: Enzym Trypsin, 10 ppm Peptidmassentoleranz und 0,02 Da Fragmentmassentoleranz, eine fehlende Schnittstelle ist erlaubt, Carbamidomethylierung wurde als fixe Modifikation angenommen, Methionin-Oxidation und Asparagin- und Glutamin-Deaminierung wurden als variable Modifikationen erlaubt. Es wurde zudem eine Mascot-integrierte Decoy-Datenbanksuche mit einer durchschnittlichen Fehlerrate von <1 % mittels Mascot percolator Algorithmus durchgeführt (192). Die den Peptiden zugewiesenen und gefundenen Daten wurden nun wieder in die Progenesis Q1 Software importiert, um hier die Abundanzen aller einzigartigen Peptide, die jedem Protein zugeordnet werden, aufzusummieren und die daraus resultierenden normalisierten Abundanzen jedes einzelnen Proteins zur Bestimmung der Regulierung der Proteine und deren Signifikanzwerte p mittels Student's t-Test und FDR Korrektur heranzuziehen.

Die bioinformatische Analyse der erhaltenen Proteomics Datensätze wurde von Prof. Dr. Thomas Werner durchgeführt. Hierbei wurden die Ergebnisse von insgesamt drei Spendern jeweils als biologische Replikate angesehen. Proteine mit signifikanten Veränderungen (≥ 2 -fache Änderung der Expression, sowohl hoch- als auch runterreguliert) wurden getrennt zusammengetragen (für jede Probe und für sowohl hoch- als auch herunterregulierte Proteine). Hiernach wurden die Proteinlisten für hoch- bzw. herunterregulierte Proteine der einzelnen Spender zusammengefasst und deren korrespondierende ENTREZ geneIDs zur weiteren Analyse herangezogen. Zusammenfassend wurden so vier Protein/Genlisten analysiert: Hoch- bzw. runterregulierte Proteine/Gene aus HIV-exponierten PBMC, sowie entsprechende Listen für PBMC ohne Anwesenheit von HIV.

Mithilfe des GeneRanker Programmes wurden Enrichmentanalysen durchgeführt und signifikante Ergebnisse anschließend unter Anwendung arbiträr ausgewählter Kategorien für *HIV*,

Retrovirusinfektion und *Immunsystem* gefiltert. Dies wurde für Analysen bezüglich GO-terms in biologischen Prozessen, kanonische Signalwege, MeSH-terms und *unigene* Geweben durchgeführt.

3.5 Statistische Auswertung

Die in dieser Dissertation aufbereiteten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Daten von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten. Alle Berechnungen wurden mithilfe von Microsoft Excel durchgeführt und anschließend mit GraphPad Prism7 und CompuSyn ausgewertet und graphisch dargestellt. IC₅₀/CC₅₀ Kalkulationen wurden unter Benutzung der Gleichung für sigmoidale Dosis-Abhängigkeit mit variabler Steigung (Bedingungen: 0 als untere, 100 als obere Grenze) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mittels One-way oder Two-way ANOVA unter Anwendung des Dunnett's Tests, sowie mithilfe eines Student's t-Tests berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen der MAGIC Substanzgruppe

Studien zur Struktur-Wirkungsbeziehung einer Substanzgruppe, auch SAR genannt, beschreiben den Zusammenhang einzelner molekularer Strukturen und deren Einfluss auf die biologische Wirkung der untersuchten Substanzen. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der durchgeführten SAR-Studien der MAGIC Substanzgruppe beschrieben.

4.1.1 Einfluss struktureller Änderungen am Molekül auf den anti-HIV Effekt

Die Molekülstruktur von Aureothin diente als Grundlage zur Generierung neuer synthetischer Derivate und zur Optimierung der chemischen und antiviralen Eigenschaften dieser Substanzen. Abbildung 18 zeigt die einzelnen Ansatzpunkte am Molekül, an denen Änderungen vorgenommen wurden. Die Nitrogruppe in para-Position des Benzolrings von Aureothin birgt Probleme hinsichtlich ihrer Pharmakotoxizität bei zukünftiger Verabreichung im Tiermodell und späteren klinischen Phasen (163). Daher wurde im Verlauf der SAR Studien versucht die Nitrogruppe ohne Verlust des antiviralen Effektes zu ersetzen. Speziell durch Substitution mit u.a. Halogenen (bspw. Substanzen #3, #4, #5), Phenyl- (Substanz #19) oder Carboxygruppen (Substanz #18) in verschiedenen Positionen (ortho/meta/para) am Benzolring (Abbildung 18-1), sowie durch Anpassung des Dien-Linkers zwischen Benzol- und Tetrahydrofuranring durch Sättigung (Substanzen #22, #23) oder Konfigurationsänderung (Substanz #33) (Abbildung 18-2) wurde versucht die chemischen Eigenschaften von Aureothin zu optimieren. Aufgrund des starken elektronenziehenden induktiven Effektes ($-I$ -Effekt) der beiden Sauerstoffatome im γ -Pyrone-Ring, sowie in der 2-Methoxygruppe („O δ^- “), bildet sich eine partielle positive Ladung am verbundenen Kohlenstoffatom („C δ^+ “), wodurch dieses als elektrophiles Zentrum für einen nukleophilen Angriff empfänglich wird. Möglicherweise könnte dies ein chemischer Ansatzpunkt für eine kovalente Bindung zu einem Targetmolekül sein. Daher wurde diese Gruppe bei manchen Molekülen (Substanzen #26-#29) durch eine Ethylgruppe ersetzt (Abbildung 18-3), wodurch der $-I$ -Effekt der Methoxygruppe verloren ginge, das elektrophile Zentrum am Kohlenstoffatom stark abgeschwächt wäre und daher die Chance für den chemischen Angriff eines möglichen Bindungspartners an dieser Stelle erschwert wäre. Im Umkehrschluss könnte sich dies womöglich auch auf die anti-HIV Aktivität der Moleküle auswirken.

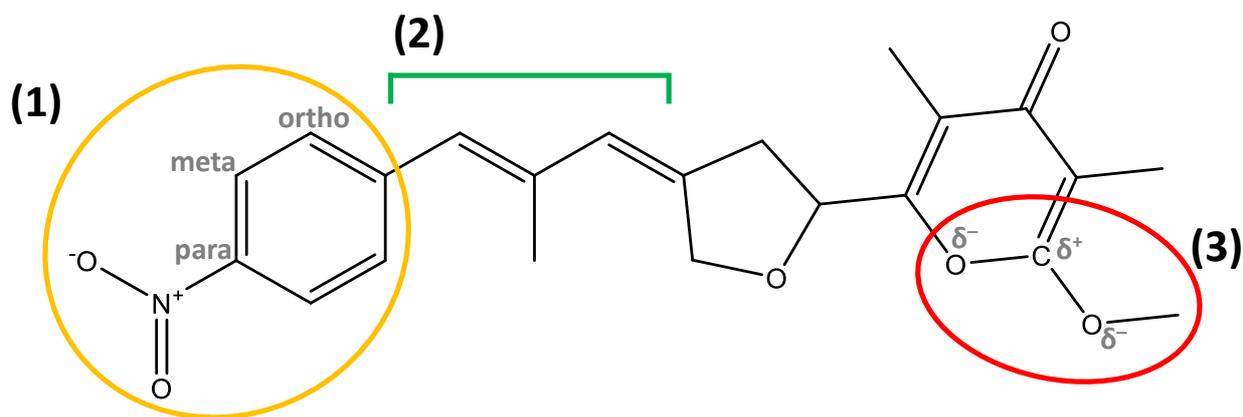


Abbildung 18. Molekülstruktur von Aureothin. Markiert sind Ansatzpunkte für mögliche molekulare Änderungen an der Strukturformel des Hauptmoleküls Aureothin: (1) Ersetzen der Nitrogruppe durch andere Substituenten in unterschiedlicher Position am Benzolring (ortho/meta/para) und mit verschiedenen chemischen Eigenschaften (bspw. Halogene, Carboxyl- oder Phenylgruppen), (2) Veränderung des Linkers zwischen Benzol- und Tetrahydrofuranring durch Sättigung der vorliegenden Doppelbindungen oder Konformationsänderung, (3) Analyse des Einflusses des elektrophilen Zentrums („C δ^+ “) im γ -Pyroneering durch Austausch der Methoxygruppe.

Das antivirale Potential von Neoaureothin (#0), Aureothin (#1) und der neu synthetisierten Aureothin-Derivate (#2-34) wurde, wie in 3.2.4 beschrieben, mithilfe des EASY-HIT Assays analysiert. In Tabelle 14 werden sowohl IC_{50} als auch IC_{90} Werte der Substanzbehandlungen von HIV-1_{LAI} inokulierten LC5-RIC Zellen und humanen PBMC nebeneinander dargestellt. Das Wirkprofil der Substanzen für das LC5-RIC Zellsystem zeigt sich in primären PBMC insgesamt bestätigt, hierbei gibt es nur leichte Schwankungen zwischen den beiden Systemen. Dieses Wirkprofil ändert sich sehr stark beim Vergleich der IC_{50} und IC_{90} Werte eines Moleküls innerhalb des jeweiligen Systems. In LC5-RIC Zellen ist der IC_{90} Wert von Substanz #3 rund 360-fach höher als der IC_{50} Wert, bei #7 beträgt dieser Unterschied lediglich den Faktor 3. Da bei der Behandlung viraler Infektionen eine Inhibition von mindestens 90 % sehr wichtig ist, werden die Substanzen vor allem anhand ihres IC_{90} Wertes im Vergleich zum Basismolekül #1 als stark (<10x IC_{90} von #1, dunkelgrün), mittel (10-25x IC_{90} von #1, grün) oder eher schwach (>25x IC_{90} von #1, hellgrün) klassifiziert.

Substanz #7 zeigt sowohl in LC5-RIC als auch in PBMC im Vergleich zu Substanz #1 die vielversprechendste anti-HIV Aktivität.

Tabelle 14. Anti-HIV Aktivität von Aureothin und dessen synthetischer Derivate in LC5-RIC und PBMC. Gezeigt sind die IC₅₀ und IC₉₀ Aktivitätswerte jeder Substanz (#), gemessen im EASY-HIT Assay mit HIV-1_{LAI} inokulierten LC5-RIC und PBMC. Mittelwert und Standardabweichung wurden jeweils aus Daten von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten berechnet (n ≥ 3; m = 3; ±SD; k.D.= keine Daten; n.d. = nicht definiert). 90 % inhibitorische anti-HIV Aktivität in LC5-RIC farbcodiert: dunkelgrün = stark, <10x IC₉₀ von Aureothin, grün = mittel, 10-25x IC₉₀ von Aureothin oder hellgrün = schwach, >25x IC₉₀ von Aureothin. Zugehörige Molekülstrukturen s. 1.2.3, Abbildung 14.

Substanz #	LC5-RIC		PBMC	
	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
0	2,2 ± 0,06	9,7 ± 0,26	1,1 ± 0,08	9,1 ± 0,71
1	5,3 ± 0,40	26,8 ± 2,54	11,7 ± 1,37	45,0 ± 3,33
2	> 10.000	n.d.	> 10.000	n.d.
3	1,6 ± 0,40	579,7 ± 14,81	0,5 ± 0,19	2.937,0 ± 983,30
4	438,6 ± 55,11	3.003,0 ± 4,73	4.021,0 ± 685,80	14.102,0 ± 6,74
5	65,1 ± 6,78	355,2 ± 52,63	561,0 ± 101,20	4.211,0 ± 4,41
6	7,3 ± 0,57	19,9 ± 4,29	14,3 ± 1,36	86,0 ± 3,06
7	4,9 ± 0,16	13,4 ± 1,75	10,3 ± 0,65	41,0 ± 1,23
8	290,1 ± 53,17	3.525,0 ± 6,20	48,7 ± 9,65	587,6 ± 148,20
9	236,8 ± 39,71	1.425,0 ± 6,75	1.261,0 ± 107,80	3.939,0 ± 3,66
10	98,6 ± 10,13	272,6 ± 68,77	959,3 ± 222,60	8.411,0 ± 5,34
11	1.045,0 ± 150,20	8.053,0 ± 5,03	> 10.000	n.d.
12	8,0 ± 1,05	73,7 ± 6,22	1,5 ± 0,11	74,0 ± 0,87
13	5,8 ± 0,50	30,1 ± 4,72	3,6 ± 1,54	1.818,0 ± 3,29
14	12,8 ± 0,97	54,3 ± 3,48	22,4 ± 1,10	74,1 ± 2,42
15	8,8 ± 0,86	69,7 ± 5,60	40,1 ± 3,76	242,2 ± 3,20
16	94,2 ± 9,97	612,1 ± 2,85	74,9 ± 10,92	269,8 ± 3,84
17	513,8 ± 40,91	2.938,0 ± 2,67	4.080,0 ± 1.073,00	141.326,0 ± 3.378,00
18	1.060,0 ± 67,78	5.915,0 ± 2,51	10.754,0 ± 2.231,00	240.907,0 ± 2.155,00
19	32,0 ± 2,22	151,2 ± 3,51	53,9 ± 3,51	463,5 ± 2,80
20	30,9 ± 3,70	367,1 ± 5,34	41,7 ± 11,02	485,2 ± 4,14
21	11,7 ± 1,38	163,8 ± 4,52	14,6 ± 0,98	189,2 ± 0,82
22	143,1 ± 12,49	475,1 ± 41,47	k.D.	k.D.
23	740,1 ± 70,82	2.476,8 ± 237,00	k.D.	k.D.
24	16,5 ± 1,18	100,6 ± 7,21	k.D.	k.D.
25	49,2 ± 4,55	274,9 ± 25,40	k.D.	k.D.
26	> 10.000	n.d.	k.D.	k.D.

Substanz #	LC5-RIC		PBMC	
	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
27	11,0 ± 1,30	154,2 ± 18,27	k.D.	k.D.
28	4,4 ± 0,63	31,9 ± 4,56	k.D.	k.D.
29	38,0 ± 6,47	244,0 ± 41,57	k.D.	k.D.
30	88,0 ± 9,63	184,1 ± 20,13	k.D.	k.D.
31	58,9 ± 2,71	175,9 ± 8,10	k.D.	k.D.
32	16,2 ± 0,75	48,0 ± 2,24	31,0 ± 2,29	107,7 ± 7,98
33	60,6 ± 4,13	213,8 ± 14,54	k.D.	k.D.
34	73,0 ± 7,64	594,4 ± 62,15	k.D.	k.D.

Nachfolgend wird der Einfluss einzelner Molekülstrukturen auf die anti-HIV Aktivität von Substanzen mit Änderungen an der entsprechenden Position im Detail vergleichend dargestellt.

4.1.1.1 Einfluss verschiedener Substituenten am Benzolring auf die anti-HIV Aktivität

Um die negativen Eigenschaften der Nitrogruppe von Aureothin (#1) aufzuheben, wurden Moleküle designt, bei denen es zu einem direkten Austausch des Substituenten in para-Position der Benzylgruppe kommt. Abbildung 19 zeigt eine beispielhafte Übersicht dieser neuen Derivate mit ihren jeweiligen IC₉₀ Konzentrationen. Der Austausch der Nitrogruppe durch Halogensubstituenten, wie die Trifluormethylgruppe von Substanz #7 (IC₉₀ = 13,4 nM) oder Substituenten, die das aromatische System erweitern, wie bei der Phenylgruppe von #19 (IC₉₀ = 151,2 nM) oder der Dimethylaminogruppe von #21 (IC₉₀ = 163,8 nM), führt zu Derivaten, deren anti-HIV Effekt mit dem von Aureothin (#1) vergleichbar, im Falle von #7 sogar leicht stärker ist. Allerdings resultiert eine Substitution in para-Position durch die sterisch anspruchsvolle *tert*-Butylgruppe (#9; IC₉₀ = 1.425 nM) oder stark polaren Gruppen, wie Carboxyl- (#18; IC₉₀ = 5.915 nM) oder Methylsulfonamidresten (#11; IC₉₀ = 8.053 nM), zu einer drastischen Verschlechterung der antiviralen Eigenschaften des Moleküls.

Am Beispiel von Substanz #7 sieht man, dass es möglich ist, die pharmakotoxisch problematische Nitrogruppe ohne Verlust des anti-HIV Effektes zu ersetzen.

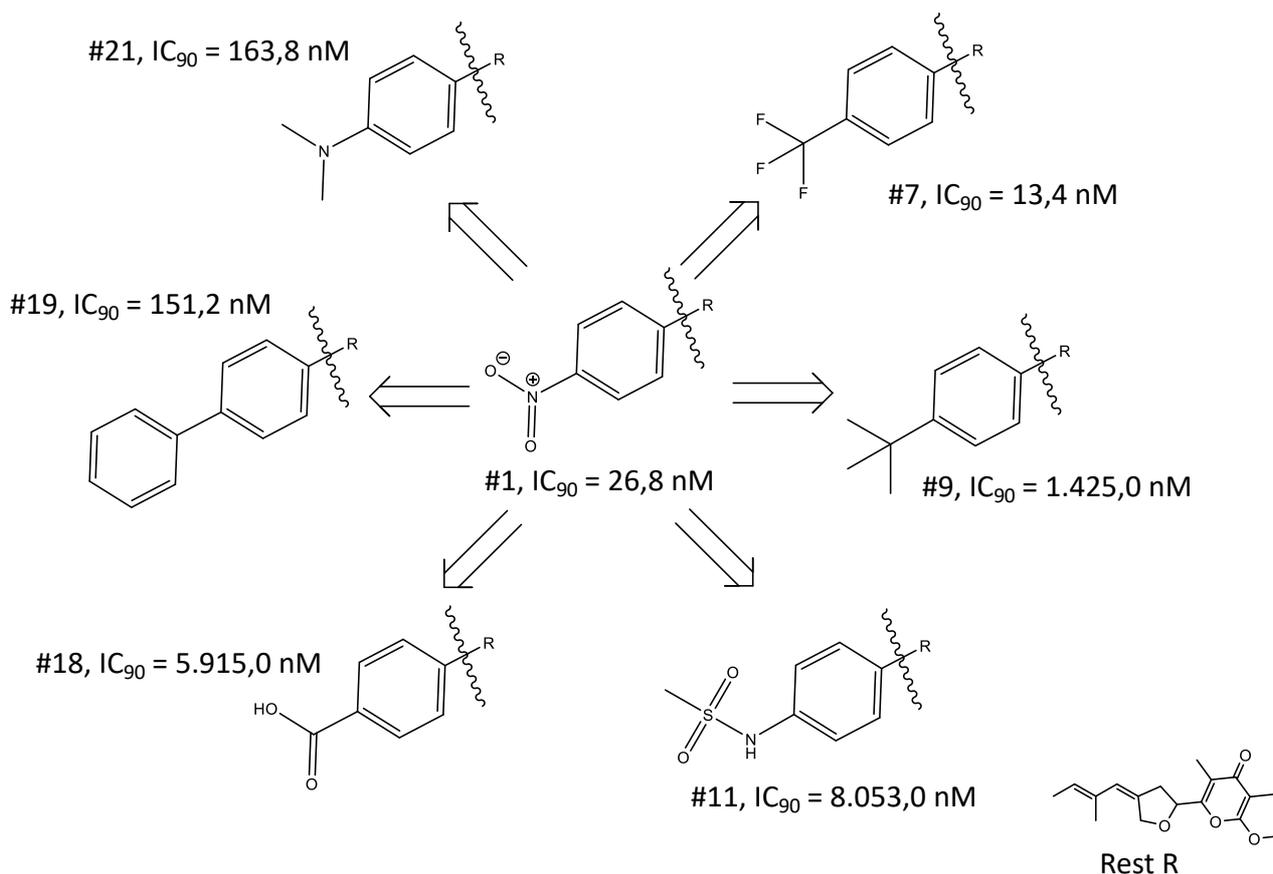


Abbildung 19. Einfluss verschiedener Substituenten in para-Position des Benzolrings auf die anti-HIV Aktivität. Gezeigt sind die vereinfachten Strukturformeln von Aureothin (#1), sowie von Aureothin-Derivaten (#7, #9, #11, #18, #19, #21) unterschiedlicher antiviraler Aktivität (IC₉₀), bei denen die Nitrogruppe durch Substitution in para-Position des Benzolrings ersetzt wurde.

4.1.1.2 Einfluss der Position der Substituenten am Benzolring auf die anti-HIV Aktivität

Um herauszufinden, ob eine Veränderung des Moleküls in para-Position des Benzolrings die optimalste Lösung darstellt, wurden Aureothin-Derivate entworfen, die den gleichen Substituenten an unterschiedlichen Positionen des Benzylrestes tragen. Wie in Abbildung 20 vergleichend dargestellt, zeigen Derivate mit Chlorsubstituent in para- (#3; IC₉₀ = 580 nM) oder ortho-Stellung (#5; IC₉₀ = 355 nM) vergleichbare, eher mittlere anti-HIV Aktivitäten (s. Tabelle 14, mittel, 10-25x IC₉₀ von Aureothin), während die Aktivität von Substanz #4 (IC₉₀ = 3.003 nM; s. Tabelle 14, schwach, >25x IC₉₀ von Aureothin), bei der sich Chlor in meta-Position befindet, 6-8-fach schwächer wird. Im Vergleich zur Substitution mit Chlor, bei der die IC₉₀ Konzentrationen allgemein recht hoch sind, zeigen Substanzen mit Trifluormethylrest in meta- (#15; IC₉₀ = 69,7 nM) bzw. para-Stellung (#7; IC₉₀ = 13,4 nM) insgesamt eine stärkere anti-HIV Wirksamkeit, jedoch ist auch hier das para- 5-fach wirksamer als das meta-Derivat.

Insgesamt sind ortho- und para-Substitution am Benzolring gegenüber des gleichen Substituenten in meta-Stellung favorisiert.

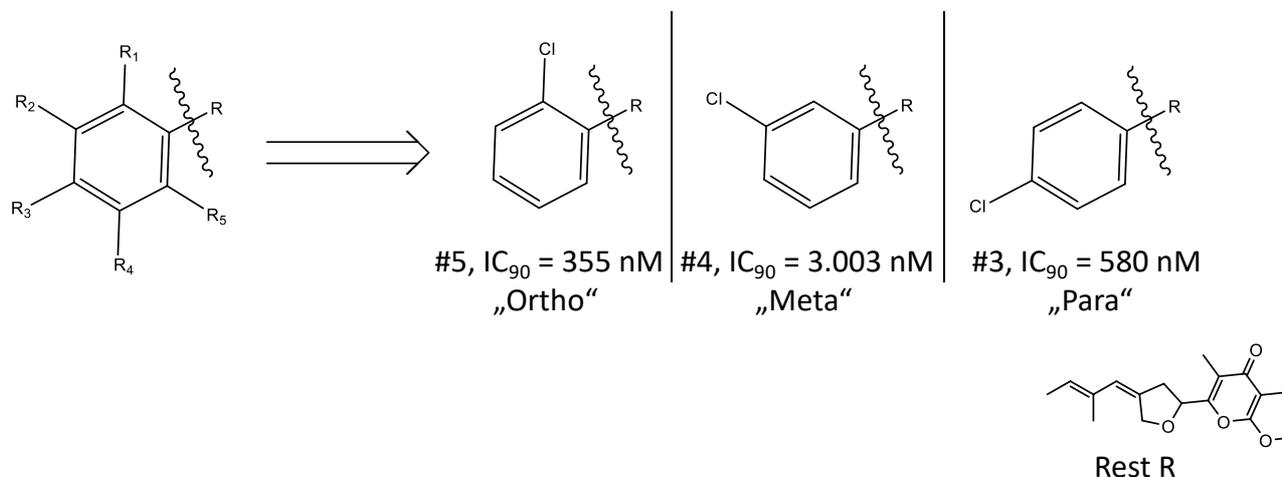


Abbildung 20. Einfluss gleicher Substituenten an verschiedenen Positionen am Benzolring auf die anti-HIV Aktivität.

Gezeigt sind die vereinfachten Strukturformeln und die antiviralen Aktivitäten (IC_{90}) der Aureothin-Derivate #3, #4 und #5. Diese unterscheiden sich lediglich in der Position des Chlor-Substituenten am Benzolring: #5, R_1 oder R_5 /ortho, #4, R_2 oder R_4 /meta und #3, R_3 /para.

4.1.1.3 Einfluss des aromatischen Systems und Linkers auf die anti-HIV Aktivität

Der Dien-Linker zwischen Benzol- und Tetrahydrofuranring von Aureothin (#1) weitet das aromatische π -Elektronensystem über den Benzylrest hinaus aus und verleiht dem Molekül ein relativ starres Rückgrat. Im Verlauf der SAR Studien wurde unter anderem die antivirale Aktivität von Substanzen getestet, deren Flexibilität durch teilweise oder vollständige Sättigung dieser Achse erhöht wurde. Abbildung 21 gibt eine Übersicht über die chemischen Änderungen der Aureothin-Derivate im Bereich des Linkers und die daraus resultierende anti-HIV Wirksamkeit dieser Substanzen. Bei Substanz #22 ($IC_{90} = 475,1 \text{ nM}$) wurde das aromatische System durch Sättigung der zum Benzolring nächsten Doppelbindung auf die Benzylgruppe begrenzt und gleichzeitig die Flexibilität des Rückgrats leicht erhöht, wobei bei Substanz #23 ($IC_{90} = 2.476,8 \text{ nM}$) der Linker vollständig gesättigt und somit voll beweglich vorliegt. In beiden Fällen nimmt die antivirale Aktivität im Vergleich zu Substanz #1 20- bzw. 100-fach ab. Im Gegensatz hierzu steht Substanz #32 ($IC_{90} = 48,0 \text{ nM}$), ein Nebenprodukt des Syntheseprozesses von #14. Ausgestattet mit einer durch die Dreifachbindung sehr starren Achse, zeigt diese Substanz ungefähr die gleiche antivirale Aktivität wie das Endprodukt #14 ($IC_{90} = 54,0 \text{ nM}$) und ist nur 1,9-fach schwächer als der Naturstoff Aureothin (#1).

Zusammenfassend zeigen Aureothin-Derivate mit starrem Linker und mit einem auf den Linker ausgeweiteten π -Elektronensystem im Vergleich zu Molekülen mit flexiblem Rückgrat eine deutlich höhere anti-HIV Wirksamkeit.

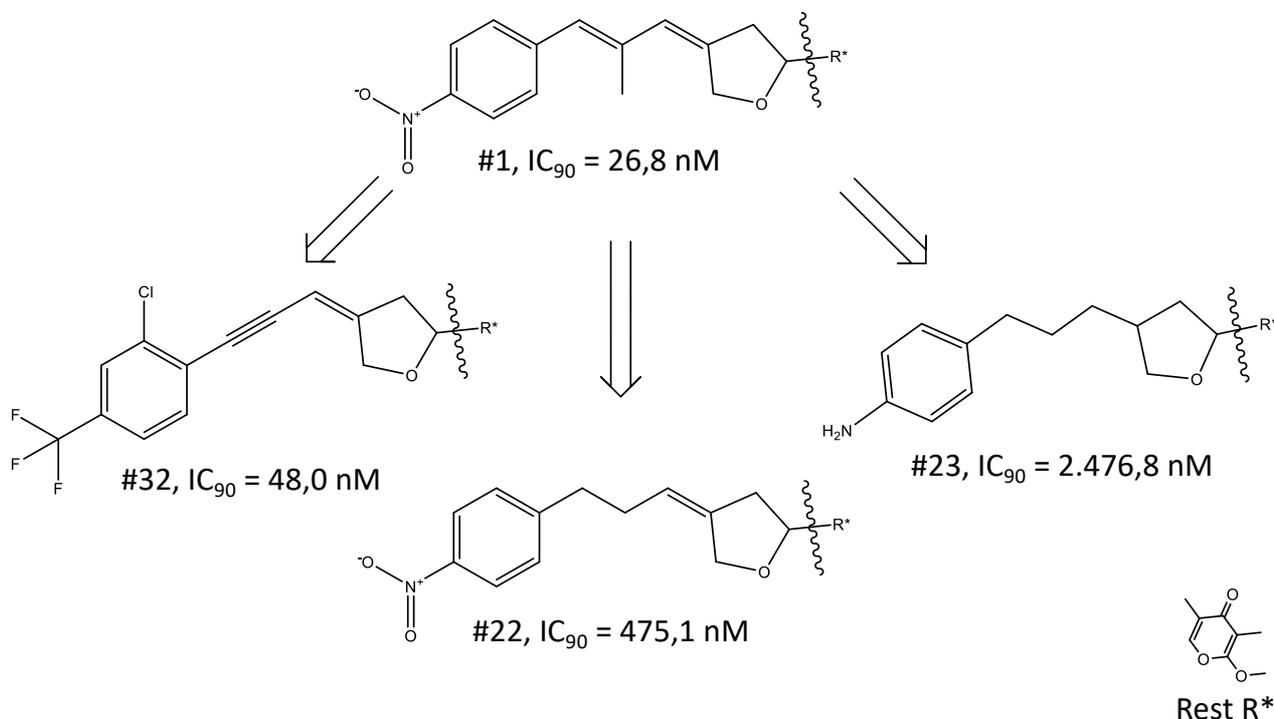


Abbildung 21. Einfluss der Sättigung und Flexibilität des Linkers auf die anti-HIV Aktivität. Gezeigt sind die vereinfachten Strukturformeln und die antiviralen Aktivitäten (IC_{90}) von Aureothin (#1), sowie von Aureothin-Derivaten (#22, #23, #32), bei denen im Vergleich zu Aureothin (#1) die Flexibilität des Linkers durch eine Dreifachbindung (#32) erniedrigt bzw. durch teilweise (#22) oder vollständige Sättigung (#23) erhöht vorliegt.

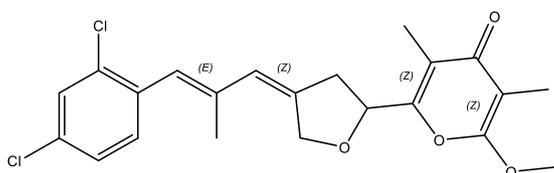
4.1.1.4 Einfluss der Konfigurationsisomerie auf die anti-HIV Aktivität

Anhand der Strukturformeln beinahe aller Aureothin-Derivate lassen sich, mit Ausnahme der verkürzten Substanzbausteine #2 und #26 und der Substanzen #22, #23 und #32, insgesamt vier Stereoisomeriezentren ablesen. Es befinden sich je zwei Isomeriezentren im γ -Pyroneering, immer in *Z/cis* Konfiguration, sowie je zwei im Linker zwischen Benzol- und Tetrahydrofuranring, die je nach Substanz unterschiedlich vorliegen.

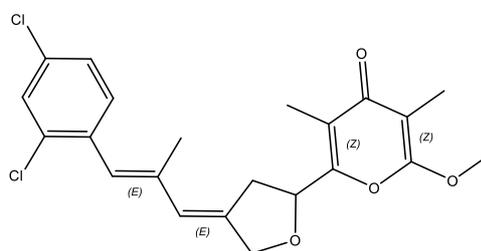
Das dem Tetrahydrofuranring zugewandte Isomeriezentrum im Linker wurde im Verlauf der SAR Studien genauer beleuchtet, da eine Konfigurationsänderung an dieser Stelle zu einer starken Veränderung des gesamten Moleküls führt. In *Z/cis* Konfiguration, wie sie auch bei Aureothin (#1) vorliegt, lässt sich die Molekülstruktur als eher linear beschreiben, in *E/trans* Konfiguration als eher gekrümmt. In Abbildung 22 werden jeweils Aureothin-Derivate gleicher Summenformel, jedoch unterschiedlicher Konfigurationsisomerie gegenübergestellt und anhand ihrer antiviralen Aktivität

verglichen. Die beiden Substanzen #13 ($IC_{90} = 30,1 \text{ nM}$) und #28 ($IC_{90} = 31,9 \text{ nM}$) liegen aufgrund ihrer *Z/cis* Konfiguration linear vor und weisen im Vergleich zu ihren eher gekrümmt vorliegenden *E/trans* Äquivalenten #33 ($IC_{90} = 213,8 \text{ nM}$) und #29 ($IC_{90} = 244,0 \text{ nM}$) in beiden Fällen eine rund 7-8-fach niedrigere IC_{90} Konzentration und somit höhere anti-HIV Wirksamkeit auf.

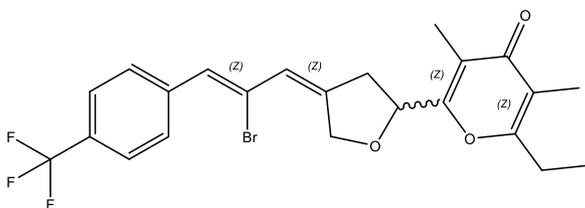
Insgesamt sind Aureothin-Derivate in *Z/cis* Konfiguration am Tetrahydrofuran nahen Stereoisomeriezentrum und somit in ihrer eher linearen Form deutlich antiviral wirksamer als ihre *E/trans* Äquivalente.



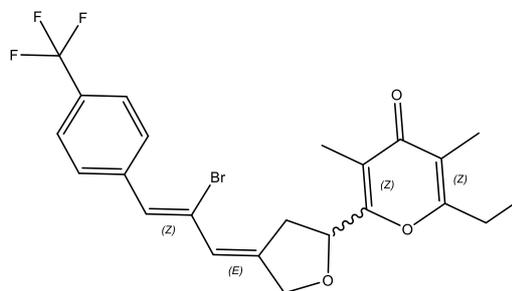
#13, $IC_{90} = 30,1 \text{ nM}$



#33, $IC_{90} = 213,8 \text{ nM}$



#28, $IC_{90} = 31,9 \text{ nM}$



#29, $IC_{90} = 244,0 \text{ nM}$

Abbildung 22. Einfluss der Konfigurationsisomerie auf die anti-HIV Aktivität. Gegenüber gestellt sind die Strukturformeln und die antiviralen Aktivitäten (IC_{90}) von Aureothin-Derivaten mit gleicher Summenformel, aber unterschiedlicher Konfigurationsisomerie (#13 und #33, #28 und #29). *E/trans* und *Z/cis* kennzeichnen die Ausrichtung der Stereoisomeriezentren. Die mit gelbem Strich markierten Molekülschemata am oberen Rand veranschaulichen die aus der Konfigurationsisomerie resultierende Ausrichtung der Moleküle (linear, gekrümmt).

4.1.1.5 Einfluss des elektrophilen Zentrums im γ -Pyronring auf die anti-HIV Aktivität

Wie in 4.1.1 bereits erwähnt, entsteht durch die negativen induktiven Effekte der Sauerstoffatome im γ -Pyronring des Moleküls, sowie des 2-Methoxysubstituenten ein elektrophiles Zentrum am verbundenen C-Atom, das der Theorie nach für nukleophile Angriffe empfänglich wäre (193). Deswegen stellte sich die Frage, ob diese Position am γ -Pyronring ein möglicher Angriffspunkt zur Bindung an ein Targetmolekül sein könnte. Um den Einfluss des elektrophilen Zentrums auf die anti-HIV Aktivität der MAGIC Substanzen zu untersuchen, wurden im Zuge der SAR Studien Moleküle synthetisiert, die eine Ethylgruppe anstelle des Methoxyrestes tragen. Aufgrund der mangelnden Elektronegativität der Ethylgruppe, geht der elektronenziehende $-I$ -Effekt verloren und das elektrophile Zentrum wird geschwächt, wodurch kein nukleophiler Angriff eines Bindungspartners mehr möglich sein sollte.

Die Strukturformeln, sowie die anti-HIV Effekte der Ethyl- und ihrer entsprechenden Methoxyäquivalente werden in Abbildung 23 vergleichend dargestellt. Substanz #2 und das Ethyläquivalent #26 sind beide bis 10 μ M inaktiv und zeigen daher keinen Unterschied. Alle anderen Substanzen sind antiviral wirksam und lassen daher Schlussfolgerungen zu. Während beim Substanzpaar #29 ($IC_{90} = 244,0$ nM) und #30 ($IC_{90} = 184,1$ nM) die anti-HIV Wirksamkeit des Ethylderivates im Vergleich zum Methoxyderivat nur unbedeutend (1,3-fach) schwächer ist, verliert Substanz #27 ($IC_{90} = 154,2$ nM) gegenüber seines Methoxyäquivalentes #7 ($IC_{90} = 13,2$ nM) deutlich (11,5-fach) an Aktivität.

Zusammenfassend zeigt der Austausch der Methoxygruppe am γ -Pyronring durch einen Ethylrest und dem damit einhergehenden Verlustes des elektrophilen Zentrums am verbundenen Kohlenstoffatom je nach Gesamtstruktur der untersuchten Moleküle einen mäßigen Einfluss auf die anti-HIV Wirksamkeit, jedoch teilweise mit Tendenz hin zum Verlust des antiviralen Effektes.

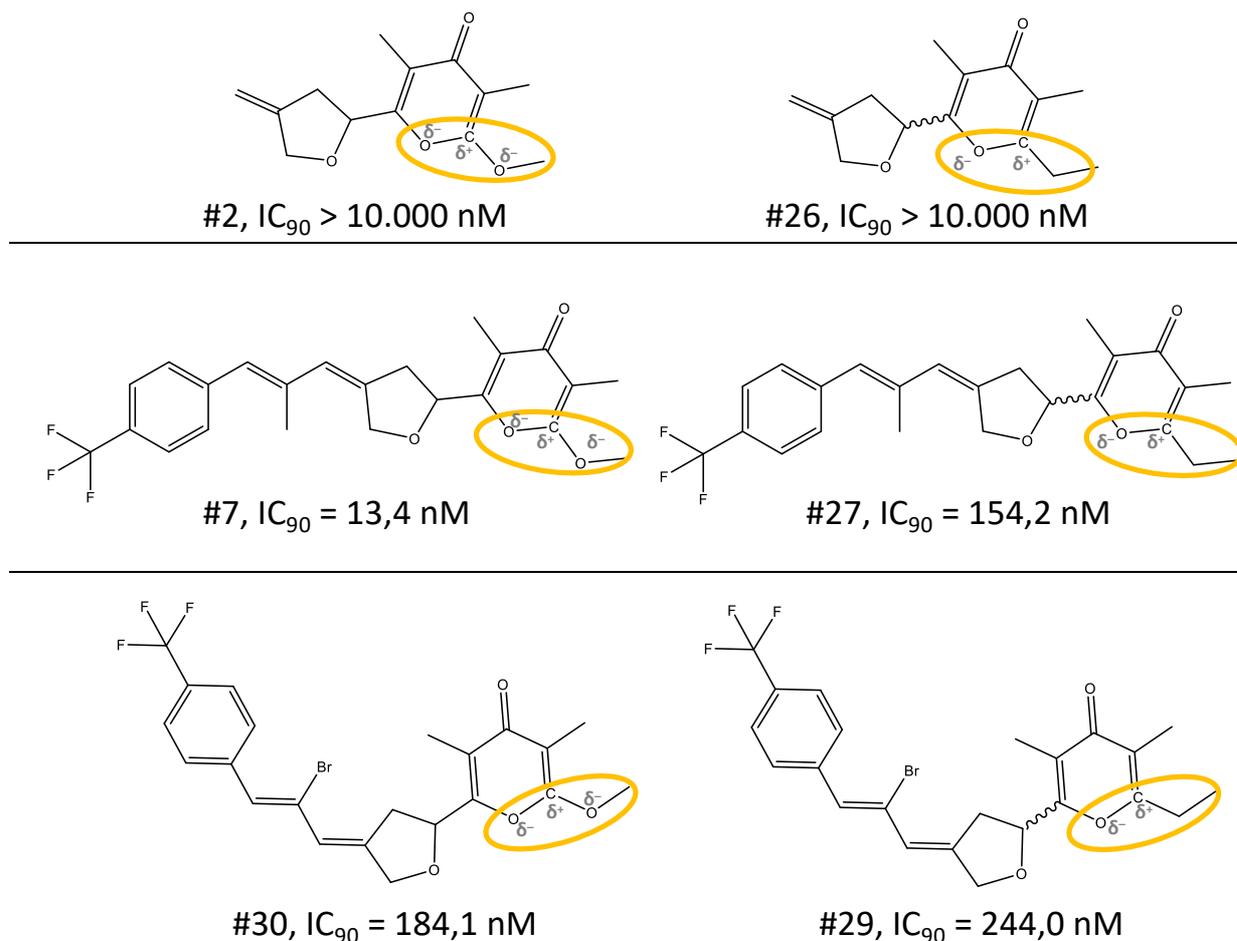


Abbildung 23. Einfluss des elektrophilen Zentrums im γ -Pyroneing auf die anti-HIV Aktivität. Gezeigt sind die Strukturformeln und die antiviralen Aktivitäten (IC_{90}) von Aureothin-Derivaten mit Methoxygruppe am γ -Pyroneing (links; #2, #7, #30), sowie deren Äquivalente mit Ethyl- statt Methoxygruppe (rechts; #26, #27, #29). Die gelbe Ellipse markiert Methoxy- bzw. Ethylrest des Moleküls, sowie das damit verbundene partial positiv geladene Kohlenstoffatom und elektrophile Zentrum („C δ^+ “).

4.1.2 Einfluss struktureller Änderungen auf die Photostabilität der MAGIC

Substanzgruppe

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Ausgangssubstanzen Neoaureothin (#0) und Aureothin (#1) werden in der Literatur als sehr photolabil beschrieben (162), weswegen im Verlauf der SAR Studien der Einfluss struktureller Änderungen auf die Photostabilität der einzelnen Aureothin-Derivate anhand ihrer nach Belichtung verbliebenen anti-HIV Wirksamkeit genauer untersucht wurde.

Alle Substanzen wurden, wie in 3.2.5 beschrieben, für 24 h beleuchtet und deren verbliebene anti-HIV Aktivität im Vergleich zu einer Dunkelkontrolle bestimmt (Abbildung 24). Die geringe Photostabilität von #0 und #1 wurde bestätigt, #1 verliert nach 24 h Beleuchtung bis zu 90 % seiner

antiviralen Aktivität. Das Photostabilitätsprofil der Aureothin-Derivate stellt sich als sehr divers heraus. Einerseits verlieren einige Substanzen, darunter #10, #16-18, #21 und #30 jeweils mehr als 50 % ihrer anti-HIV Wirksamkeit. Andererseits zeigen die meisten anderen Substanzen eine sehr hohe Photostabilität auf, darunter auch die hochwirksamen Derivate #7, #14 und #15.

Unter den photostabilen Derivaten befinden sich sowohl antiviral stark- als auch schwachwirksame Substanzen, wodurch keine Rückschlüsse auf einen strukturellen Zusammenhang zwischen Photostabilität und anti-HIV Aktivität gezogen werden können.

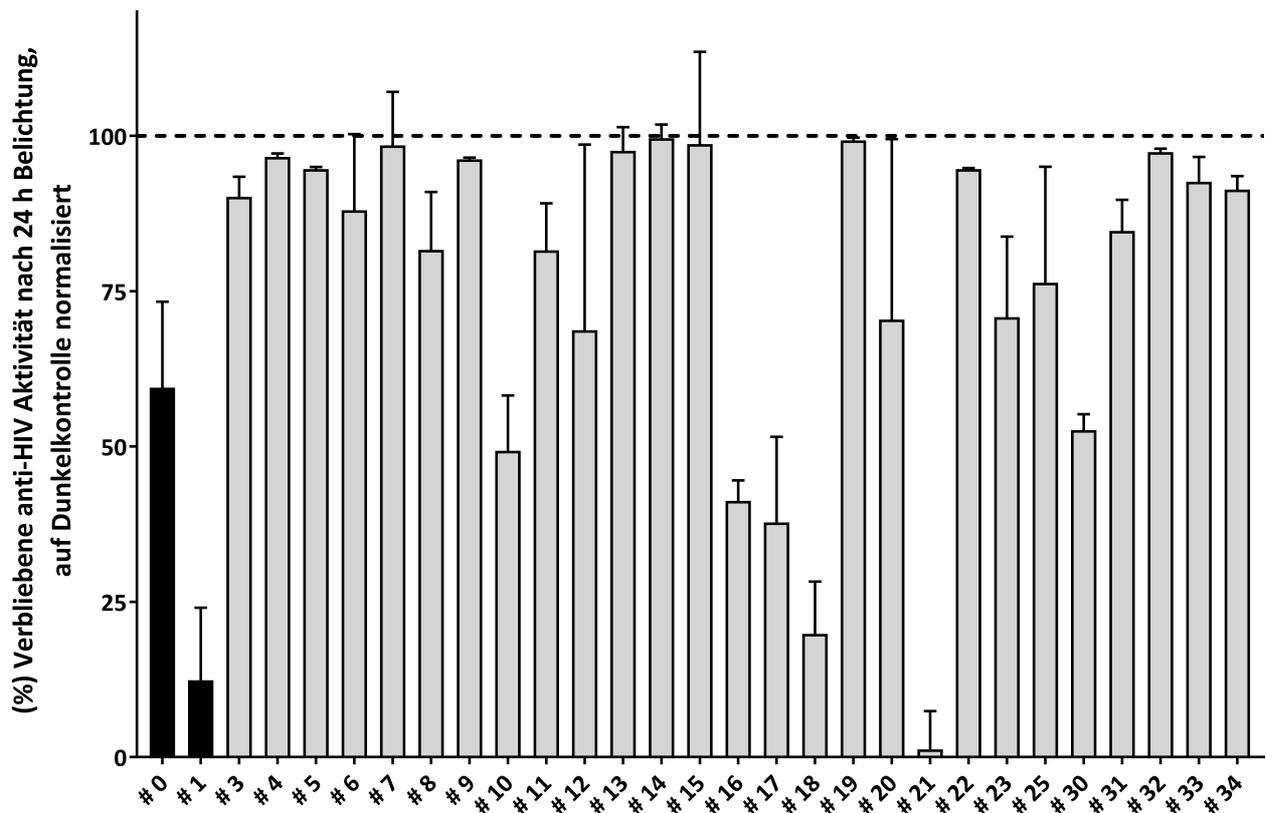


Abbildung 24. Photostabilitätsprofil der anti-HIV Aktivität synthetischer Aureothin-Derivate. Dargestellt ist die Photostabilität als Anteil (%) verbliebener anti-HIV Aktivität nach 24 h Belichtung, normalisiert auf die jeweils unbelichtete Dunkelkontrolle. Die antivirale Aktivität wurde durch Quantifizierung der Produktion infektiöser Viruspartikel in HIV-1_{LAI} inokulierten und simultan zur Inokulation mit IC₉₀ Konzentrationen behandelten LC5-RIC Zellen bestimmt. Die schwarzen Balken zeigen Daten für Neoaureothin (#0) und Aureothin (#1), Aureothin-Derivate werden in grau dargestellt. Die schwarz-gestrichelte Linie markiert 100 % verbliebener anti-HIV Aktivität. Gezeigt sind sowohl Mittelwert als auch Standardabweichung aus Daten von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten ($n \geq 3$; $m = 3$; $\pm SD$).

4.1.3 Einfluss struktureller Änderungen auf die Zytotoxizität der MAGIC Substanzgruppe

Um den Einfluss möglicher zytotoxischer Effekte von Aureothin (#1) und dessen Derivaten auf die anti-HIV Wirksamkeit in PBMC und LC5-RIC Zellen zu untersuchen, wurden insgesamt drei verschiedene Assays, wie in 3.1.3 beschrieben, durchgeführt, die allgemein zur Evaluierung von unerwünschten zellulären Nebeneffekten anerkannt sind (181): CellTox™ Green, CellTiter-Blue® und CellTiter-Glo®. Tabelle 15 zeigt die jeweiligen 50 % zytotoxischen Konzentrationen (CC_{50}) aller Substanzen, sowie deren Selektivitätsindices in PBMC. Tabelle A2 (s. 7.4 im Anhang) beschreibt die Vergleichswerte nach Behandlung von LC5-RIC Zellen.

Der Naturstoff Aureothin (#1) weist vor allem in PBMC im CellTiter-Glo® Assay ($CC_{50} = 2.271$ nM) zytotoxische Effekte auf, was zu einem Selektivitätsindex (CC_{50}/IC_{50}) von rund 194 führt, bezogen auf den CellTiter-Glo® Assay. Keine der hochwirksamen Substanzen zeigt zytotoxische Effekte bis 10 μ M, weder in PBMC noch in LC5-RIC Zellen. Im Vergleich zu Substanz #1 liegt der Selektivitätsindex des hochwirksamen Aureothin-Derivates #7 in PBMC daher bei >970.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass das Ersetzen der Nitrogruppe am Benzolring von Aureothin zu einer Verbesserung des zellulären Nebenwirkungsprofils führt.

Tabelle 15. Zytotoxizität von Aureothin und dessen synthetischer Derivate in PBMC Zellen. Gezeigt sind die Konzentrationen halbmaximaler Toxizität (CC_{50}) jeder Substanz (#) nach 48 h Behandlung, ermittelt durch drei verschiedene Toxizitätsassays: CellTox™ Green, CellTiter-Blue® und CellTiter-Glo®. Mittelwert und Standardabweichung wurden jeweils aus Daten von drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten berechnet ($n = 3$; $m = 3$; $\pm SD$; n.d.= nicht definiert). Der Selektivitätsindex ergibt sich aus dem Quotienten des CC_{50} des CellTiter-Glo® Assays, sowie des IC_{50} aus Tabelle 14. Zugehörige Molekülstrukturen s. 1.2.3, Abbildung 14.

Substanz #	CellTox™ Green Assay CC_{50} (nM)	CellTiter-Blue® Assay CC_{50} (nM)	CellTiter-Glo® Assay CC_{50} (nM)	Selektivitätsindex CC_{50}/IC_{50}
0	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 9.000
1	> 10.000	> 10.000	2.271	194
2	> 10.000	> 10.000	> 10.000	n.d.
3	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 20.000
4	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 2,5
5	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 18
6	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 700
7	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 970
8	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 200
9	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 8
10	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10
11	> 10.000	> 10.000	> 10.000	n.d.
12	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 6.600
13	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 2.800
14	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 450
15	> 10.000	> 10.000	2.242	56
16	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 105
17	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 2,5
18	> 10.000	> 10.000	> 10.000	n.d.
19	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 185
20	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 240
21	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 685

4.1.4 Wahl der Leitsubstanz

Basierend auf den vorangegangenen SAR Studien wurden die Eigenschaften der Substanzen #0-21 bezüglich ihrer anti-HIV Aktivität, Toxizität und Photostabilität vergleichend gegenübergestellt (Tabelle 16), um aus dieser Auswahl eine Leitsubstanz für alle weiterführenden Experimente abzuleiten und die daraus hervorgehende detaillierte Charakterisierung der MAGIC Substanzklasse in Bezug auf den antiviralen Wirkstoffmechanismus, sowie die Wirkung gegen andere Virustypen und die Wirkung im Zusammenspiel mit bereits zugelassenen Wirkstoffen experimentell durchzuführen. Um diese Auswahl treffen zu können, wurden in jeder Kategorie (anti-HIV Aktivität, Toxizität, Photostabilität) entsprechende Grenzwerte festgelegt. Die anti-HIV Aktivität darf sowohl in IC_{50} , als auch IC_{90} nicht mehr als 10x schwächer sein als die Aktivität der Ausgangssubstanz Aureothin (#1). Der CC_{50} -Wert der Toxizität muss >10.000 nM sein. Bei der Photostabilität lag der Grenzwert bei mindestens 95 % verbliebener anti-HIV Aktivität nach 24 h Belichtung (= „Ja“). Um als mögliche Leitsubstanz in Betracht gezogen werden zu können, mussten die entsprechenden Grenzwerte in jeder Kategorie erreicht werden. Wie in Tabelle 16 zu sehen, standen nach Auswertung aller Kategorien nur die Substanzen #7 und #14 als Leitsubstanz zur Auswahl. Beide Substanzen wirken sehr stark antiviral, sind bis zu den angegebenen Konzentrationen nicht toxisch für die Zellen und zeigen keinerlei Photolabilität nach Belichtung.

Um die Entscheidung zwischen den Substanzen #7 und #14 fällen zu können, wurden weitere, in dieser Dissertation nicht aufgeführte Daten - da von der Fremdfirma Bienta erhoben - zur ADME der Substanzen herangezogen. Hierbei wurden Caco-2 Permeabilität, Plasmaproteinbindung, Plasmaproteininstabilität, Stabilität in Lebermikrosomen, sowie die Bindung an hERG Rezeptoren *in vitro* genauer analysiert (147,194). Die Entscheidung fiel aufgrund einer 15x besseren Caco-2 Permeabilität und einer geringeren hERG-Bindung zu Gunsten von Substanz #7 als Leitsubstanz für alle weiteren Experimente aus.

Tabelle 16. SAR - Vergleich der anti-HIV Aktivität, Toxizität und Photostabilität zur Wahl der Leitsubstanz. Gezeigt sind die IC₅₀ und IC₉₀ Aktivitätswerte der Substanzen #0-21, gemessen im EASY-HIT Assay mit HIV-1_{LAI} inokulierten PBMC, sowie deren CC₅₀ im CellTiterGlo® Assay und Photostabilität (ja: >95 % verbliebene anti-HIV-Aktivität nach 24 h Belichtung; nein: <95 % verbliebene anti-HIV Aktivität nach 24 h Belichtung). Grün markierte Felder zeigen an, ob die Substanz in entsprechender Kategorie als Leitsubstanz in Frage kommt. Auswahlkriterien: Anti-HIV Aktivität IC₅₀/IC₉₀ ≤10x Aureothin; Toxizität CC₅₀ >10.000 nM; Photostabilität „ja“. Zugehörige Molekülstrukturen s. 1.2.3, Abbildung 14.

Substanz #	Anti-HIV Aktivität in PBMC IC ₅₀ (nM)	Anti-HIV Aktivität in PBMC IC ₉₀ (nM)	Toxizität im CellTiter-Glo® Assay CC ₅₀ (nM)	Photostabilität Ja: >95 % Nein: <95 %
0	1,1 ± 0,08	9,1 ± 0,71	> 10.000	Nein
1	11,7 ± 1,37	45,0 ± 3,33	2.271	Nein
2	> 10.000	n.d.	> 10.000	Nein
3	0,5 ± 0,19	2.937,0 ± 983,30	> 10.000	Nein
4	4.021,0 ± 685,80	14.102,0 ± 6,74	> 10.000	Ja
5	561,0 ± 101,20	4.211,0 ± 4,41	> 10.000	Nein
6	14,3 ± 1,36	86,0 ± 3,06	> 10.000	Nein
7	10,3 ± 0,65	41,0 ± 1,23	> 10.000	Ja
8	48,7 ± 9,65	587,6 ± 148,20	> 10.000	Nein
9	1.261,0 ± 107,80	3.939,0 ± 3,66	> 10.000	Ja
10	959,3 ± 222,60	8.411,0 ± 5,34	> 10.000	Nein
11	> 10.000	n.d.	> 10.000	Nein
12	1,5 ± 0,11	74,0 ± 0,87	> 10.000	Nein
13	3,6 ± 1,54	1.818,0 ± 3,29	> 10.000	Ja
14	22,4 ± 1,10	74,1 ± 2,42	> 10.000	Ja
15	40,1 ± 3,76	242,2 ± 3,20	2.242	Ja
16	74,9 ± 10,92	269,8 ± 3,84	> 10.000	Nein
17	4.080,0 ± 1.073,00	141.326,0 ± 3.378,00	> 10.000	Nein
18	10.754,0 ± 2.231,00	240.907,0 ± 2.155,00	> 10.000	Nein
19	53,9 ± 3,51	463,5 ± 2,80	> 10.000	Ja
20	41,7 ± 11,02	485,2 ± 4,14	> 10.000	Nein
21	14,6 ± 0,98	189,2 ± 0,82	> 10.000	Nein

4.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von Substanz #7 im Vergleich zu klinisch angewandten Medikamenten

Der aktuelle Goldstandard zur Behandlung einer HIV Infektion ist nach wie vor eine hochaktive antiretrovirale Kombinationstherapie (cART), bei der drei Medikamente mit teils unterschiedlichen Wirkmechanismen und Ansatzpunkten im Replikationszyklus des Virus eingesetzt werden. Die meisten Medikamente zielen dabei auf eine Inhibition einer der drei Enzyme des HI Virus ab. Die Aktivität der Reversen Transkriptase, der Integrase oder der Protease soll hierbei gehemmt werden. Einzelne andere Medikamente auf dem Markt können auch den Eintritt des Virus in die Zelle verhindern, in dem sie die Interaktion mit Oberflächenrezeptoren oder die Fusion blockieren. In diesem Abschnitt der vorliegenden Dissertation liegt der Fokus vor allem auf der Wirkungsweise der MAGIC-Derivate im Vergleich zu bisherigen HIV-Inhibitoren und wie diese sich von bisherigen Wirkstoffen unterscheidet.

Um die antivirale Wirkung der MAGIC Substanzen im Vergleich zu bereits zugelassenen und in der antiretroviralen Therapie eingesetzten anti-HIV Wirkstoffen zu untersuchen, wurden zuerst die anti-HIV Aktivitäten der beiden, der MAGIC Gruppe zugrundeliegenden Naturstoffe Neoaureothin (#0) und Aureothin (#1), wie in 3.2.4 beschrieben, bestimmt und den Ergebnissen der Vergleichssubstanzen Efavirenz (EFV, NNRTI), Dolutegravir (DTG, Integraseinhibitor) und Saquinavir (Proteaseinhibitor) gegenübergestellt. Hierbei schneiden beide Naturstoffe sehr gut ab und inhibieren die Replikation von HIV auf dem selben Niveau wie auch die in der Klinik verwendeten Wirkstoffe (Tabelle 17).

Tabelle 17. Vergleich der anti-HIV Aktivität von Neoaureothin und Aureothin mit zugelassenen anti-HIV Wirkstoffen.

^aEFV - Efavirenz, DTG - Dolutegravir, SQV - Saquinavir; ^bNNRTI - Nicht-nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor, INSTI - Integrase-Strangtransferinhibitor, PI - Protease Inhibitor; ^cgezeigt werden Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten; Referenzdaten entstammen folgenden Publikationen: ¹EFV (195), ²DTG (196), ³SQV (197).

Substanz ^a	Klasse ^b	EASY-HIT IC ₅₀ (nM) ^c	Referenzdaten	
			IC ₅₀ (nM)	Referenz Zellsystem
Neoaureothin (#0)	-	2,20 \pm 0,06	-	-
Aureothin (#1)	-	5,32 \pm 0,40	-	-
EFV	NNRTI	0,22 \pm 0,02	0,8-1,4	MT-4 humane Leukämie T-Zelllinie ¹
DTG	INSTI	0,68 \pm 0,04	1,6	Humane Osteosarcoma Zelllinie ²
SQV	PI	9,09 \pm 0,58	8-220	PBMC ³

4.2.1 Untersuchung des Einflusses von Substanz #7 auf die enzymatische Aktivität von HIV-Proteinen

Um den direkten Einfluss von Substanz #7 auf die wichtigen drei HIV-Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease zu bestimmen, wurden zuerst enzymespezifische biochemische Assays durchgeführt (Details s. 3.4.1, 3.4.2 und 3.4.3). Als Referenzsubstanzen wurden der NNRTI EFV, der Integraseinhibitor DTG, sowie der Proteaseinhibitor Saquinavir (SQV) verwendet. Abbildung 25 zeigt die Angriffspunkte der Referenzsubstanzen im Replikationszyklus.

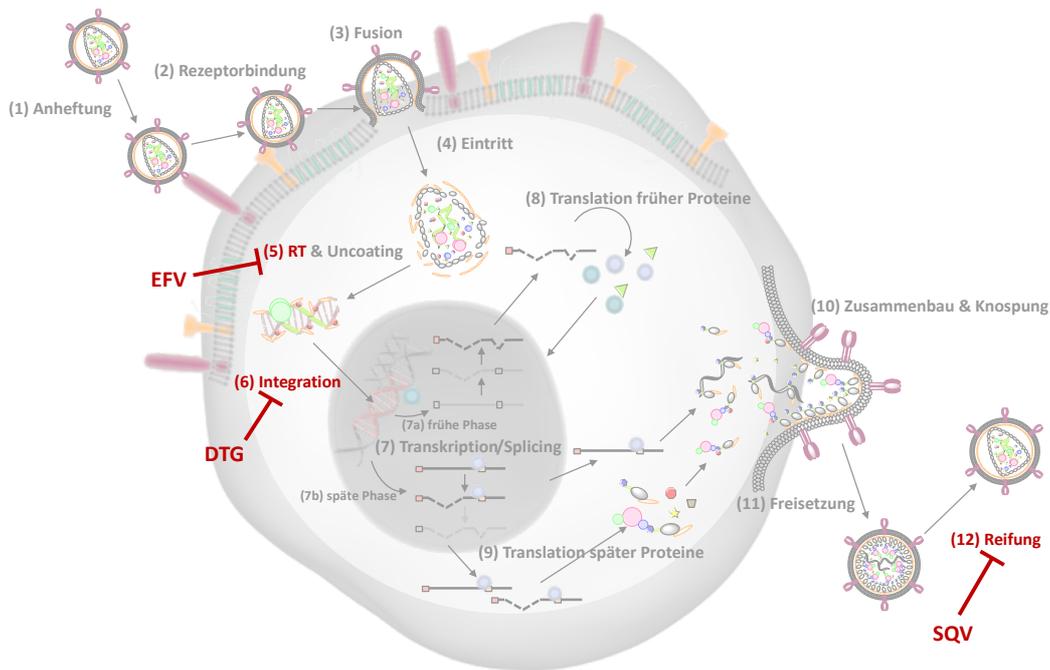


Abbildung 25. Übersicht der in den biochemischen Assays verwendeten Referenzsubstanzen und ihrer Angriffspunkte im Replikationszyklus von HIV. Die Referenzsubstanzen Efavirenz (EFV, NNRTI), Dolutegravir (DTG, Integraseinhibitor), bzw. Saquinavir (SQV, Proteaseinhibitor) greifen während der Reversen Transkription, der Integration der proviralen DNA ins Wirtsgenom bzw. der Reifung der Nachkommenviren in den HIV Replikationszyklus ein.

Substanz #7 zeigt im Vergleich zu den Referenzsubstanzen selbst bei sehr hohen Konzentrationen bis 10 μM in keinem der durchgeführten Assays eine direkte Wirkung auf das entsprechende HIV-Enzym (Abbildung 26). Damit unterscheidet sich die antivirale Wirkungsweise von Substanz #7 von den meisten in der HIV-Therapie eingesetzten Medikamenten.

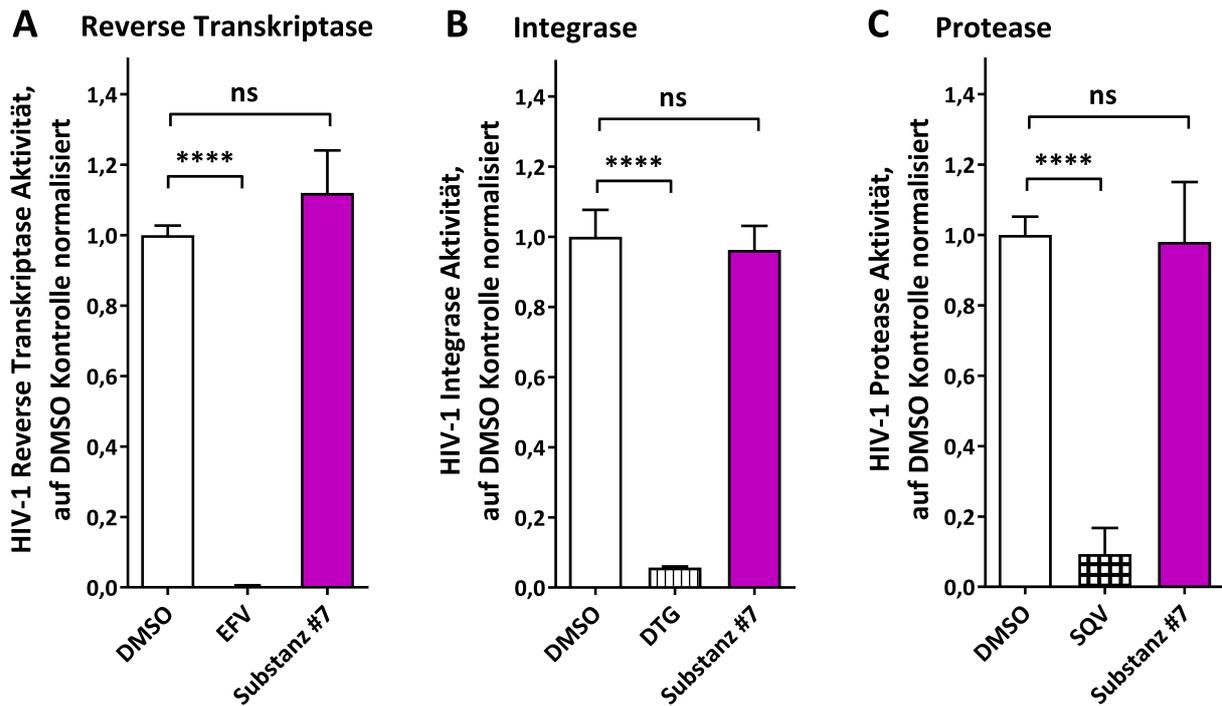


Abbildung 26. Effekte von Substanz #7 auf Aktivität verschiedener HIV-1 Enzyme in biochemischen Assays. Dargestellt sind die anti-HIV Aktivitäten von Substanz #7 (10 μ M, magenta) in verschiedenen biochemischen Assays, basierend auf den HIV Enzymen **(A)** Reverse Transkriptase (Referenzsubstanz: EFV; Efavirenz, 10 μ M, horizontal gestreift), **(B)** Integrase (Referenzsubstanz: DTG; Dolutegravir, 10 μ M, vertikal gestreift) und **(C)** Protease (Referenzsubstanz: SQV; Saquinavir, 0,1 μ M, gekachelt). Mittelwert und Standardabweichung wurden jeweils aus Daten von drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten berechnet ($n = 3$; $m = 3$; SD) und auf die DMSO Kontrolle normalisiert. Um zu prüfen, ob sich die Effekte behandelter Proben statistisch signifikant ($P < 0.05$) von der DMSO Kontrolle unterscheiden, wurde ein one-way ANOVA Signifikanztest (Dunnett's test) durchgeführt. Die Werte der statistischen Signifikanz (P Werte) sind durch Sternchen (*) angezeigt. **** $P \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant.

4.2.2 Untersuchung der Wirksamkeit von Substanz #7 zu verschiedenen Zeitpunkten des HIV Replikationszyklus

Da der Großteil der zur cART zugelassenen Medikamente in einer frühen Phase des Replikationszyklus von HIV, noch vor der Expression der Strukturproteine, eingreift, Proteaseinhibitoren bilden hier die Ausnahme, wurde ein Time-of-addition Assay (TOA) mit verschiedenen Inhibitoren der frühen Infektionsphasen durchgeführt, um den ungefähren Zeitpunkt des Einsetzens des anti-HIV Effekts von Substanz #7 im Vergleich zu den verwendeten Referenzsubstanzen abschätzen zu können.

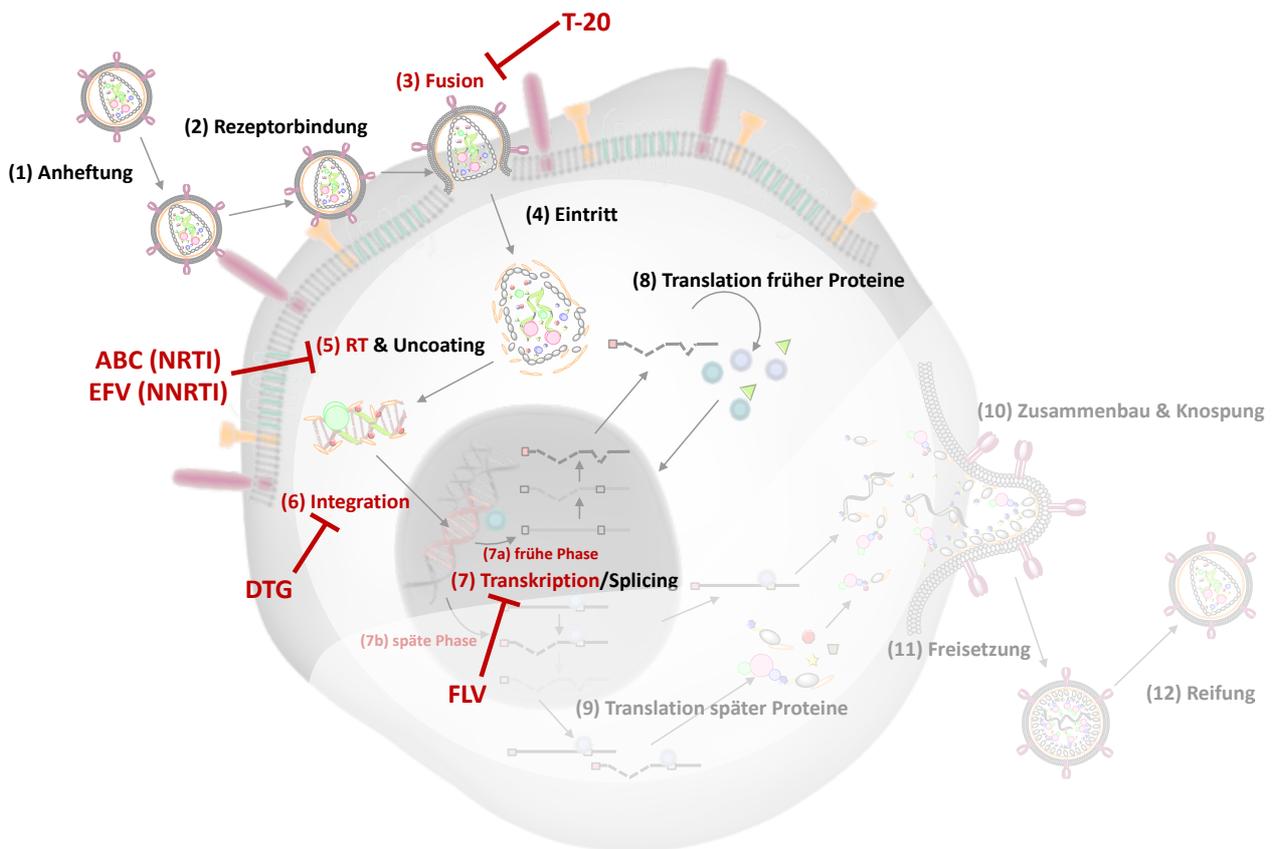


Abbildung 27. Übersicht der im TOA verwendeten Referenzsubstanzen und ihrer Angriffspunkte im Replikationszyklus von HIV im 1st step des EASY-HIT Assays. Als Referenzsubstanzen wurden der Fusionsinhibitor Enfuvirtid (T-20), der NRTI Abacavir (ABC), der NNRTI Efavirenz (EFV), der Integraseinhibitor Dolutegravir (DTG), sowie der CDK9-Inhibitor Flavopiridol (FLV) verwendet. Zudem wird angezeigt welche Phasen des Replikationszyklus bei einer Inhibition der DsRed1 Reportereexpression im 1st step des EASY-HIT betroffen sein können (klar) und welche nicht (opak verdeckt).

Hierfür werden LC5-RIC Zellen, wie in 3.2.6 beschrieben, mit HIV-1_{LAI} inokuliert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation (0 - 16 h) mit Substanz #7 und verschiedenen antiviralen Referenzsubstanzen behandelt. In diesem Versuch wird ein besonderes Augenmerk auf die Inhibition des 1st step des EASY-HITs gelegt, da hier ein Blockieren der Expression des DsRed1 Reporters direkt auf einen anti-HIV Effekt in einer der frühen Phasen des Replikationszyklus hinweist. Kommt es zu einem verringerten DsRed1 Fluoreszenzsignal im 1st step, liegt dies an einer inhibitorischen Aktivität, die spätestens in die Expression der frühen HIV Proteine Tat, Rev und Nef, aber noch vor der Expression der späten Proteine eingreift. Fehlt besonders Tat, kann dieses die Expression von DsRed1 nicht mehr initiieren. Mithilfe des TOA Assays wurde ein Wirkprofil für die Leitsubstanz #7 und die schwachwirksame Substanz #18, sowie für Referenzsubstanzen, die in frühen Phasen des Replikationszyklus eingreifen, erstellt. Verwendet wurden der Fusionsinhibitor Enfuvirtid (T-20), der nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitor (NRTI) Abacavir (ABC), der

Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitor (NNRTI) Efavirenz (EFV), der Integrase Inhibitor Dolutegravir (DTG), sowie der experimentelle Transkriptioninhibitor Flavopiridol (FLV). Mit Ausnahme der als Negativkontrolle verwendeten Substanz #18 wurden alle anderen Substanzen mit einer Konzentration $>5x IC_{50}$ eingesetzt, was im *2nd step* des EASY-HIT Assays, bei dem die Produktion infektiöser Nachkommenviren gemessen wird, bei simultaner Behandlung zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Produktion infektiöser Nachkommenviren führen würde. Abbildung 27 soll verdeutlichen, an welcher Stelle die verwendeten Referenzsubstanzen eingreifen und welche Phasen des Replikationszyklus durch eine Inhibition im *1st step* des EASY-HIT betroffen sein können (klar) und welche nicht (opak).

Das Wirkprofil von Substanz #7 zeigt kaum einen Unterschied der antiviralen Aktivität. Unabhängig davon zu welchem Zeitpunkt die Behandlung durchgeführt wurde, reduziert Substanz #7 die Fluoreszenz des Reporterproteins DsRed1 nur zu rund 40 % während dieser frühen Phase des Replikationszyklus (Abbildung 28A). Wie zu erwarten, zeigt Substanz #18 keinerlei relevante inhibitorische Wirkung im Verlauf dieses Assays (Abbildung 28A). Im Vergleich zu Substanz #7 zeigen die in der Klinik verwendeten Medikamente T-20 (Abbildung 28B), ABC, EFV (Abbildung 28C) und DTG (Abbildung 28D) ein vollständig anderes Bild. Bei Zugabe zu Beginn der Infektion inhibieren diese Substanzen die Produktion des DsRed1 Reporters vollständig, verlieren jedoch bei Behandlung an späteren Zeitpunkten deutlich an Aktivität, da die HIV Infektion den entsprechenden Schritt im Replikationszyklus des Virus, den die einzelnen Referenzsubstanzen inhibieren, schon durchlaufen hat. T-20 verliert schon bei einer Zugabe von 4,4 h nach der Infektion 50 % seiner Aktivität, weil sich zu diesem Zeitpunkt der Großteil der Viruspartikel des Inokulates bereits innerhalb der Zelle befindet und die Fusion daher zum größten Teil abgeschlossen ist. Gleiches gilt für die RT- und Integraseinhibitoren, so liegt bei ABC dieser Wendepunkt der antiviralen Aktivität bei 7,2 h, bei EFV bei 8,4 h und bei DTG bei 10,7 h. Das Wirkprofil des CDK9 Inhibitors Flavopiridol ähnelt hingegen dem von Substanz #7 deutlich mehr - auch FLV verliert seine anti-HIV Wirkung bei Hinzugeben der Substanz bis 16 h nach Infektion nicht (Abbildung 28D), da HIV im Verlauf dieser 16 h Periode die Transkription noch nicht durchläuft. Allerdings inhibiert FLV die Virusreplikation im Vergleich zu Substanz #7 zu dieser frühen Phase des Replikationszyklus fast vollständig und somit deutlich effektiver als Substanz #7.

Der schwache aber anhaltende Effekt von Substanz #7 auf die Expression des Reporterproteins DsRed1 im *1st step* des EASY-HIT lässt darauf schließen, dass Substanz #7 einen leichten Einfluss auf Abläufe in der frühen Phase der Virusreplikation ausübt, sich der essentielle Teil des Wirkmechanismus von Substanz #7 jedoch zu späteren Zeitpunkten und nach dieser 16 h-Periode des TOAs abspielt.

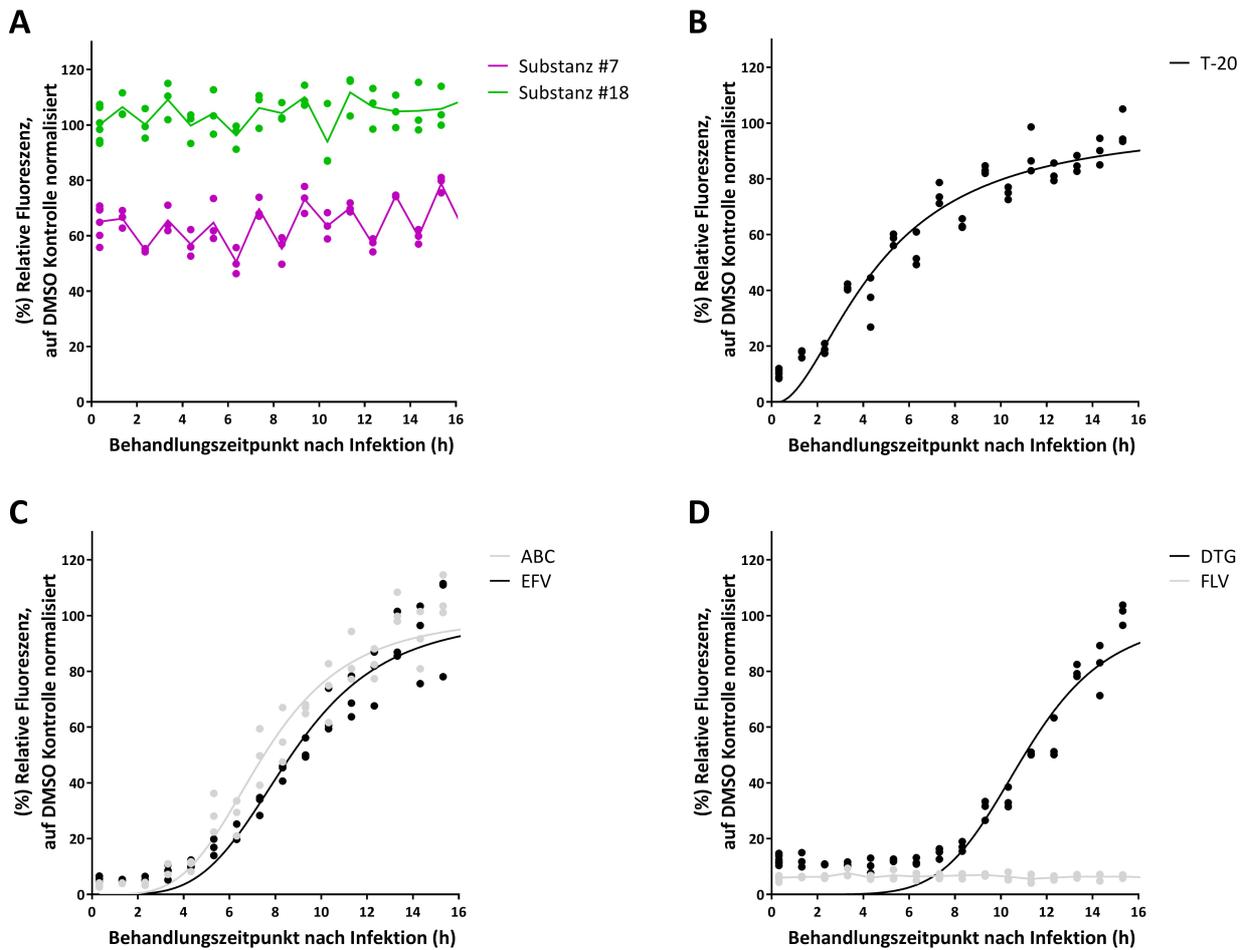


Abbildung 28. Time-of-addition Profil von Substanz #7 im Vergleich zu Referenzsubstanzen. Dargestellt sind die anti-HIV Wirkprofile von Substanz #7 und Referenzsubstanzen nach Behandlung HIV-1_{LAI} inokulierter LC5-RIC Zellen. Die Zellen wurden entweder mit (A) den Aureothin-Derivaten Substanz #7 (50 nM) oder #18 (50 nM) oder mit einer der Referenzinhibitoren (B) T-20 (Enfuvirtid; 50 nM), (C) ABC (Abacavir; 10 µM), EFV (Efavirenz; 10 nM), (D) DTG (Dolutegravir; 50 nM) oder FLV (Flavopiridol; 50 nM) behandelt. Aufgezeigt sind die Datenpunkte der Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten (n = 3; m = 3), inklusive der Kurve aus einer nicht-linearen Regressionsanalyse.

Um die Unterschiede der Wirkungsweisen von Substanz #7 und FLV noch einmal genauer zu untersuchen, wurden beide Substanzen in Verdünnungsreihen im EASY-HIT Assay, wie in 3.2.4 beschrieben, getestet und deren Wirkung sowohl im 1st als auch im 2nd step gegenüber gestellt (Abbildung 29). Wie im TOA bereits zu erkennen, zeigt Substanz #7 in frühen Phasen des Replikationszyklus eine inhibitorische Wirkung auf die Expression des Reporterproteins DsRed1 im 1st step des EASY-HIT Assays, jedoch schwankt diese erheblich zwischen einzelnen Experimenten (Abbildung 29A).

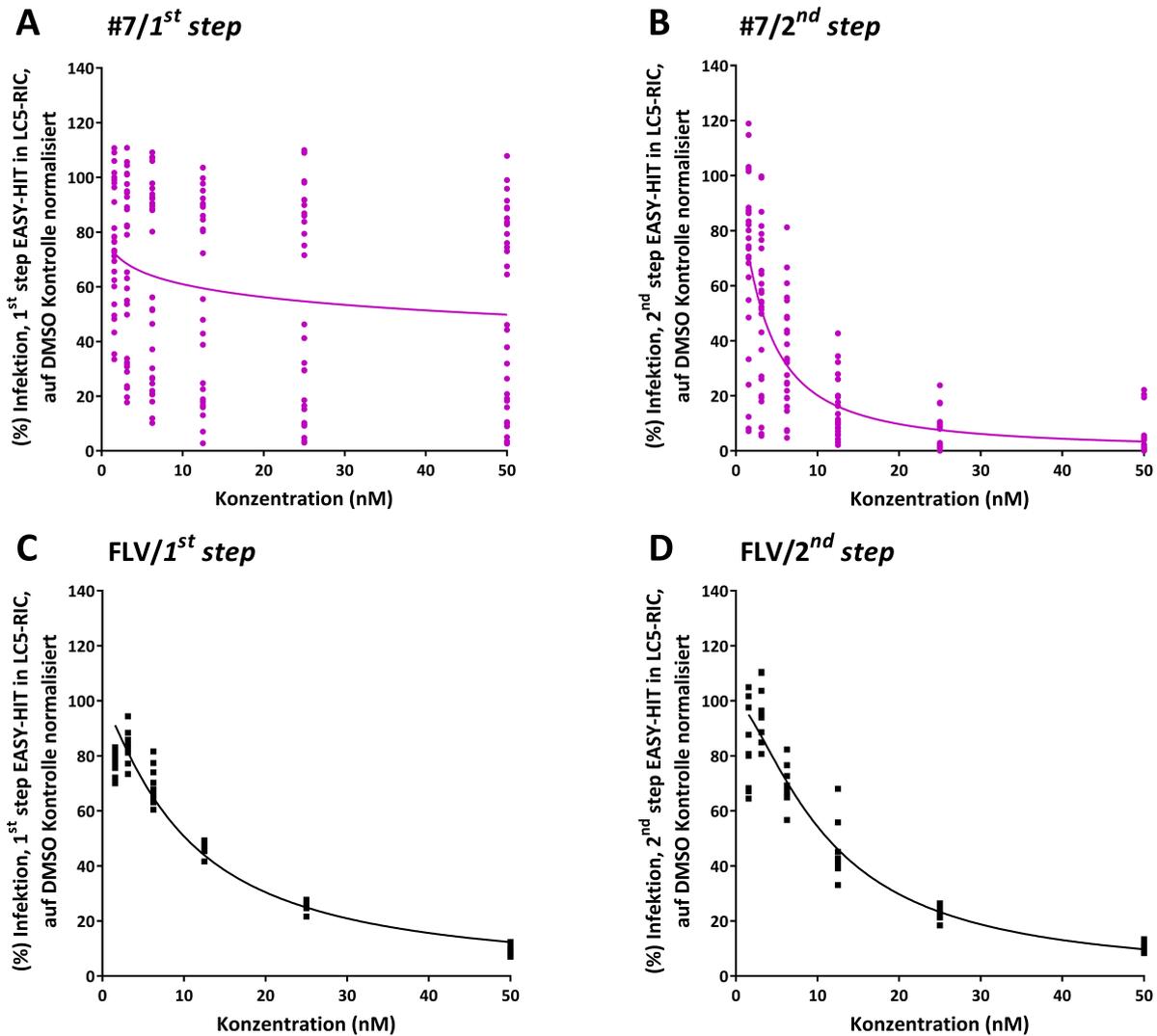


Abbildung 29. Analyse der inhibitorischen Effekte von Substanz #7 in der frühen Phase der HIV Replikation und auf die Produktion infektiöser Nachkommenviren im *two-step* EASY-HIT Assay. Im *1st step* des EASY-HIT Assays werden die Effekte einer Testsubstanz auf Tat/Rev abhängige Reporterexpression gemessen, während im *2nd step* die Produktion infektiöser Viruspartikel quantifiziert wird (144). Dargestellt sind die inhibitorischen Effekte von Substanz #7 (magenta) und des experimentellen Transkriptioninhibitors Flavopiridol (FLV, schwarz), getrennt in **(A, C)** *1st* and **(B, D)** *2nd* *step* EASY-HIT Assay. LC5-RIC Zellen wurden mit HIV-1_{LAI} inokuliert und simultan zur Inokulation mit einer Verdünnungsreihe von #7 bzw. FLV für 48 h behandelt. Aufgezeigt sind die Einzeldatenpunkte aus zehn (#7) bzw. drei (FLV) unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten ($n = 10/3$; $m = 3$), inklusive der Kurve aus einer nicht-linearen Regressionsanalyse.

Im *2nd step* des EASY-HIT Assays inhibiert Substanz #7 die Replikation von HIV ohne große Schwankungen zwischen Einzelexperimenten fast vollständig (Abbildung 29B). Im Gegensatz dazu zeigt FLV sowohl im *1st* als auch im *2nd* *step* ein identisches Wirkprofil (Abbildung 29C,D), was darauf schließen lässt, dass sich der Wirkmechanismus von Substanz #7 auch im Vergleich zu dem von FLV grundlegend unterscheidet und die Hauptwirkung von Substanz #7 eher in einem späten

Abschnitt des Replikationszyklus nach der frühen Phase der Transkription des proviralen Genoms einsetzt.

Zusammenfassend unterscheidet sich das Wirkprofil von Substanz #7 von dem aller im TOA eingesetzter Referenzsubstanzen. Die schwachen inhibitorischen Effekte im 1st step des EASY-HIT deuten zwar auch auf einen möglichen leichten Einfluss auf frühe Phasen der Virusreplikation hin, jedoch machen die 2nd step Ergebnisse des EASY-HIT, besonders im Vergleich mit FLV, deutlich, dass der entscheidende Angriffspunkt von Substanz #7 nach der frühen Phase der Transkription des proviralen Genoms liegt.

4.2.3 Untersuchung des Einflusses von Substanz #7 auf die provirale Integration

Um die Ergebnisse des TOA aus 4.2.2 und die Annahme, dass Substanz #7 erst nach der Transkription des Provirus und damit auch nach der Integration in das Genom der Wirtszelle in den Replikationszyklus von HIV eingreift, zu bestätigen, wurde der Einfluss von Substanz #7 auf die Integration des Virus ins Wirtsgenom genauer untersucht. Hierfür wurden zuerst HIV-1_{LA1} inokulierte LC5-RIC Zellen simultan zur Inokulation mit Substanz #7 oder #4, sowie mit den Referenzsubstanzen EFV, DTG oder FLV unter Verwendung einer die Virusproduktion vollständig inhibierenden Konzentration ($>2x IC_{90}$) behandelt. Abbildung 30 zeigt die Angriffspunkte der Referenzsubstanzen im Replikationszyklus.

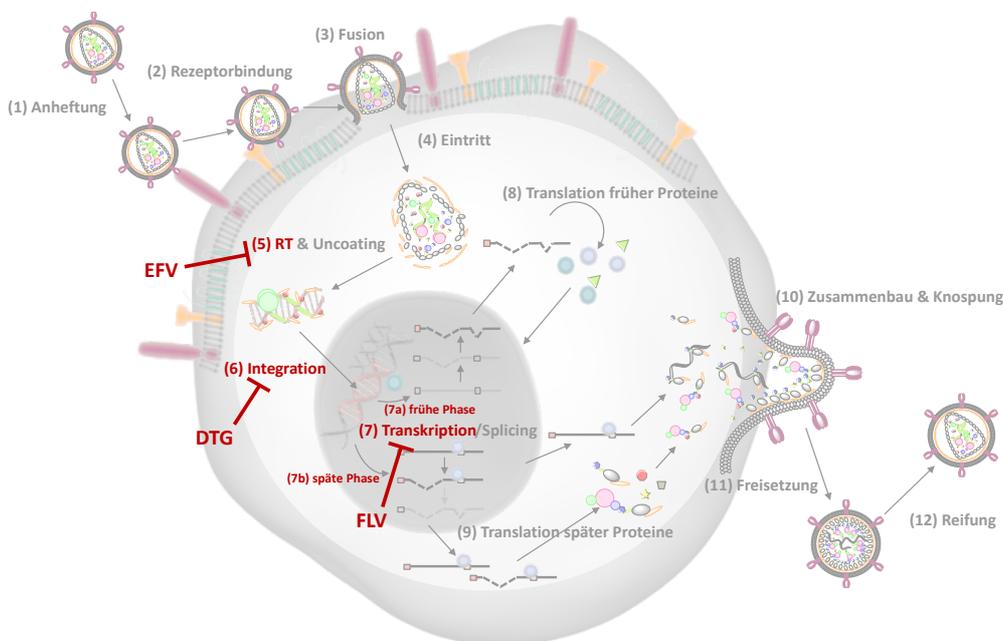


Abbildung 30. Übersicht der in 4.2.3 verwendeten Referenzsubstanzen und ihrer Angriffspunkte im Replikationszyklus von HIV. Als Referenzsubstanzen wurden sowohl der NNRTI Efavirenz (EFV) und der Integraseinhibitor Dolutegravir (DTG), die beide vor bzw. während der Integration des Provirus ins Wirtsgenom wirken, als auch der nach der Integration eingreifende CDK9-Inhibitor Flavopiridol (FLV) verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde, wie in 3.3.3 beschrieben, die Menge integrierter proviraler HIV-DNA in der genomischen DNA behandelter und unbehandelter Zellen mittels *Alu*-PCR ermittelt. Wie in Abbildung 31 zu sehen, führt die Behandlung mit Substanz #7 nur zu einer sehr leichten Reduktion der integrierten proviralen DNA von <20 %. Dahingegen inhibieren die Referenzsubstanzen EFV und DTG, welche beide vor bzw. während der Integration ihre Wirkung entfalten, die Integration des HIV Genoms höchst signifikant um >90 %. Sowohl die schwachaktive Substanz #4, als auch der CDK9-Inhibitor FLV, der erst nach der Integration wirkt, zeigen wie zu erwarten keinen Effekt.

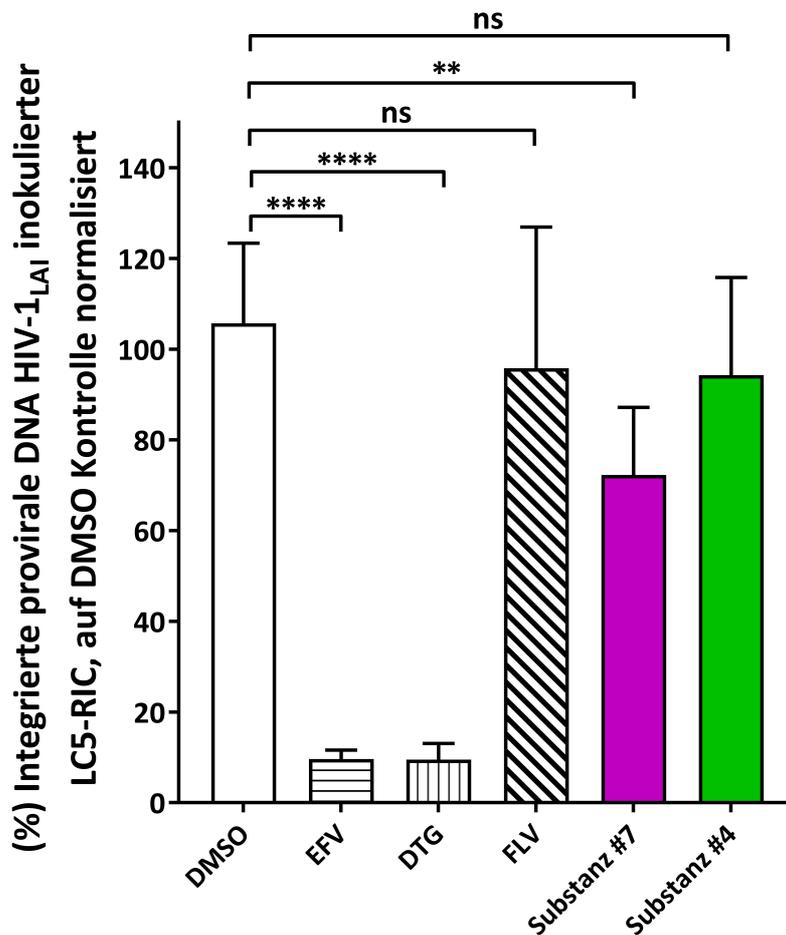


Abbildung 31. Effekte von Substanz #7 auf die provirale Integration. Dargestellt sind die Anteile (%) integrierter proviraler DNA in HIV-1_{LAI} inokulierten LC5-RIC Zellen, die mit Beginn der Inokulation des Virus für 48 h mit entweder DMSO (weiß), dem NNRTI Efavirenz (EFV, horizontal gestreift), dem Integraseinhibitor Dolutegravir (DTG, vertikal gestreift), Flavopiridol (FLV, diagonal gestreift) oder den Aureothin-Derivaten #7 (magenta) und #4 (grün) mit jeweils 50 nM behandelt wurden. Mittelwert und Standardabweichung wurden jeweils aus Daten von drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten berechnet ($n = 3$; $m = 3$; SD) und auf die DMSO Kontrolle normalisiert. Um zu prüfen, ob sich die Effekte behandelter Proben statistisch signifikant ($P < 0.05$) von der DMSO Kontrolle unterscheiden, wurde ein one-way ANOVA Signifikanztest (Dunnett's test) durchgeführt. Die Werte der statistischen Signifikanz (P Werte) sind durch Sternchen (*) angezeigt. $**P \leq 0.01$, $****P \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant.

Alles in allem zeigt Substanz #7 nur einen marginalen Effekt auf die provirale Integration von HIV, wodurch die Annahme bestätigt wird, dass sich der bedeutendste Anteil der antiviralen Effekte von Substanz #7 auf spätere Abläufe des Replikationszyklus konzentriert und damit erst nach der Integration des Provirus ins Wirtsgenom einsetzt.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt der Dissertation aufgezeigt werden, dass sich das Wirkprofil und der Angriffspunkt der antiviralen Aktivität von Substanz #7 von der Wirkungsweise aller auf dem Markt befindlichen Medikamente unterscheidet. Substanz #7 zeigt weder einen direkten Einfluss auf die wichtigen HIV Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease in *in vitro* biochemischen Assays, noch einen inhibitorischen Effekt auf die provirale Integration nach Inokulation von LC5-RIC Zellen mit HIV-1 (*Alu*-PCR). Die anti-HIV Aktivität von Substanz #7 setzt daher nach der frühen Phase der Transkription und noch vor der Maturation der Nachkommen-viren ein.

4.3 Untersuchung des Einflusses von Substanz #7 auf provirale und zelluläre Genexpression

Die in der HIV-Therapie bislang üblichen Angriffspunkte im Replikationszyklus, der Eintritt des Virus in die Zelle, sowie die enzymvermittelten Schritte der Reversen Transkription von viraler RNA zu DNA, der Integration des Provirus in das Genom der Wirtszelle und der Reifung neu gebildeter Viruspartikel durch die viralen Enzyme, werden durch das Aureothin-Derivat #7 nicht beeinflusst. Da Substanz #7 dennoch einen sehr starken anti-HIV Effekt aufzeigt, scheint dessen Wirkung durch einen für die HIV-Therapie komplett neuartigen Mechanismus einzutreten. Ein zentraler Umschlagpunkt im Replikationszyklus eines jeden Virus liegt in der von der Wirtszellmaschinerie abhängigen Genexpression und Proteinbiosynthese zur Produktion neuer Viruspartikel. Gerade bei HIV sind diese Prozesse sehr eng mit denen der Zelle verwoben und wären ein sehr empfindliches Ziel für eine Inhibition der Virusproduktion. Daher wird im nachfolgenden Abschnitt besonders der Einfluss von Substanz #7 auf die Expression des HIV Genoms untersucht.

4.3.1 Einfluss von Substanz #7 auf die Biosynthese von HIV-Strukturproteinen

Zuerst wurden die antiviralen Effekte von Substanz #7 auf Basis der viralen Proteinbiosynthese betrachtet. Hierfür wurden die intrazellulären Proteinlevel des Strukturproteins Gag-p24 mittels Western Blot Assay und p24 spezifischem ELISA qualitativ und quantitativ in HIV-1_{LAI} inokulierten und simultan zur Inokulation mit Aureothin-Derivaten (#4, #7, #18) oder einer Referenzsubstanz

(FLV) behandelten LC5-RIC, sowie H9 T-Zellen analysiert (Details s. 3.4.5 und 3.4.6). Der CDK9-Inhibitor Flavopiridol wurde als Positivkontrolle verwendet, die schwachwirksamen Substanzen #4 bzw. #18 als Negativkontrollen. Beide verwendeten Zelllinien erlauben eine vollständige HIV Replikation. Während LC5-RIC Zellen schon in den vorherigen Experimenten als Grundlage dienten, sollten die antiviralen Effekte von Substanz #7 zudem in H9 T-Zellen, einer T-Lymphoma-Zelllinie, untersucht werden, da T-Zellen *in vivo* zu den hauptsächlichen Wirtszellen von HIV gehören. Die HIV inokulierten Zellen wurden für 48 h mit einer die Produktion infektiöser Viruspartikel um über 95 % reduzierenden Konzentration an Substanz #7 und FLV behandelt, um anschließend das Gag-p24 Protein in Zelllysaten zu quantifizieren.

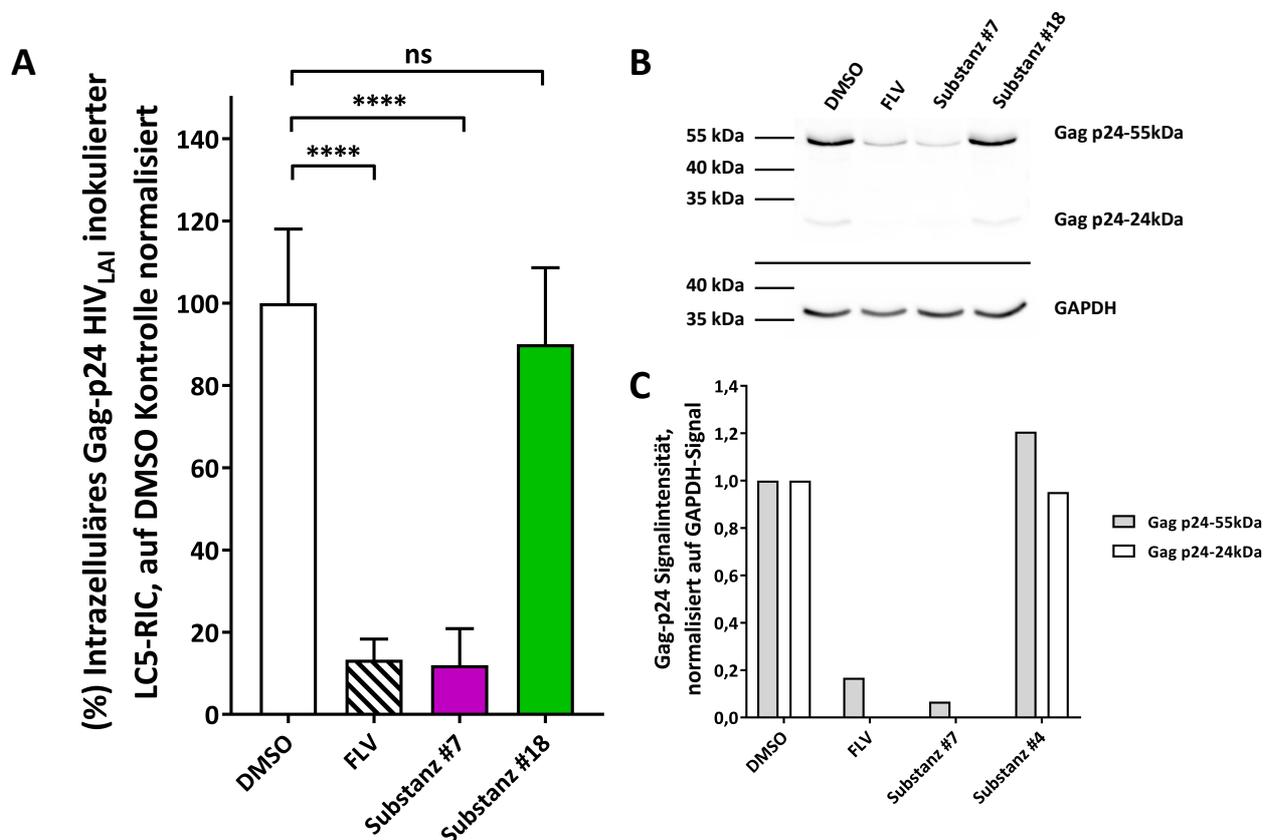


Abbildung 32. Effekte von Substanz #7 auf HIV spezifische Proteinexpression. (A) Dargestellt sind die per p24 spezifischem ELISA ermittelten Anteile (%) intrazellulären Gag-p24 aus HIV-1_{LAI} inokulierten LC5-RIC Zellen, die für 48 h mit entweder DMSO (weiß), Flavopiridol (FLV, diagonal gestreift) oder den Aureothin-Derivaten #7 (magenta) und #18 (grün) mit jeweils 50 nM behandelt wurden. Mittelwert und Standardabweichung wurden jeweils aus Daten von drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Duplikaten berechnet ($n = 3$; $m = 2$; SD) und auf die DMSO Kontrolle normalisiert. Um zu prüfen, ob sich die Effekte behandelter Proben statistisch signifikant ($P < 0.05$) von der DMSO Kontrolle unterscheiden, wurde ein one-way ANOVA Signifikanztest (Dunnett's test) durchgeführt. Die Werte der statistischen Signifikanz (P Werte) sind durch Sternchen (*) angezeigt. $****P \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant. **(B), (C)** Gezeigt sind die mittels Western Blot ermittelten Mengen intrazellulären Gag-p24 bzw. GAPDH (House-keeper Protein) aus HIV-1_{LAI} inokulierten LC5-RIC Zellen, die mit Beginn der Inokulation für 48 h mit DMSO, Flavopiridol oder den Aureothin-Derivaten #7 und #18 mit jeweils 50 nM behandelt wurden.

Wie in den Resultaten aus p24 spezifischem ELISA (Abbildung 32A und 7.5, Abbildung A4) und Western Blot (Abbildung 32B,C) zu sehen, reduziert eine Behandlung HIV-1_{LAI} inokulierter LC5-RIC bzw. H9 T-Zellen mit Substanz #7 die intrazellulären Gag-p24 Level im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle höchst signifikant um über 85 %. Wie erwartet beeinflussen die Aureothin-Derivate #4 bzw. #18 die Gag-p24 Proteinexpression von HIV weder in LC5-RIC noch in H9 T-Zellen.

4.3.2 Einfluss von Substanz #7 auf HIV spezifische Transkription

Nachdem Substanz #7 eine inhibierende Wirkung auf die viralen Proteinlevel gezeigt hat, wurde infolgedessen auch der anti-HIV Effekt von Substanz #7 auf posttranskriptioneller Ebene untersucht. Die Genexpression von HIV wird von komplexem alternativen Splicing begleitet, wodurch über 40 verschiedene mRNAs entstehen, die anhand ihrer Größe in drei Klassen eingeteilt werden können. Zum einen gibt es die vollständig gespleißten, Rev-unabhängigen mRNAs mit einer Größe von 1,8 kB, zum anderen wird zwischen einfach gespleißten (4 kB) bzw. ungespleißten (9 kB), aber Rev-abhängigen mRNA Spezies unterschieden (s. 3.3.4.3, Abbildung 17) (35). Um zwischen Rev-abhängigen und unabhängigen Transkripten zu unterscheiden, wurden in diesem Experiment die Mengen (relativ zur RNA Pol II) intrazellulärer HIV Transkripte in HIV-1_{LAI} inokulierten und simultan zur Inokulation mit Aureothin-Derivaten (#4, #7, #18) oder einer Referenzsubstanz (FLV) behandelten LC5-RIC, sowie H9 T-Zellen mittels RT-qPCR unter Verwendung von Primern, die spezifisch *vollständig gespleißte Transkripte* (Rev-unabhängig), *einfach gespleißte* und *ungespleißte Transkripte* (Rev-abhängig), sowie *alle Transkripte* amplifizieren, analysiert. (Details zu den Primerbindestellen der jeweiligen Transkripten s. 3.3.4.3, Abbildung 17). Der CDK9-Inhibitor Flavopiridol wurde als Positivkontrolle für die Inhibition der gesamten HIV Transkription verwendet (198), die schwachwirksamen Substanzen #4 bzw. #18 als Negativkontrollen. Die infizierten Zellen wurden für 48 h mit einer die Produktion infektiöser Viruspartikel um über 95 % reduzierenden Konzentration an Substanz #7 und FLV behandelt, um anschließend die Transkriptlevel zu detektieren.

Wie erwartet beeinflussen die Aureothin-Derivate #4 bzw. #18 die Bildung HIV spezifischer Transkripte weder in LC5-RIC noch in H9 T-Zellen (LC5-RIC, Abbildung 33; H9 s. 7.5, Abbildung A5). Während die Behandlung mit dem CDK9-Inhibitor FLV die Produktion aller untersuchter Transkriptspezies (*Vollständig gespleißt*, *Einfach gespleißt*, *Ungespleißt*, *Alle Transkripte*) in beiden Zellsystemen im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle höchst signifikant um bis zu 80 % (LC5-RIC) bzw. 95 % (H9) reduziert, zeigt Substanz #7 ein davon etwas abweichendes Bild. Auf der einen Seite verringert Substanz #7 die relative Menge Rev-abhängiger Transkripte (*Einfach gespleißt*,

Ungespleißt, Alle Transkripte) höchst signifikant um bis zu 80 % in beiden Zellsystemen, auf der anderen Seite werden Rev-unabhängige Transkripte (*Vollständig gespleißt*) in LC5-RIC Zellen durch die Behandlung mit Substanz #7 mehr als verdreifacht, während diese in H9 nur um knapp 50 % abgesenkt werden. Hierdurch grenzt sich Substanz #7 auch deutlich von der Referenzsubstanz Flavopiridol ab.

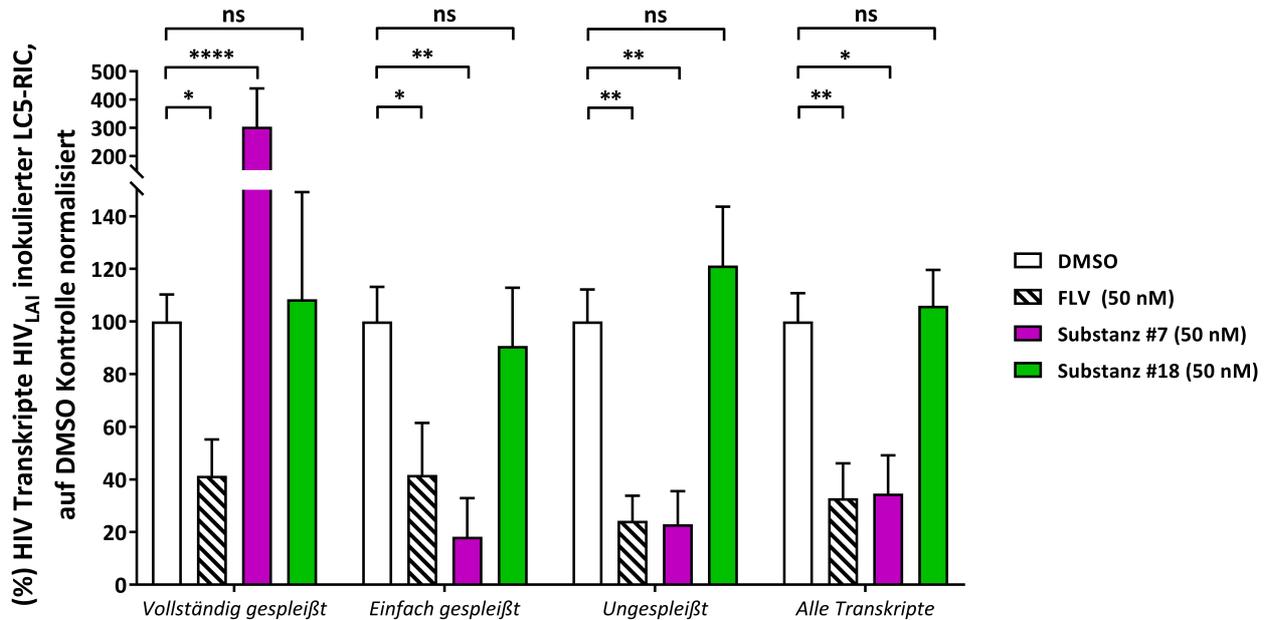


Abbildung 33. Effekte von Substanz #7 auf HIV spezifische Transkription. Dargestellt sind die Anteile (%) der HIV Transkripte (*Vollständig gespleißt, Einfach gespleißt, Ungespleißt* und *Alle Transkripte*) HIV-1_{LAI} inokulierter LC5-RIC Zellen, die mit Beginn der Inokulation für 48 h mit entweder DMSO (weiß), Flavopiridol (FLV, diagonal gestreift) oder den Substanzen #7 (magenta) und #18 (grün) mit jeweils 50 nM behandelt wurden. Mittelwert und Standardabweichung wurden jeweils aus Daten von drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Duplikaten berechnet ($n = 3$; $m = 2$; SD) und auf die DMSO Kontrolle normalisiert. Um zu prüfen, ob sich die Effekte behandelte Proben statistisch signifikant ($P < 0.05$) von der DMSO Kontrolle unterscheiden, wurde ein two-way ANOVA Signifikanztest (Dunnnett's test) durchgeführt. Das Level der statistischen Signifikanz (P Werte) ist durch Sternchen (*) angezeigt. * $P \leq 0.1$, ** $P \leq 0.01$, **** $P \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die drastische Abnahme in der Produktion infektiöser Nachkommenviren als Folge eines Substanz #7 vermittelten Eingriffs in die späte Phase der Genexpression von HIV zu verstehen ist, wodurch es besonders zu einer selektiven Depletion von ungespleißten und einfach gespleißten Transkripten kommt. Dieser Inhibition der viralen Expression durch das Aureothin-Derivat #7 liegt somit ein für die HIV-Therapie vollkommen neuartiger Wirkmechanismus zugrunde.

4.3.3 Proteomics-Analyse des Effektes von Substanz #7 in PBMC

Da Substanz #7, wie oben gezeigt, die HIV Replikation auf Basis der Genexpression und Proteinsynthese hemmt und gerade diese Prozesse entscheidend von zellulären Faktoren abhängig sind, wurde der Einfluss von Substanz #7 auf zelluläre Prozesse in HIV inokulierten, sowie nicht inokulierten PBMC mittels Proteomics-Analyse in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thomas Werner von der University of Michigan und Dr. Stefanie Hauck aus der Proteomicsabteilung des Helmholtz Zentrums München untersucht. Wie in 3.4.6.2 beschrieben, wurden die PBMC von insgesamt drei verschiedenen Spendern in An- und Abwesenheit von HIV-1_{LAI} für 48 h mit Beginn der HIV Inokulation mit Substanz #7 oder DMSO behandelt und deren Proteom nach anschließender Proteinextraktion und massenspektrometrischer Detektion mittels Enrichmentanalyse profiliert. Um zu bestätigen, dass die HIV Replikation in allen Experimenten durch Behandlung mit Substanz #7 reduziert worden war und die Daten einzelner Spender in die Analyse mit aufgenommen werden können, wurde die Menge neu produzierter infektiöser Viruspartikel im Zellkulturüberstand mithilfe des 2nd step EASY-HIT bestimmt (s. 7.6, Abbildung A6).

Insgesamt wurden rund 3.200 Proteine je Spender (Spender A, 3514 Proteine; Spender B, 2714 Proteine; Spender C, 3425 Proteine) durch die Massenspektrometrie detektiert, wobei durchschnittlich 661 Proteine differentiell exprimiert vorlagen (289 hoch-, 372 runterreguliert, Unterschied ≥ 2 -fach). Nur ein kleiner Teil (5-10 %) aller in den drei Spendern detektierter Proteine wurde von der Behandlung mit Substanz #7 im Vergleich zur DMSO Kontrolle beeinflusst, was dafür spricht, dass Substanz #7 keinen allgemeinen globalen Effekt auf die Proteinexpression von PBMC ausübt (s. 7.6, Abbildung A7). Die zu diesen Proteinen korrespondierenden Gene wurden zur Enrichment-Analyse herangezogen, um mithilfe verschiedener Datenbanken Gencluster unterschiedlicher Kategorien zu identifizieren (Details s. 3.4.6.2). Diese Gencluster oder Kategorien wurden anhand ihrer Signifikanzwerte (*P* Werte) isoliert und eine Top10 Liste extrahiert.

Unter Zuhilfenahme der UniGene Gewebedatenbank konnte bestätigt werden, dass es sich bei den PBMC, wie zu erwarten, um Gene/Proteine handelt, die mit dem hämolymphtischen System und Blutzellen assoziiert werden können (s. 7.6, Tabelle A3).

Die Enrichment-Analyse zeigt, dass viele der identifizierten assoziierten biologischen Prozesse, Signalwege und MeSH-Terms sowohl in HIV inokulierten PBMC als auch in solchen, die in Abwesenheit von HIV mit Substanz #7 behandelt wurden, hoch- oder runterreguliert werden (Abbildung 34, blau umrahmt; s. 7.6, Tabelle A3). Übereinstimmende biologische Prozesse aus der GO-Datenbank werden assoziiert mit *Virale Infektionen* und *Immunsystem*. Biologische Prozesse aus der Kategorie *Virale Infektionen* waren ausschließlich mit runterregulierten Genen/Proteinen

assoziiert, während den mit *Immunsystem* assoziierten Prozessen sowohl hoch- als auch runterregulierte Gene/Proteine zugrunde liegen (Abbildung 34; s. 7.6, Tabelle A3).

Die sich in den Top10 befindenden Signalwege-Kategorien, bei denen es sowohl in HIV exponierten als auch in nicht-exponierten PBMC zur Hochregulierung assoziierter Gene/Proteine kam, werden mit *HIV Infektion* assoziiert (Abbildung 34; s. 7.6, Tabelle A3).

Bei den MeSH-Terms treten solche gemeinsamen Veränderungen in Bezug zu *Immunerkrankungen* auf, jedoch sind diese in den nicht HIV-exponierten PBMC nicht in den Top10 gelistet.

Zu diesen Veränderungen, die durch die Behandlung mit Substanz #7 in PBMC unabhängig von der Anwesenheit des Virus hervorgerufen wurden, werden auch einige Prozesse aufgeführt, die spezifisch nur in HIV exponierten PBMC nach Substanz #7 Behandlung differentiell reguliert auftreten (Abbildung 34, rot umrahmt; s. 7.6, Tabelle A3). In der Datenbank für Signalwege werden diese HIV spezifischen Effekte mit *Apoptose* und *HIV Infektion* assoziiert, wobei bis auf eine Ausnahme keine der Kategorien in den Top10 gelistet wird.

MeSH-Terms, die in HIV exponierten Zellen spezifisch überrepräsentiert waren, werden alle mit *Immunerkrankungen* assoziiert und befinden sich allesamt in den Top10 Rängen.

Zusammenfassend zeigt die Proteomeanalyse nur geringfügige Effekte von Substanz #7 auf die allgemeine Proteinexpression von PBMC. Die Enrichment-Analyse dieser wenigen in der Expression differentiell regulierten Gene/Proteine deckte allgemeine Effekte, die in PBMC in Ab- und Anwesenheit von HIV auftreten, sowie HIV infektionsspezifische Veränderungen auf. Dies lässt darauf schließen, dass die Behandlung von PBMC mit dem Aureothin-Derivat #7 sowohl allgemeine als auch HIV spezifische Effekte hervorrufen kann.

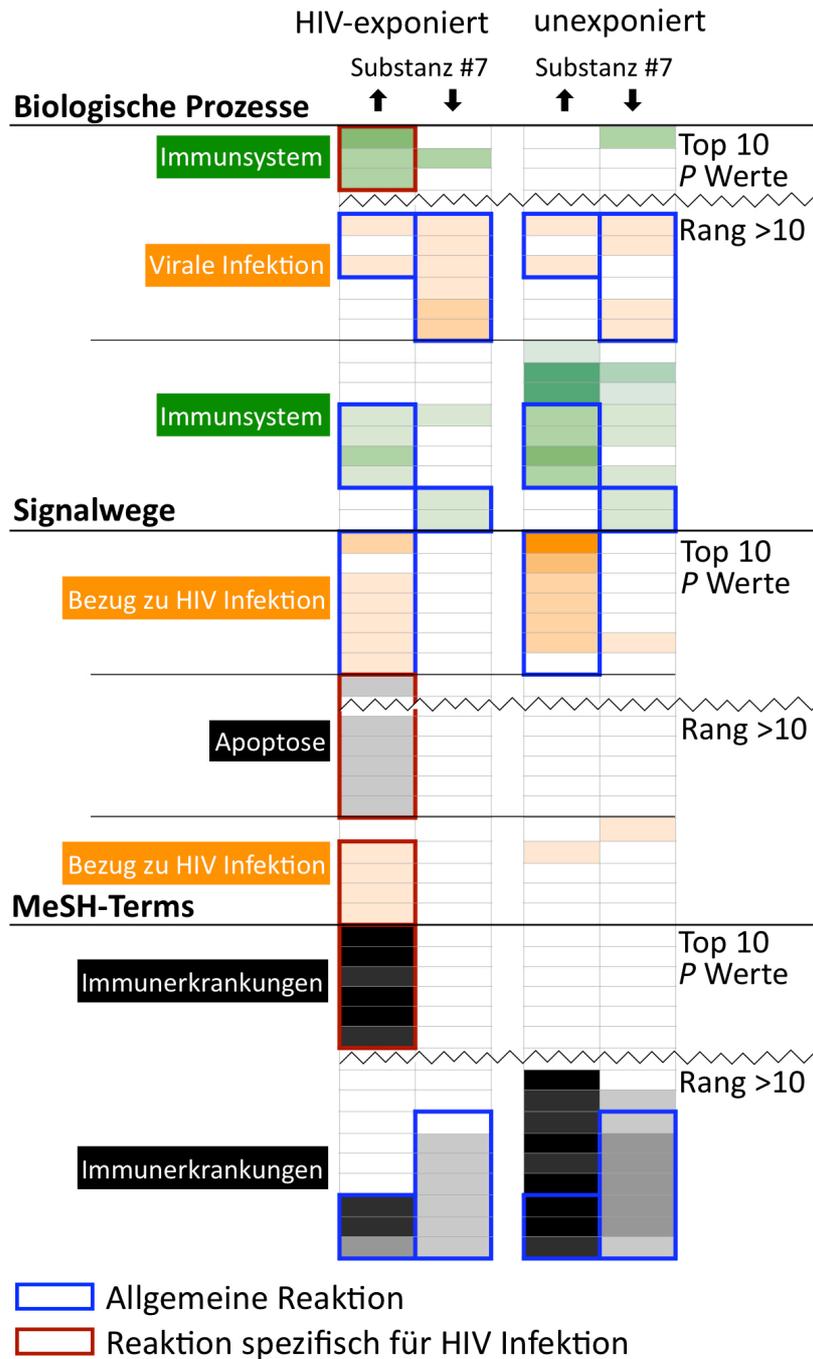


Abbildung 34. Zusammenfassung des Enrichment-Analyseprofils differenziell exprimierter Proteine in Substanz #7 behandelten PBMC. Es wurden PBMC Isolate aus drei verschiedenen Spendern verwendet, die jeweils als biologisches Replikat behandelt wurden. Die PBMC wurden entweder in Anwesenheit von HIV-1_{LAI} oder ohne Virusexposition mit Substanz #7 (100 nM) oder der Lösemittelkontrolle DMSO für 48 h behandelt, um anschließend Proteinisolate mittels GC/MS und Proteomicsanalyse zu untersuchen. Listen durch Behandlung mit Substanz #7 hoch- und runterregulierter Proteine wurden analysiert. Es wurden GO-terms, kanonische Signalwege und MeSH-terms, die vermehrt in entweder HIV-exponierten PBMC (↑ hochreguliert, ↓ runterreguliert) oder PBMC in Abwesenheit von HIV (↑ hochreguliert, ↓ runterreguliert) vorkommen, bestimmt und hier vereinfacht als Heatmap dargestellt (Details zu den einzelnen Kategorien s. 7.6, Tabelle A3). Übergeordnete Begriffsgruppen werden farbkodiert und in der Heatmap über Farbsättigung (in %) dargestellt: P Wert = % Farbsättigung: e^{-3} bis e^{-5} = 20, e^{-6} bis e^{-8} = 40, e^{-9} bis e^{-11} = 60, e^{-12} bis e^{-14} = 80, $\geq e^{-15}$ = 100. Allgemeine Effekte werden blau umrahmt dargestellt, für HIV-Exposition spezifische Effekte mit rotem Rahmen.

4.4 Untersuchung der anti-HIV Aktivität von Substanz #7 gegen HI Viren mit unterschiedlichem Tropismus

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, infiziert HIV eine Zelle durch Interaktion mit dem Hauptrezeptor CD4, sowie einen der beiden Korezeptoren CXCR4 oder CCR5. Viruspartikel, die den Korezeptor CCR5 ansteuern, werden als R5-trope Viren bezeichnet, solche, die mit CXCR4 interagieren, als X4-trop. Der Tropismus der Viruspartikel verändert sich im Verlauf einer HIV Infektion im Menschen. Während der akuten Phase zu Beginn der Infektion werden hauptsächlich Makrophagen über R5-trope Virionen infiziert. Erst nach einigen Jahren mit Ausbildung der AIDS Erkrankung zeigt sich eine deutliche Erhöhung der X4-tropen Viruspartikel (s. 1.1.3.5, Abbildung 7) (14,60,199).

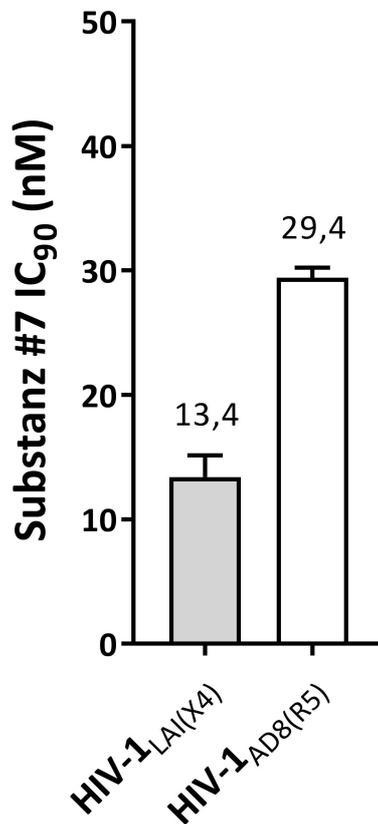


Abbildung 35. Antivirale Aktivität von Substanz #7 gegen HIV-Laborstämme mit unterschiedlichem Tropismus. LC5-RIC Zellen wurden mit dem X4-tropen Virusstamm HIV-1_{LAI} inokuliert und mit Beginn der Inokulation mit einer Verdünnungsreihe von Substanz #7 für 48 h behandelt, um im Anschluss den IC₉₀ Aktivitätswert von Substanz #7 zu bestimmen. LC5-RIC-R5 Zellen wurden mit dem R5-tropen Virusstamm HIV-1_{AD8} inokuliert und wie oben beschrieben auch mit Substanz #7 inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte der IC₉₀ Aktivitäten aus drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten (n = 3; m = 3), sowie deren Standardabweichung (SD).

Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit Substanz #7 die Replikation von Viren unterschiedlicher Tropismen in gleichem Maße reduzieren kann, wurden LC5-RIC bzw. LC5-RIC-R5 Zellen, wie in 3.2.2 beschrieben, mit dem X4-tropen Virus HIV-1_{LAI} bzw. dem R5-tropen Virus HIV-1_{AD8} inokuliert und simultan zur Inokulation mit Substanz #7 behandelt.

Der IC₉₀ Aktivitätswert des Aureothin-Derivates #7 liegt bei einer Behandlung des X4-tropen Virus HIV-1_{LAI} ungefähr 2-fach unter dem des R5-tropen Virus, jedoch führt eine Behandlung mit Substanz #7 in beiden Fällen zu einer höchst potenten Inhibition der Virusreplikation im niedrig nanomolaren Bereich (Abbildung 35).

4.5 Untersuchung der anti-HIV Aktivität von Substanz #7 gegen klinische Virusisolate verschiedener HIV-Genotypen

Wie einleitend beschrieben wurde, existieren viele phylogenetisch verschiedene Virusstränge von HIV, die in zwei Typen, HIV-1 und HIV-2, und nachfolgend in unterschiedliche Gruppen und Subtypen unterteilt werden können (17). Diese Vielfalt verschiedener Virusstämme zeigt sich besonders hinsichtlich des Replikationszyklus, aber auch der Empfindlichkeit einzelner Medikamente in der HIV-Therapie gegenüber. Aufgrund dessen wird in diesem Abschnitt der Dissertation insbesondere eine potentiell breite antivirale Anwendung der Behandlung mit Substanz #7 gegen HIV-Stämme unterschiedlicher Genotypen untersucht.

4.5.1 Anti-HIV Aktivität von Substanz #7 gegen verschiedene klinische Isolate

Aufgrund der Diversität verschiedener HIV-Stränge hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit in der HIV-Therapie, kann nicht jedes in der Klinik eingesetzte Medikament auch in jeder Therapie angewandt werden. Beispielsweise werden Fusionsinhibitoren wie Enfuvirtid (T-20) oder Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren wie Efavirenz (EFV) nur in der Therapie von HIV-1 Infektionen eingesetzt, bei HIV-2 Infektionen sind sie wegen der Unterschiede in der Struktur der Virusproteine äußerst ineffektiv (200,201).

Daher wurde der anti-HIV Effekt von Substanz #7 bei Infektionen von PBMC mit klinischen Virusisolaten unterschiedlicher Genotypen analysiert. Die verwendeten Viren repräsentieren folgende HIV Genotypen: HIV-1_{MVP899-87}: HIV-Typ 1, Major group (Gruppe M); HIV-1_{O_{MVP5180-91}}: HIV-Typ 1, Outlier group (Gruppe O); HIV-2_{MVP10668-93}: HIV-Typ 2. Wie in Abbildung 36 dargestellt, inhibiert Substanz #7 die Virusreplikation aller verwendeter HIV-Isolate gleichermaßen im niedrig nanomolaren Bereich. Substanz #7 zeigt in der Behandlung von HIV Infektionen in PBMC ein breites und hochpotentes Wirkspektrum gegen alle HIV-Genotypen.

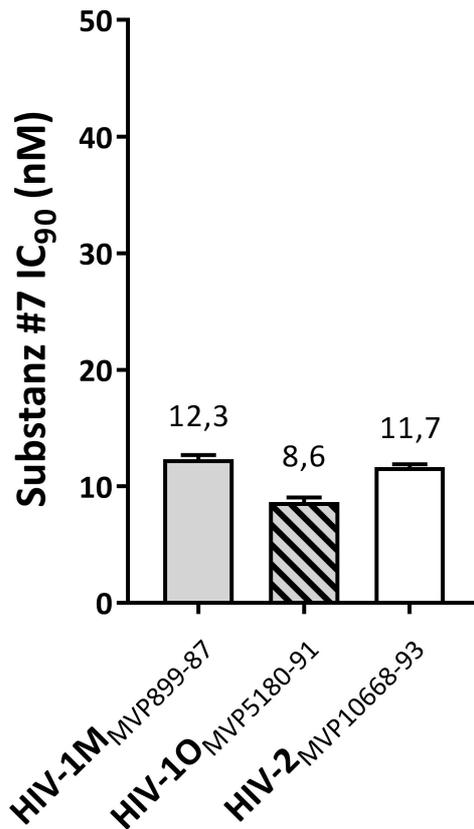


Abbildung 36. Antivirale Aktivität von Substanz #7 gegen HIV-Isolate mit unterschiedlichen Genotypen. PBMC wurden mit dem jeweiligen klinischen Virusisolat infiziert und mit einer Verdünnungsreihe von Substanz #7 für 48 h behandelt, um im Anschluss den IC₉₀ Aktivitätswert von Substanz #7 zu bestimmen. Die klinischen Virusisolate repräsentieren folgende HIV Genotypen: HIV-1M_{MVP899-87}: HIV-Typ 1, Major group (Gruppe M); HIV-1O_{MVP5180-91}: HIV-Typ 1, Outlier group (Gruppe O); HIV-2_{MVP10668-93}: HIV-Typ 2. Gezeigt sind die Mittelwerte der IC₉₀ Aktivitäten aus drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten (n = 3; m = 3), sowie deren Standardabweichung (SD).

4.5.2 Anti-HIV Aktivität von Substanz #7 gegen HIV-Isolat aus Patient mit vollständigem Therapieversagen

Eines der größten Probleme, die in der HIV-Therapie auftreten, ist das Aufkommen von HIV-Resistenzmutanten, die durch Mutation des Virusgenoms bei der Replikation entstehen können und im Zuge dessen im schlimmsten Fall zu vollständigem Therapieversagen führen (107,112).

Daher wurde die antivirale Aktivität von Substanz #7 gegen den Virusstamm HIV-1_{V13-03413B} getestet, ein HIV-1 Gruppe M Subtyp B Virus, das aus einem Patienten mit vollständigem Therapieversagen isoliert wurde und multiple Resistenzmutationen gegen verschiedene Wirkstoffe enthält (158). Hierfür wurden LC5-RIC Zellen mit HIV-1_{V13-03413B} oder dem Kontroll-HIV-Strang HIV-1_{LAI} inokuliert und simultan zur Inokulation mit Substanz #7 oder verschiedenen

Kontrollsubstanzen behandelt, um eine mögliche Abnahme der anti-HIV Aktivität der Substanzen bei der Behandlung des Virus mit multiplen Resistenzmutationen gegenüber der Behandlung des Laborstammes zu analysieren. Wie in Abbildung 37 dargestellt, inhibiert Substanz #7 sowohl die Virusreplikation des Patientenisolates HIV-1_{V13-03413B} mit multiplen Resistenzmutationen als auch die Replikation des Kontrollvirus HIV-1_{LAI} gleichermaßen potent im niedrig nanomolaren Bereich. Hingegen lässt die antivirale Aktivität der beiden Referenzsubstanzen Efavirenz und Dolutegravir gegen HIV-1_{V13-03413B} um das 10- bzw. 100-fache im Vergleich zur Wirkung gegen HIV-1_{LAI} nach.

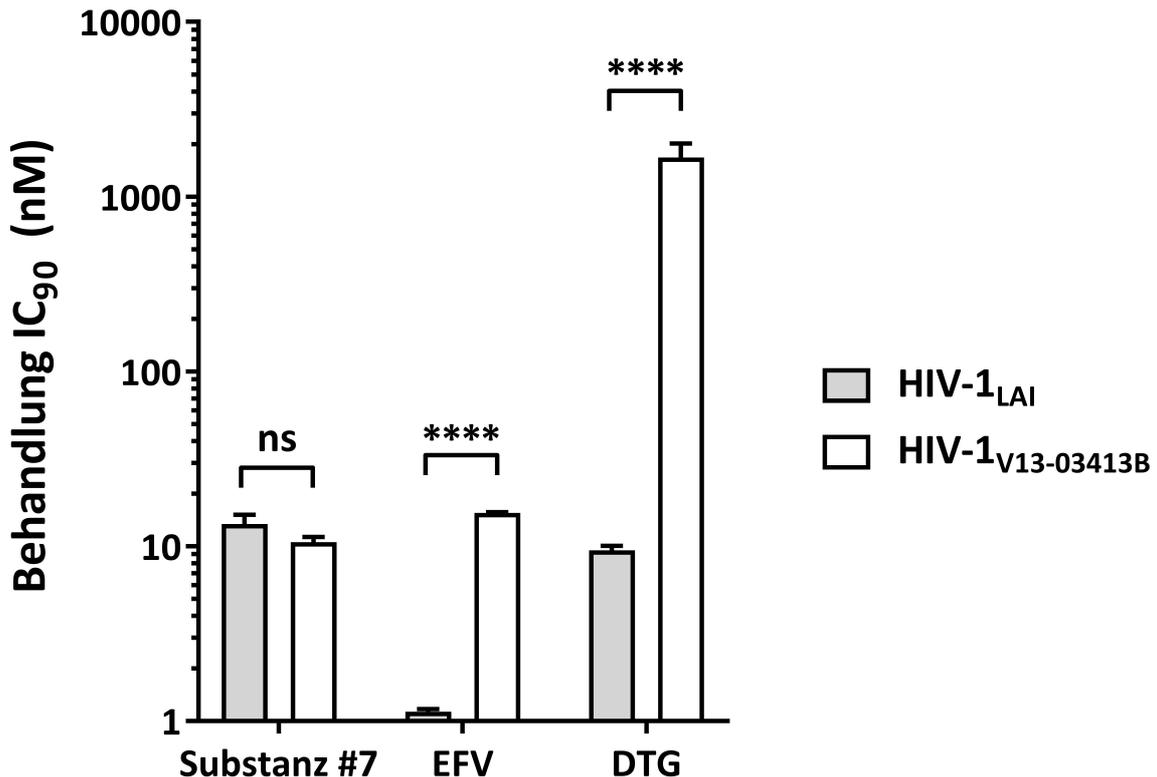


Abbildung 37. Antivirale Aktivität von Substanz #7 gegen ein HIV-Isolat aus einem Patienten mit vollständigem Therapieversagen. LC5-RIC Zellen wurden entweder mit dem klinischen Virusisolat HIV-1_{V13-03413B}: HIV-Typ 1, Gruppe M Subtyp B, einem Patientenisolat mit multiplen Resistenzmutationen gegen verschiedene Wirkstoffe (158), oder dem Kontrollstamm HIV-1_{LAI} inokuliert und mit Beginn der Inokulation mit Verdünnungsreihen von Substanz #7 oder den Kontrollsubstanzen Efavirenz (EFV, NNRTI) bzw. Dolutegravir (DTG, Integraseinhibitor) für 48 h behandelt, um im Anschluss deren IC₉₀ Aktivitätswerte zu bestimmen. Gezeigt sind die Mittelwerte der IC₉₀ Aktivitäten aus drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten (n = 3; m = 3), sowie deren Standardabweichung (SD). Um zu prüfen, ob sich die IC₉₀ Aktivitätswerte der jeweiligen Substanzen zwischen den zur Infektion eingesetzten Viren statistisch signifikant ($P < 0.05$) unterscheiden, wurde ein Student's t-Test durchgeführt. Die Werte der statistischen Signifikanz (P Werte) sind durch Sternchen (*) angezeigt. * $P \leq 0.1$, **** $P \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigen die vorangegangenen Ergebnisse, dass Substanz #7 die Replikation sowohl beider Virustypen, HIV-1 und HIV-2, als auch eines multiresistenten klinischen Virusisolates hochwirksam inhibieren kann.

4.6 Untersuchung der anti-HIV Aktivität von Substanz #7 in Kombination mit klinisch angewandten Medikamenten

Wie schon in vorherigen Abschnitten erwähnt, werden Patienten in der momentanen HIV-Therapie mit einem Medikamentencocktail aus drei verschiedenen Wirkstoffen behandelt. Hierbei liegt der Fokus auf der Inhibition der Reversen Transkriptase, es werden meist zwei nukleosidische RT-Inhibitoren (NRTI) mit einem Medikament mit anderem Wirkmechanismus kombiniert (92). Da Monotherapien in der Vergangenheit aufgrund schnell aufkommender Resistenzmutationen gegen einzelne Medikamente beschleunigt zu Therapieversagen führte, werden neu entwickelte Medikamente in Zukunft wahrscheinlich ebenso in Kombination mit anderen Wirkstoffen verabreicht (92,93,107).

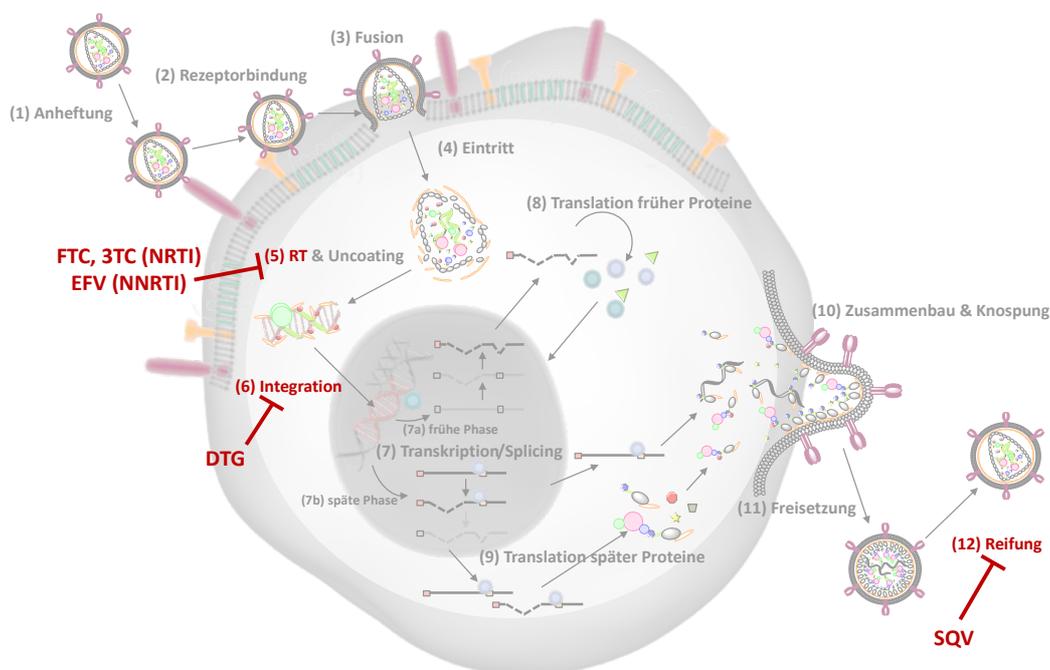


Abbildung 38. Übersicht der in den Kombinationsassays verwendeten, für cART zugelassenen Medikamente und ihrer Angriffspunkte im Replikationszyklus von HIV. Als Kombinationspartner wurden die beiden NRTI Emtricitabin (FTC) und Lamivudin (3TC), der NNRTI Efavirenz (EFV), der Integraseinhibitor Dolutegravir (DTG), sowie der Proteaseinhibitor Saquinavir (SQV) verwendet.

Um zu überprüfen, ob Substanz #7 sich für die Kombination mit in der HIV-Therapie eingesetzten Medikamenten eignet, wurde die anti-HIV Aktivität verschiedener Kombinationen aus Substanz #7 und jeweils eines für die Klinik relevanten Wirkstoffes verschiedener Wirkmechanismen untersucht. Abbildung 38 zeigt die Angriffspunkte der verwendeten zugelassenen Kombinationspartner im Replikationszyklus.

Hierfür wurden LC5-RIC Zellen wie in 3.2.7 beschrieben mit HIV-1_{LAI} inokuliert und simultan zur Inokulation sowohl mit Verdünnungsreihen einer Kombination aus Substanz #7 und entweder eines RT- (FTC, 3TC, EFV: Abbildung. 39A-C), Integrase- (DTG: Abbildung 39D) oder Protease-Inhibitors (SQV: Abbildung 39E), als auch mit Verdünnungsreihen der Einzelkomponenten behandelt. Nach Ermittlung der antiviralen Aktivitäten von Einzel- und Kombinationsbehandlungen mittels EASY-HIT Assay wurden die jeweiligen Kombinationsindices (CI) der effektiven Dosen bei 75 % (ED₇₅), sowie 90 % (ED₉₀) Inhibition und Isobologramme mithilfe des Chou-Talalay Theorems berechnet (186,202). Als Referenz diente eine Kombination aus FTC und EFV (Abbildung 39F), deren kombinatorische Inhibition der HIV Infektion *in vitro* schon als synergistisch beschrieben wurde (203). Sowohl die Lage der Datenpunkte im Isobologramm im linken Feld unter der Hypothenuse als auch die Kombinationsindices für ED₇₅ und ED₉₀, welche einen Wert <0,7 betragen, bestätigen die Synergie zwischen beiden Referenzsubstanzen (Abbildung 39F). Substanz #7 zeigt sowohl in Kombination mit den NRTI FTC und 3TC als auch mit dem Integraseinhibitor DTG starke synergistische Inhibition der HIV Infektion bei ED₇₅, sowie ED₉₀. Eine Kombination aus Substanz #7 und dem NNRTI EFV zeigt nur bei hohen Konzentrationen (ED₉₀) eine synergistische Wirkung, während das Zusammenspiel beider Wirkstoffe bei niedrigeren Konzentrationen eher additive Effekte aufweist (CI = 0,95). In Kombination mit dem Proteaseinhibitor SQV zeigt Substanz #7 bei hohen Konzentrationen lediglich additive Effekte (CI = 0,86). Zudem scheint deren gemeinsame anti-HIV Aktivität bei niedrigeren Konzentrationen sogar antagonistische Auswirkungen zu haben (CI > 1,2).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Substanz #7 in Kombination mit ausgewählten anti-HIV Medikamenten wie den NRTI FTC und 3TC oder dem Integraseinhibitor DTG eine starke synergistische Wirkung während der Behandlung der HIV Infektion *in vitro* aufweist.

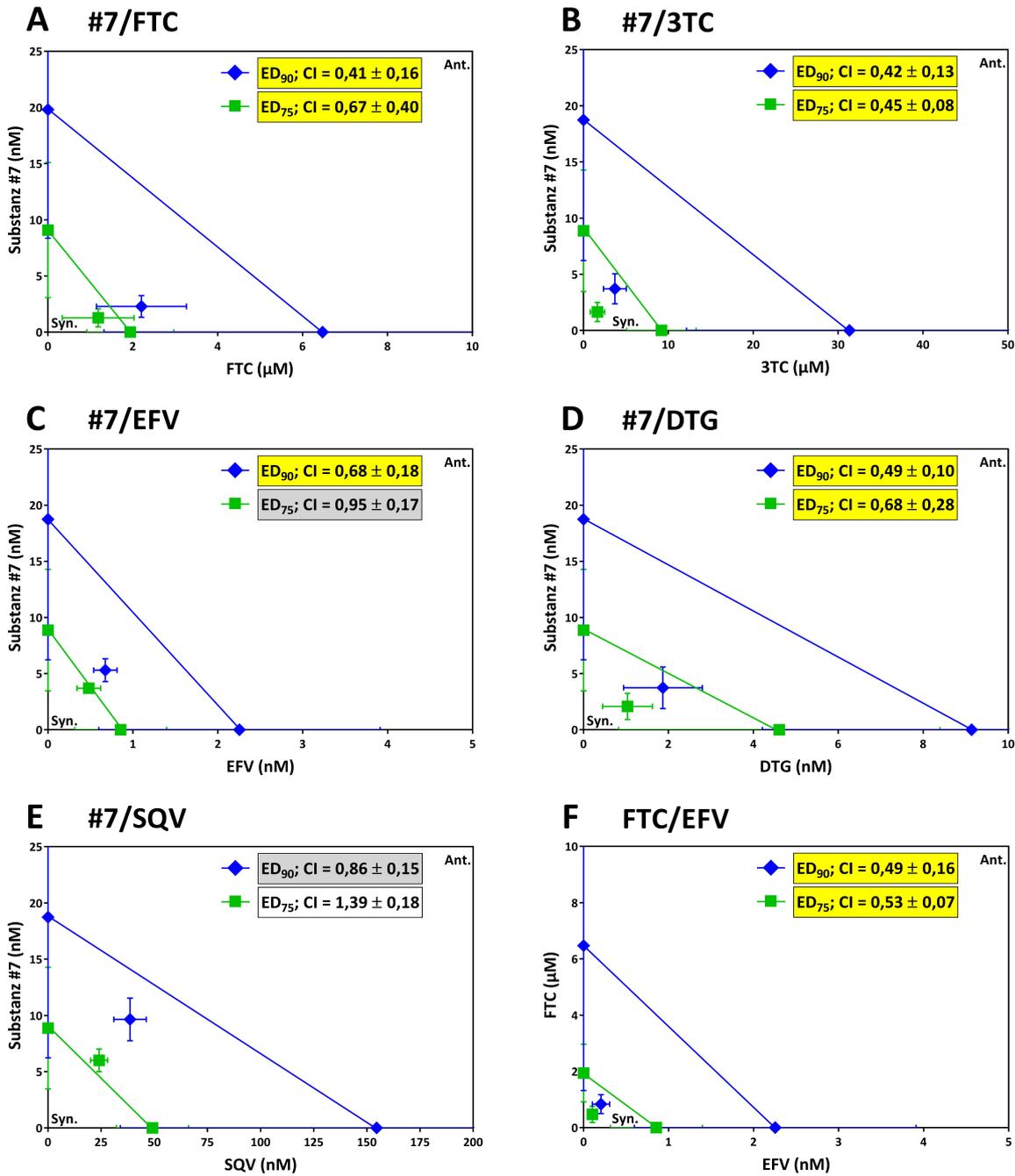


Abbildung 39. Antivirale Aktivitäten von Kombinationen aus Substanz #7 und verschiedenen anti-HIV Medikamenten. Kombination aus Substanz #7 mit klinischen anti-HIV Medikamenten führt zu synergistischen antiviralen Aktivitäten in HIV-1_{LAI} infizierten und behandelten LC5-RIC Zellen. Dargestellt sind die Kombinationsindizes (CI; Synergie - 0,3 bis 0,7/gelb, moderate Synergie - 0,7 bis 0,85, additiv - 0,85 bis 1,20/grau, Antagonismus >1,20/weiß (202,203)) und Isobologramme der Kombinationstherapien (Syn. = Synergie, Datenpunkte liegen links zur jeweiligen Hypotenuse; Ant. = Antagonismus, Datenpunkte liegen rechts zur jeweiligen Hypotenuse) aus Substanz #7 und entweder den RTI **(A)** Emtricitabin (FTC), **(B)** Lamivudin (3TC) oder **(C)** Efavirenz (EFV), **(D)** dem Integraseinhibitor Dolutegravir (DTG) oder **(E)** dem Proteaseinhibitor Saquinavir (SQV), inklusive der effektiven Dosis für eine Inhibition von 90 % (ED₉₀, blaue Raute) oder 75 % (ED₇₅, grünes Quadrat). **(F)** Die Kombination aus zwei in der Klinik angewandten Medikamenten, EFV und FTC, wurde als Referenz eingesetzt. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten (n ≥ 3; m = 3) und deren Standardabweichung (SD).

5. Diskussion

5.1 Substanz #7 wird aufgrund seiner optimierten anti-HIV Aktivität, Toxizität und Photostabilität in den SAR Studien zur zukünftigen Leitsubstanz der neuen Substanzklasse MAGIC

Zu Beginn der Wirkstoffentwicklung steht immer die Charakterisierung der chemischen Eigenschaften einer Testsubstanz und deren Einfluss auf das verwendete System, sowie die Untersuchung der Wirkstofftoxizität, die sogenannte „Drug Safety“. Diesen Fragestellungen wurde auch in dieser Dissertation nachgegangen. Den Ausgangspunkt bildeten hierfür die beiden chemisch verwandten Naturstoffe Aureothin und Neoaureothin, die im Laufe eines Hochdurchsatz-Screenings einer Naturstoffbibliothek von über 10.000 Substanzen in einem zellulären System (EASY-HIT (144)) auf ihre anti-HIV Aktivität untersucht und aufgrund ihrer hochpotenten antiviralen Aktivität ($IC_{50} < 6$ nM) zur weiteren Charakterisierung ihrer Stoffeigenschaften ausgewählt worden waren. Die anti-HIV Aktivität beider Substanzen bewegt sich auf dem gleichen Niveau wie auch die Effektivität der in der HIV-Therapie eingesetzten Wirkstoffe Efavirenz, Dolutegravir oder Saquinavir (s. 4.2, Tabelle 17).

Sowohl Aureothin als auch Neoaureothin sind lange bekannte Naturstoffe und wurden aufgrund ihrer mannigfaltigen Aktivitäten vielfach untersucht und totalsynthetisch, sowie biosynthetisch hergestellt (159-161,165-167,169). Besonders Aureothin stand wie auch in dieser Dissertation im Fokus der Untersuchungen. Zu den für Aureothin beschriebenen biologischen Aktivitäten zählen antibakterielle (159,204), antiproliferative/antitumor (166-168), antimitochondriale (205), antifungale (166,168), antitrypanosomale (206), sowie insektizide (166) und pestizide (166) Wirkungen.

Auch anti-HIV Effekte, die in dieser Dissertation im Detail untersucht werden, wurden für Aureothin schon gezeigt und patentiert (207,208). Allerdings besitzt Aureothin verschiedene Eigenschaften, die es nur unzureichend zum Arzneimittel qualifizieren. Zum einen trägt das Molekül eine für die „Drug Safety“ kritische Nitrogruppe (163) in para-Position des Benzolrings (s. 1.2.3, Abbildung 14, #1). Zum anderen ist Aureothin äußerst photoinstabil (162). Im Verlauf dieser Arbeit sollten diese für die Wirkstoffentwicklung unfavorisierten Eigenschaften optimiert werden, weswegen Aureothin als Grundlage für die Erstellung einer ganz neuen Stoffgruppe totalsynthetisch hergestellter Aureothin-Derivate, den MAGIC („Multiple Antiviral γ -Pyrone Inspired Compounds“) Substanzen (s. 1.2.3, Abbildung 14), herangezogen wurde. Die neu geschaffenen Aureothin-Derivate wurden im Anschluss durch weitreichende SAR-Studien hinsichtlich ihrer anti-HIV Aktivität, Photostabilität, sowie der Toxizität genauer analysiert. Hierfür

wurden an unterschiedlichen Punkten der Molekülstruktur chemische Änderungen durchgeführt (s. 4.1.1, Abbildung 18). Um vor allem die Nitrogruppe aus dem Molekül zu ersetzen, wurden Substituenten mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften (u.a. polare/unpolare Gruppen, Halogene) an verschiedenen Positionen (ortho, meta, para) des Benzolring eingefügt. Zudem wurde der Einfluss des Dien-Linkers, des elektrophilen Zentrums im γ -Pyroneering, sowie der Konfigurationsisomerie an verschiedenen Stereozentren auf die antivirale Wirkung, die Photostabilität und Zytotoxizität anhand unterschiedlicher Derivate untersucht.

Die anti-HIV Aktivität aller MAGIC Substanzen wurde sowohl in LC5-RIC Zellen als auch in PBMC bestimmt. Hierbei war es möglich alle Substanzen anhand ihrer IC_{90} Werte im Vergleich zu Aureothin in drei Gruppen stark- ($<10x$ IC_{90} von Aureothin), mittel- ($10-25x$ IC_{90} von Aureothin), sowie schwachwirksamer ($>25x$ IC_{90} von Aureothin) Substanzen einzuteilen (s. 4.1.1, Tabelle 14). Diese Einteilung der Substanzen nach ihren anti-HIV Aktivitäten führt für beide Zellsysteme zu einer vergleichbaren Zuordnung. Werden jedoch IC_{50} und IC_{90} Werte einzelner Substanzen innerhalb eines Systems miteinander verglichen, ergeben sich teilweise völlig unterschiedliche Wirkungsspektren. Während es bei Substanz #7 lediglich einen 3-fachen Unterschied zwischen IC_{50} und IC_{90} Wert gibt, liegen bei Substanz #3 beide Werte knapp 360-fach auseinander (s. 4.1.1, Tabelle 14). Je steiler die Wirkungszunahme einer Substanz, desto einfacher ist es eine für die Inhibition ausreichende Konzentration verabreichen zu können. Gerade bei der Behandlung virologischer Erkrankungen ist eine effektive und vollständige Inhibition erstrebenswert, da sich ansonsten bei zu geringen Konzentrationen ein zur Etablierung von replikationsfähigen Virusmutanten günstiger Selektionsdruck aufbaut, wodurch es schneller zum Therapieversagen kommen kann (107). Dieses Problem kommt verstärkt bei Patienten mit unzureichender Therapietreue zum Tragen (110,111).

5.1.1 Pharmakologisch unfavorisierte Nitrogruppe kann besonders durch Fluorierung ohne Verlust der anti-HIV Aktivität ersetzt werden

Vergleicht man nun die antiviralen Effekte einzelner MAGIC Substanzen im Detail, lassen sich teils klare Regeln zum Einfluss einzelner chemischer Elemente auf die anti-HIV Wirkung ableiten. In erster Linie wurde die pharmakotoxisch ungünstige Nitrogruppe in para-Position des Phenylrestes durch chemisch sehr verschiedene Substituenten ersetzt (s. 4.1.1.1, Abbildung 19). Gerade eine Substitution mit halogenhaltigen Resten wie die Trifluormethylgruppe bei Substanz #7, aber auch einfaches Fluor (#6) oder Chlor (#3), sowie Substituenten, die das aromatische System des Benzolringes erweitern, wie beispielsweise durch die Dimethylaminogruppe bei Substanz #21 oder

durch eine weitere Phenylgruppe (Substanz #19) wirkt sich positiv auf den Erhalt der anti-HIV Aktivität aus. Besonders Substanz #7, dessen IC_{90} Wert sogar leicht unter dem IC_{90} von Aureothin liegt, zeigt, dass die Nitrogruppe ohne Verlust der anti-HIV Aktivität ersetzt werden kann. Jedoch können nicht alle halogensubstituierten MAGIC Substanzen der Gruppe hochwirksamer Substanzen zugeordnet werden. Während die antivirale Wirkung bei Substitution mit fluorhaltigen Resten (Substanz #6, #7, #14) im Vergleich zu Aureothin kaum abnimmt, sind Derivate mit Chlorsubstituenten an gleicher Stelle (Substanz #3, #13) immer schwächer einzuordnen. Die Fluorierung von Substanzen ist in der Wirkstoffentwicklung ein häufig verwendetes Werkzeug, um die pharmazeutischen und biologischen Eigenschaften von Wirkstoffkandidaten zu verbessern. Auch einige der sich bereits auf dem Markt befindlichen HIV-Medikamente wie beispielsweise Emtricitabin, Raltegravir, Dolutegravir, Elvitegravir oder Efavirenz enthalten Fluor- oder Trifluormethylreste in ihrer Molekülstruktur (209). Der Einsatz sterisch anspruchsvoller Substituenten wie *tert*-Butylresten (Substanz #9), sowie starkpolarer Carboxyl- (#18) oder Methylsulfonamidgruppen (#11) führte zu sehr starkem Verlust der antiviralen Wirkung. Diese Abnahme der Aktivität ist vor allem bei Substanzen mit polaren Substituenten auf die deutlich verminderte Aufnahme in die Zelle zurückzuführen. In dieser Dissertation nicht im Detail gezeigte Experimente zur Aufnahme von Substanz #7 und #18 in behandelte Zellen bestätigen mithilfe massenspektrometrischer Messungen, dass sich die fluorsubstituierte Substanz #7 nach 4 h Behandlung in erhöhter Konzentration im Zytoplasma der behandelten LC5-RIC Zellen befindet, während die polare Substanz #18 nach gleicher Inkubationszeit nicht nachzuweisen ist. Die erhöhte Polarität der Carboxylgruppe im Molekül unterbindet eine einfache Diffusion des MAGIC-Derivates durch die Lipidmembran ins Zytoplasma.

5.1.2 Substituenten in ortho-/para-Position des Benzolrings führen im Vergleich zu gleichen Substituenten in meta-Stellung zu stärker antiviral wirksamen MAGIC Substanzen

Werden gleiche Substituenten wie im Falle des Chlorrestes der Substanzen #3, #4 und #5 an ortho-, meta- oder para-Position im Benzolring platziert, beeinflusst dies die antivirale Aktivität der jeweiligen Substanzen. Substanz #4 mit Chlor in meta-Stellung zeigt hierbei einen rund 8-fach schwächeren anti-HIV Effekt als die beiden ortho- und para-Derivate (s. 4.1.1.2, Abbildung 20). Ähnliches zeigt sich bei den Substanzen #7 und #15, die eine Trifluormethylgruppe in para- bzw. meta-Position tragen. Auch hier inhibiert das meta-Derivat #15 die HIV Infektion rund 5-fach schwächer als Substanz #7 mit dem gleichen Substituenten in para-Position. In beiden Fällen

könnte dies auf mesomeriestabilisierende Effekte der Substituenten in ortho-/para-Stellung zurückzuführen sein. Der Chlorsubstituent erhöht die Elektronendichte des aromatischen Ringsystems durch einen positiven mesomeren Effekt (+M-Effekt) unabhängig von der Position des Substituenten. Jedoch resultiert dies in ortho- und para-Stellung im Vergleich zur meta-Position in mehr energetisch günstigeren mesomeren Grenzstrukturen, die möglicherweise zu einem positiven Effekt auf die antivirale Aktivität des Aureothin-Derivates beitragen (193). Dieser +M-Effekt fehlt der Trifluormethylgruppe der Substanzen #7 und #15, dieser Substituent erzeugt durch die stark elektronegativen Fluoratome lediglich einen elektronenziehenden negativen induktiven –I-Effekt (193). Dieser fehlende +M-Effekt könnte eine mögliche Erklärung für den geringeren Unterschied der antiviralen Wirkung zwischen #7 und #15 im Vergleich zu #3 bzw. #5 und #4 geben. Insgesamt sind ortho- und para-Stellung hinsichtlich der anti-HIV Aktivität der MAGIC Substanzen gegenüber der meta-Position favorisiert.

5.1.3 Lineare und rigide Form der Molekülstruktur ist essentiell für die anti-HIV Aktivität der MAGIC Substanzen

Des Weiteren wurden auch Änderungen am Dien-Linker zwischen Benzol- und Tetrahydrofuranring von Aureothin, der das aromatische π -Elektronensystem über den Benzylrest hinaus ausweitet und dem Molekül ein relativ starres Rückgrat verleiht, chemisch verändert, um dessen Einfluss auf die antivirale Aktivität zu untersuchen. Im Verlauf der SAR Studien wurden unter anderem Substanzen getestet, deren Flexibilität durch teilweise (Substanz #22) oder vollständige (Substanz #23) Sättigung dieser Achse erhöht wurde (s. 4.1.1.3, Abbildung 21). Bei beiden Substanzen führt die Sättigung des Linkers zu einem enormen Verlust der anti-HIV Aktivität, während das einfach gesättigte Derivat #22 rund 20-fach schwächer wirkt, reduziert sich der Effekt des vollständig gesättigten Aureothin-Derivates #23 sogar um das 100-fache. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ableiten, dass die Starrheit des Dien-Linkers essentiellen Einfluss auf die anti-HIV Aktivität der MAGIC Substanzen hat. Möglicherweise erschwert die hohe Flexibilität der teilweise bzw. vollständig gesättigten Linker der Substanzen #22 bzw. #23 die Bindung mit einem Zielmolekül, wodurch die optimale Interaktion mit der Bindetasche stark beeinträchtigt wird.

Neben der Erhöhung der Flexibilität des Linkers durch Sättigung der Doppelbindungen wurde auch versucht durch Änderung der Konfiguration dieses molekularen Rückgrats Einfluss auf die antivirale Aktivität der jeweiligen Substanz zu nehmen. Daher wurden Stereoisomere synthetisiert, die sich nur in der Konfiguration des Tetrahydrofuranring-nahen Stereozentrums unterscheiden. Die ursprüngliche Z/cis-Stellung dieses Stereozentrums führt, wie auch bei Aureothin, zu einer sehr

linearen Struktur des Moleküls. Liegt jedoch die E/trans-Stellung an dieser Stelle vor, nimmt das Molekül eine eher gekrümmte Struktur an (s. 4.1.1.4, Abbildung 22). Die Analyse der anti-HIV Wirkung der gegenübergestellten Isomerenpaare der Substanzen #13 und #33, sowie #28 und #29 ergeben in beiden Fällen das gleiche Bild: die linearen Substanzen #13 und #28 mit Stereozentrum in Z/cis Stellung inhibieren HIV 7-8-fach effektiver als die jeweils korrespondierenden E/trans-Isomere #33 und #29. Die hier vorliegenden Daten zur Konfigurationsisomerie bestätigen die Aussagen aus dem vorherigen Absatz zur Sättigung und Flexibilität dieser Molekülstruktur und verdeutlichen einmal mehr die Wichtigkeit des Dien-Linkers für die anti-HIV Wirkung der MAGIC Substanzen. Ein geradliniges, rigides Rückgrat des Moleküls wird gegenüber eines starren, aber gekrümmten, oder auch flexiblen Linkers stark bevorzugt. Dies deutet möglicherweise auf eine röhren- oder spaltähnliche Struktur der Bindetasche hin, in die das Molekül nur in der entsprechend optimalen Konformation hineinpasst.

5.1.4 Elektrophiles Zentrum im γ -Pyroneering spielt keine Rolle bei der Bindung an ein mögliches Zielmolekül

Durch die $-I$ -Effekte der Sauerstoffatome im γ -Pyroneering des Moleküls, sowie des 2-Methoxysubstituenten entsteht ein elektrophiles Zentrum am verbundenen C-Atom, das als Angriffspunkt für einen nukleophilen Angriff durch ein mögliches Zielmolekül theoretisch empfänglich wäre (193). Daher wurden Aureothin-Derivate synthetisiert, bei denen die Methoxy- durch eine auch in natürlichen γ -Pyroneen enthaltene Ethylgruppe ersetzt wurde (210), um den Einfluss des elektrophilen Zentrums auf die anti-HIV Aktivität zu analysieren (s. 4.1.1.5, Abbildung 23). Aufgrund der mangelnden Elektronegativität der Ethylgruppe, geht der elektronenziehende $-I$ -Effekt verloren und das elektrophile Zentrum wird abgeschwächt, wodurch kein nukleophiler Angriff eines Bindungspartners mehr möglich sein sollte (193). Der Einfluss des elektrophilen Zentrums auf die anti-HIV Aktivität der in dieser Dissertation verwendeten Substanzpaare, bestehend aus den methoxysubstituierten Substanzen #7 bzw. #30 und ihrer jeweiligen Ethylanaloga #27 bzw. #29, wirkt sich komplett verschieden aus. Während die antivirale Wirkung des Ethyl-Derivates #29 gegenüber seines Methoxyanalogs #30 nur unbedeutend um das 1,3-fache abgeschwächt ist, verliert Substanz #27 durch Ersetzen der Methoxy- durch die chemisch neutrale Ethylgruppe im Vergleich zu ihrem Äquivalent #7 das 11,5-fache ihrer anti-HIV Aktivität. Allerdings ist der IC_{90} Wert von Substanz #28, einer Vorstufe in der Totalsynthese von Substanz #27, im Vergleich zum IC_{90} Wert von Substanz #7 nur um das 2-fache erhöht. Aufgrund dieses eher schwachen Einflusses des elektrophilen Zentrums am γ -Pyroneering kann geschlossen werden,

dass es sich hierbei eher nicht um eine Angriffsstelle für eine kovalente Bindung zu einem Zielmolekül handelt.

5.1.5 Besonders halogenierte MAGIC Substanzen zeigen eine stark verbesserte Photostabilität

Wie in den vorherigen Abschnitten aufgezeigt wurde, wirkt sich eine chemische Veränderung der Aureothinstruktur unterschiedlich stark auf die anti-HIV Aktivität der einzelnen MAGIC-Derivate aus. Daher stellte sich die Frage, ob diese Änderungen auch andere Moleküleigenschaften beeinflussen und beispielsweise teils toxische Effekte des Naturstoffs Aureothin abmildern oder gar dessen extreme Photolabilität aufheben können.

Die Charakterisierung der Photostabilität aller in dieser Arbeit verwendeter MAGIC Substanzen ergab ein sehr diverses Bild. Wie die Naturstoffe Aureothin und Neoareothin, büßten auch einige Substanzen wie #10, #16, #17, #18 oder #21 den Großteil ihrer antiviralen Aktivität nach direkter Belichtung ein. Allerdings waren einige chemische Änderungen auch erfolgreich und führten zu einer ganzen Reihe von photostabilen Substanzen, wie beispielsweise #4, #7, #9 oder #13 (s. 4.1.2, Abbildung 24). Hierbei weisen vor allem MAGIC-Derivate mit Halogensubstituenten am Benzolring wie die Substanzen, #4, #7, #13, #14 und #15 eine extrem verbesserte Photostabilität auf. Vergleicht man nun die Photostabilität mit der anti-HIV Wirkung der jeweiligen Substanzen, lassen sich keine direkten Rückschlüsse auf strukturelle Zusammenhänge zwischen der anti-HIV Aktivität und der Photostabilität der jeweiligen Substanzen ziehen, da sowohl photostabile als auch -labile Substanzen in schwach-, sowie starkantiviral wirksame Gruppen unterteilt werden können. Beispielsweise zählen Substanzen wie #4 (Halogen in un favorisierter meta-Stellung am Benzolring) oder #9 (sterisch ungünstige *tert*-Butylgruppe am Benzolring) zu den Derivaten mit schwacher anti-HIV Aktivität, zeigen aber eine stark verbesserte Photostabilität im Vergleich zu Aureothin, während starkwirksame Substanzen wie #21 (Dimethylaminogruppe am Benzolring) immer noch photolabil sind. Dem entgegengesetzt korrelieren bei Substanzen wie #7, #14 und #15 (allesamt mit Trifluormethylrest am Benzolring) die anti-HIV Aktivität und die hohe Photostabilität, wodurch diese MAGIC-Derivate im Vergleich zu Aureothin zu besseren Wirkstoffkandidaten werden.

5.1.6 Austausch der pharmakologisch un favorisierten Nitrogruppe führt zu einer starken Verbesserung der toxikologischen Eigenschaften der MAGIC Substanzen

Die Mitglieder der aus dieser Doktorarbeit hervorgegangenen neuen Substanzgruppe MAGIC wurden auch hinsichtlich ihrer Toxizität in den verwendeten Zellsystemen untersucht. Die anfänglich aufgeführten vielfältigen biologischen Wirkungen des Naturstoffes Aureothin (166,204,205) ließen vermuten, dass es bei der zellulären Behandlung mit MAGIC-Derivaten möglicherweise zu toxischen Nebeneffekten käme. Daher wurde die Toxizität mit einer Reihe unterschiedlicher Assays untersucht, die eine detaillierte Übersicht hinsichtlich direkter toxischer Auswirkungen (CellTox™ Green), sowie potentiell negativer Effekte auf sowohl den allgemeinen (CellTiter-Blue®) als auch den mitochondrialen Metabolismus (CellTiter-Glo®) liefern können (181). Aureothin zeigte in den verwendeten PBMC toxische Wirkungen ab Konzentrationen von 2 µM im CellTiter-Glo® Assay (s. 4.1.3, Tabelle 15). Diese Daten sind besonders interessant, da man hier den Einfluss einer Substanz auf die ATP Produktion der Zelle messen kann. Der Hauptanteil des zellulären ATPs wird mithilfe der mitochondrialen Atmungskette synthetisiert, weswegen diese Daten Aureothin eine Wirkung auf Mitochondrien attestieren und somit mit den Funden von Friedrich *et al.* aus dem Jahr 1994 einhergehen (205). Aus der Analyse der Assaydaten für alle MAGIC-Derivate geht hervor, dass sich nahezu keine der Substanzen bis zur maximal eingesetzten Dosis von 10 µM negativ auf die behandelten PBMC auswirkt. Lediglich Substanz #15 inhibiert die ATP Produktion behandelter Zellen in vergleichbarem Maße zur Wirkung von Aureothin. Daraus ergibt sich, dass die Entfernung der toxischen Nitrogruppe (163) aus der Molekülstruktur von Aureothin erfolgreich zu einer Verbesserung der zellulären Verträglichkeit in den behandelten PBMC führt.

5.1.7 Leitsubstanz #7 zeigt orale Bioverfügbarkeit in ersten Experimenten mit Mäusen

Auf der Grundlage der in dieser Dissertation erarbeiteten Daten zur SAR der MAGIC Substanzgruppe, hinsichtlich der anti-HIV Aktivität, Photostabilität und Toxizität, konnte eine Leitsubstanz für alle weiteren Untersuchungen zur Wirkungsweise der Substanzen ausgewählt werden. Nach Vergleich aller Parameter kristallisierten sich Substanz #7 und #14 aufgrund ihrer starken anti-HIV Wirkung, sowie der enorm verbesserten Photostabilität und optimierten Zellverträglichkeit als mögliche Leitsubstanzen für die weiterführenden Arbeiten heraus. Parallel zu den Arbeiten dieser Dissertation wurden weiterführende *in vitro* ADME Untersuchungen zur Caco-2 Permeabilität, Plasmaproteinbindung, Plasmaproteinstabilität, Bindung an hERG Rezeptoren, sowie zur Stabilität in Lebermikrosomen bei einer Auswahl von Substanzen von der

Firma Bienta durchgeführt (147,194). Nach Einsicht und Vergleich der ADME Analyse von Substanz #7 und #14, fiel die Entscheidung aufgrund einer 15-fach besseren Caco-2 Permeabilität und einer geringeren hERG-Bindung zu Gunsten von Substanz #7 als Leitsubstanz für alle weiteren Experimente aus.

Zudem wurden bereits erste pharmakologische Experimente mit der Leitsubstanz #7 zur Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik nach intravenöser, sowie oraler Gabe in Mäusen von der Firma Bienta durchgeführt. Anhand einer Faustregel zur oralen Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen, den „Rule of Five“, kann abgeschätzt werden, ob ein neuer Wirkstoff möglicherweise auch oral verabreicht werden kann. Hiernach zeigen vor allem kleine und lipophile Substanzen ein erhöhtes Potential nach oraler Gabe ausreichend absorbiert werden zu können, da solche Substanzen einfacher durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran diffundieren können (211,212). Auch das MAGIC-Derivat #7 fällt laut dieser Regel aufgrund seiner chemischen Eigenschaften und Molekülstruktur in diese Kategorie oralbioverfügbarer Substanzen. Diese Annahme konnte in den pharmakologischen Tests bestätigt werden, nach einer oralen Gabe von 1 mg/kg Substanz #7 konnten im Plasma behandelte Mäuse Konzentrationen von rund 200 nM nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Konzentration, die rund 4-5-fach über dem IC₉₀ Wert behandelte und HIV inokulierter PBMC liegt. Allerdings stellt sich die Frage, ob Mäuse als Tiermodell für die Untersuchung von Aureothin-Derivaten das optimale Modell darstellen. Laut Oishi *et al.* liegt die 50 % letale Dosis 24 h nach oraler Verabreichung von Aureothin bei Mäusen bei rund 3 mg/kg, während Ratten eine Dosis von rund 50 mg/kg tolerierten (213). Falls diese Tiermodelldaten zu Aureothin trotz Eliminierung der Nitrogruppe in ähnlicher Weise auf Substanz #7 zutreffen sollten, wäre mit der erfolgreich oral verabreichten Dosis von 1 mg/kg schon beinahe das obere Dosierungslimit erreicht. Es gilt also weiter zu prüfen, ob sich die im Vergleich zu Aureothin in PBMC stark verbesserten Eigenschaften der MAGIC Substanz #7 auch im Tiermodell zur Anwendung bringen lassen. Träfe dies zu, so könnte man anhand von Substanz #7 als neue Leitstruktur die Entwicklung eines zukünftigen anti-HIV Wirkstoffes beginnen.

5.2 Substanz #7 inhibiert die HIV Infektion mithilfe einer neuartigen Wirkungsweise auf posttranskriptioneller Ebene der Genexpression

5.2.1 Substanz #7 zeigt keinen Einfluss auf die HIV Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease

Um eine genauere Aussage zur antiviralen Wirkungsweise von Substanz #7 treffen zu können, wurde der anti-HIV Effekt von Substanz #7 auf einzelne Schritte des Replikationszyklus von HIV-1 und im Vergleich zu in der antiretroviralen Therapie angewandten Inhibitoren im Detail analysiert. Mittels erster *in vitro* biochemischer Assays konnte eine direkte Wirkung auf die drei wichtigen HIV Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease ausgeschlossen werden (s. 4.2.1, Abbildung 26). Damit unterscheidet sich die antivirale Wirkungsweise von Substanz #7 von den meisten in der HIV-Therapie eingesetzten Medikamenten. Jansen *et al.* publizierten Anfang der 1990er Jahre einen anti-HIV Effekt von Aureothin auf Grundlage einer Inhibition der Reversen Transkriptase (207). Der IC_{50} lag in den durchgeführten *in vitro* Assays allerdings bei 300 μ M, was die für das Zellsystem verträglichen Konzentrationen von Aureothin um das 150-fache übersteigen würde (s. 4.1.3, Tabelle 15 und 7.4, Tabelle A2). Die in dieser Dissertation beschriebene Charakterisierung der Wirkungsweise von Aureothin und dessen Derivaten verdeutlicht, dass der von Jansen *et al.* beschriebene Effekt auf die RT keine relevanten Auswirkungen auf die anti-HIV Wirkung im Zellsystem hat - die antivirale Aktivität der MAGIC Substanzen folgt einer völlig anderen Wirkungsweise.

5.2.2 Substanz #7 unterscheidet sich hinsichtlich der antiviralen Wirkungsweise von allen in der Klinik eingesetzten Medikamenten

Zur detaillierten Untersuchung der anti-HIV Effekte von Substanz #7 wurden die weiteren Experimente hauptsächlich in den LC5-RIC Zellen des EASY-HIT Reportersystems durchgeführt. In diesem HIV-Wildtyp-Replikationssystem kann durch die Durchführung zweier von einander getrennter Schritte (*1st* und *2nd* *step*) zwischen Wirkungen auf frühe oder späte Phasen des Replikationszyklus unterschieden werden. Im ersten Schritt des Assays (*1st* *step*) wird der Einfluss einer Substanz auf die Tat/Rev-abhängige Produktion des Reporterfarbstoffs DsRed1 in den behandelten HIV Reporterzellen (LC5-RIC) gemessen. Eine Verminderung der detektierten Fluoreszenz von DsRed1 gegenüber einer unbehandelten Kontrolle in diesem Teil des Experimentes deutet also auf die Inhibition eines Replikationsschrittes zwischen Virusanheftung an die Zelle (s. 1.1.3.5, Abbildung 6, Schritt 1) und Produktion der frühen Proteine Tat, Rev und Nef

(s. 1.1.3.5, Abbildung 6, Schritt 8) hin. Im zweiten Schritt (*2nd step*) des EASY-HIT Assays wird der Überstand der behandelten Zellen auf uninfizierte LC5-RIC Zellen übertragen, um den Einfluss der Substanzbehandlung auf die Produktion infektiöser Nachkommenviren zu messen. Wird eine Reduktion der Reporterproduktion daher ausschließlich in diesem zweiten Schritt des Experimentes detektiert, lässt dies auf die Interaktion mit einem Replikationsschritt schließen, der zwischen der späten Phase der Transkription (s. 1.1.3.5, Abbildung 6, Schritt 7b) und der Reifung neu produzierter Viruspartikel (s. 1.1.3.5, Abbildung 6, Schritt 12) stattfindet.

Mithilfe eines Time-of-addition Assays wurde eine zeitaufgelöste Analyse der Wirkung von Substanz #7 auf den *1st step* des EASY-HIT im Vergleich zu Referenzsubstanzen durchgeführt, die allesamt in dieser frühen Phase des Replikationszyklus ihre Wirkung entfalten (T-20/ Fusionsinhibitor, ABC/NRTI, EFV/NNRTI, DTG/Integraseinhibitor, FLV, Transkriptioninhibitor). Das Wirkprofil von Substanz #7 unterscheidet sich grundlegend von den in der Klinik eingesetzten Wirkstoffen T-20, ABC, EFV und DTG. Während besonders die Medikamente der cART bei späterer Zugabe ihre Wirkung verlieren, bleibt die Wirkung von Substanz #7 und FLV, wenn auch auf unterschiedlichem Niveau (40 % Inhibition durch Substanz #7, 90 % Inhibition durch FLV), über die gesamte Dauer des Experimentes erhalten (s. 4.2.2, Abbildung 28). Der Aktivitätsverlust der cART Medikamente T-20, ABC, EFV und DTG bei späterer Zugabe ist darauf zurückzuführen, dass die HIV Infektion die entsprechenden Punkte des Replikationszyklus, die vom jeweiligen Wirkstoff attackiert werden, zum Zeitpunkt der Wirkungsabnahme bereits durchlaufen hat und sich somit ein Angriff auf solch frühe Schritte nicht mehr auf die Produktion des Reporters auswirken kann. Im Gegensatz dazu lassen die gleichbleibenden Wirkprofile von Substanz #7 und FLV darauf schließen, dass die HIV Infektion zum Zeitpunkt der letzten Zugabe (16 h nach der HIV Inokulation) den von Substanz #7 bzw. FLV inhibierten Schritt des Replikationszyklus noch nicht abgeschlossen hat - beide Substanzen greifen also in Replikationsstadien ein, die erst nach der Wirkung von DTG, also nach der Integration des Virus ins Wirtsgenom, stattfinden.

Allerdings gibt es auch eindeutige Hinweise für eine grundsätzlich unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Wirkstoffe FLV und Substanz #7. Bei FLV handelt es sich um einen CDK9-Inhibitor, dessen Wirkung auf der Inhibition der Kinaseaktivität des in die allgemeine Transkription von HIV involvierten P-TEFb beruht (214). Aufgrund seiner potenten anti-HIV (215) und antitumor Aktivität (216) stand FLV bereits im Fokus der Forschung. Aufgrund des zu niedrigen Selektivitätsindex und der damit einhergehenden Toxizität kam FLV jedoch nie als therapeutischer Wirkstoff zum Einsatz (217). Auch in den Untersuchungen dieser Dissertation zeigte FLV einen Selektivitätsindex von lediglich <3, während Substanz #7 mit einem Wert >970 in den zellulären Experimenten eine deutlich bessere Verträglichkeit aufweist. Die Unterschiede in der anti-HIV Wirkungsweise von FLV und Substanz #7 werden noch einmal durch die Wirkprofile einer Dosisstufung beider Substanzen

unter Betrachtung der Daten aus *1st* und *2nd* *step* des EASY-HIT Assays verdeutlicht. Hierbei führt FLV in beiden Teilen des Assays zu einer klaren dosisabhängigen Inhibition des Reporterproteins DsRed1 (s. 4.2.2, Abbildung 29C,D). Aufgrund der inhibitorischen Wirkung von FLV auf die allgemeine HIV Transkription können die für die HIV Replikation, sowie die Produktion von DsRed1 essentiellen HIV Proteine Tat und Rev nicht ausreichend exprimiert werden, wodurch keine Nachkommenviren mehr gebildet werden können und es somit in beiden Schritten des EASY-HIT Assays zu einer deutlichen Inhibition des Reporterfluorophors kommt. Im Gegensatz zu FLV zeigt sich bei einer Behandlung mit Substanz #7 ein vollständig anderes Ergebnis. Das Wirkprofil des *1st* *step* EASY-HIT Assays bestätigt die Daten des TOA Assays, bei dem die Behandlung mit Substanz #7 zu einer mäßigen Reduktion des Reporterproteins um 40 % führte - die anti-HIV Aktivität von Substanz #7 schwankt hierbei stark und inhibiert die Produktion des DsRed1 Reporters auch bei hohen Konzentrationen nur um rund 40 % (s. 4.2.2, Abbildung 29A). Im *2nd* *step* des EASY-HIT Assays führt die Behandlung mit Substanz #7 jedoch zu einer starken dosisabhängigen Inhibition des Reporters und somit zu einer potenten Reduktion infektiöser Nachkommenviren (s. 4.2.2, Abbildung 29B).

Die Analyse der Wirkungsweise von Substanz #7 im Verlauf des TOA und im Vergleich mit FLV deutet daher darauf hin, dass sich der essentielle Part der inhibitorischen Aktivität von Substanz #7 möglicherweise erst nach der Produktion der frühen Proteine Tat, Rev und Nef und daher in einer späten Phase des Replikationszyklus von HIV, jedoch noch vor der Reifung der Nachkommenviren (keine Inhibition der Protease im biochemischen Assay), abspielt. Aufgrund der starken Schwankungen der inhibitorischen Wirkung im *1st* *step* des EASY-HIT Assays lässt sich eine zusätzliche Teilwirkung auf frühere Schritte des Replikationszyklus nicht ausschließen, jedoch zeigt das Wirkprofil des TOA Assays auch, dass diese schwächeren Effekte sich möglicherweise erst nach der Integration ins Wirtsgenom abspielen, da Substanz #7 im Vergleich zum Integraseinhibitor DTG seine leichte inhibitorische Wirkung im Verlauf des analysierten 16 h Abschnittes nicht verliert (s. 4.2.2, Abbildung 28).

5.2.3 Substanz #7 zeigt lediglich einen mäßigen Einfluss auf die provirale Integration in das Wirtsgenom der Zelle

Die Analyse eines potentiellen Effektes von Substanz #7 auf die Integration des HIV-Provirus in das Genom der Wirtszelle mittels *Alu*-PCR bestätigte die Annahme einer hauptsächlich postintegrativen anti-HIV Wirkung von Substanz #7. Während eine Behandlung mit den beiden Inhibitoren EFV und DTG, die beide noch vor bzw. während der proviralen Integration ihre Wirkung entfalten, jeweils zu einer starken Reduktion proviraler DNA führt, inhibiert Substanz #7 die Integration nur um rund 20 % (s. 4.2.3, Abbildung 31). Auch diese Daten verdeutlichen einmal mehr, dass es sich bei der Wirkungsweise von Substanz #7 auf den Replikationszyklus von HIV-1 womöglich um multiple Effekte handelt, von denen der essentielle Teil in einer postintegrativen und späten posttranskriptionellen Phase der Replikation einsetzt, während sich schwächere Effekte kurz davor abspielen. Werden die Überlegungen zusätzlicher Effekte aufgrund der Daten aus dem vorigen Abschnitt mit den Resultaten der Analyse zur proviralen Integration fortgeführt, stellt sich die Frage, ob die Schwankungen in der Inhibition im *1st step* des EASY-HIT Assays, der langanhaltenden, wenn auch schwachen Wirkung während des TOA Assays, sowie die geringfügige Reduktion der proviralen DNA durch Behandlung mit Substanz #7 möglicherweise auf die Interaktion mit zellulären Mechanismen zurückzuführen ist, die für die Integration des Virus ins Wirtsgenom notwendig sind, jedoch erst nach der Wirkung von DTG eingreifen. DTG als Integrase-Strangtransfer Inhibitor inhibiert den Integrase-vermittelten Einbau der HIV-DNA ins Wirtsgenom (196). Bei diesem Schritt entstehen jedoch einzelne Lücken in der DNA, die durch zelluläre Reparaturmechanismen wieder geschlossen werden (218,219). Dieser letzte Teilschritt der Integration von HIV kann beispielsweise durch Koffein oder Koffein-ähnliche Methylxanthine inhibiert werden (220). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Substanz #7 geringe inhibitorische Effekte auf die späte Phase der HIV Integration ausübt.

5.2.4 Substanz #7 inhibiert die HIV Replikation auf posttranskriptioneller Ebene beim Übergang von der frühen in die späte Phase der Genexpression

Die üblichen Angriffspunkte der retroviralen Therapie - der Eintritt des Virion in die Zelle, die Reverse Transkription von viraler RNA zu DNA, die Integration des Provirus in das Genom der Wirtszelle, sowie die Reifung von Nachkommenviren - werden durch das Aureothin-Derivat #7 nicht in dem Maße beeinflusst, dass sie den starken und konsistenten Hemmeffekt dieses Wirkstoffes auf die Produktion der Nachkommenviren erklären könnten. Deshalb entfaltet sich die anti-HIV Wirkung von Substanz #7 über eine für die HIV-Therapie komplett neuartige

Wirkungsweise. Bei HIV sind die virusspezifische Genexpression und Proteinbiosynthese, wie auch bei allen anderen Viren, auf zelluläre Transkriptions- und Translationsmechanismen angewiesen, wodurch diese Prozesse ein empfindliches Ziel für die Inhibition der Virusproduktion darstellen. Daher wurde bei der Analyse der antiviralen Aktivität von Substanz #7 ein besonderes Augenmerk auf die virale Genexpression gelegt und diese hinsichtlich der HIV Strukturproteinproduktion, sowie der HIV spezifischen Transkription sowohl in LC5-RIC Zellen, als auch in H9 T-Lymphomazellen (T-Zellen gehören *in vivo* zu den hauptsächlichen Wirtszellen von HIV) untersucht.

Hierbei führt die Behandlung mit Substanz #7 in beiden Zellsystemen zu einer starken Reduktion des in der späten Phase der Expression produzierten Strukturproteins Gag-p24 (s. 4.3.1, Abbildung 32 und 7.5, Abbildung A4). Dieser Einfluss von Substanz #7 auf die Genexpression später HIV Proteine zeigt sich auch auf der Ebene der HIV Transkripte, da Substanz #7 die Mengen vorliegender ungespleißter (US), sowie einfach gespleißter (SS) mRNA Spezies deutlich verringert (s. 4.3.2, Abbildung 33 und 7.5, Abbildung A5). Allerdings zeigt sich dieser Effekt im Gegensatz zu FLV, das als CDK9-Inhibitor die gesamte Transkription von HIV inhibiert (198,214), in LC5-RIC Zellen nicht auch noch für vollständig gespleißte MSmRNA Transkripte. Diese entstehen in der frühen Phase der HIV Expression verstärkt durch alternatives Splicing aus dem prä-mRNA Transkript und codieren für die frühen Proteine Tat, Rev und Nef. Während Substanz #7 in LC5-RIC Zellen zu einer starken Erhöhung der vorliegenden MSmRNA führt, (s. 4.3.2, Abbildung 33 und 7.5, Abbildung A5) beobachtet man in H9 Zellen eine geringfügige Verminderung der Mengen an vollständig gespleißten Transkripten. Allerdings fällt diese Wirkung auf die Bildung der MSmRNA im Vergleich zur starken Reduktion der Mengen an ungespleißten oder einfach gespleißten mRNA Spezies deutlich schwächer aus (s. 7.5, Abbildung A5). Speziell die Daten aus LC5-RIC Zellen sprechen für spezifische posttranskriptionelle Effekte auf die Abläufe beim Übergang von der frühen in die späte Phase der HIV Genexpression, wie möglicherweise ein Eingreifen in das alternative Splicing der prä-mRNA oder eine Interaktion mit den in dieser Phase essentiellen HIV Proteinen Tat oder Rev bzw. zellulären Faktoren, die am Splicing der HIV mRNA beteiligt sind.

Eine mögliche Regulierung der Funktionen von Rev oder das Verhindern einer Translation des Proteins könnte zum einen dazu führen, dass weniger ungespleißte und einfach gespleißte HIV mRNAs vom Nukleus ins Zytoplasma gelangen, da Rev zur Vermittlung des Transportes essentiell ist (38,39), und zum anderen, dass Rev nicht mehr zur Stabilisierung von US- und SSmRNAs beitragen kann und dies daher in einem verstärkten Abbau der zurückgehaltenen mRNAs bzw. einer erhöhten Menge MSmRNA resultieren kann (35,36). Für einen solchen Substanz #7 vermittelten Rev bezogenen Effekt sprechen erste vorläufige Experimente zur Lokalisation von Rev in behandelten LC5-RIC Zellen, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, welches für ein GFP-gekoppeltes HIV Rev Protein codiert. Hierbei führt die Behandlung von Rev-GFP exprimierenden

Zellen mit Substanz #7 zu einer Verschiebung der Akkumulation von Rev aus dem Nukleus ins Zytoplasma im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Einen solchen womöglich durch zelluläre Faktoren ausgelösten Effekt könnte Rev davon abhalten in ausreichenden Mengen - Rev benötigt einen bestimmten Schwellenwert um an die RRE zu binden (221) - in den Nukleus zu gelangen, um ungespleißte und einfach gespleißte mRNA ins Zytoplasma zu transportieren, oder um den Export von Rev ins Zytoplasma auch ohne daran gebundene HIV mRNAs zu beschleunigen. Dadurch würde ein Übergang von der frühen in die späte Phase der Genexpression verhindert werden und es käme infolgedessen zu einer Arretierung des Replikationszyklus im frühen posttranskriptionellen Stadium.

Neben eines möglichen Einflusses des Aureothin-Derivates #7 auf Funktionen des Rev Proteins könnte auch eine Wirkung auf Tat abhängige Vorgänge während der HIV Expression in Betracht gezogen werden. Tat fungiert hauptsächlich als Aktivator der HIV Transkription, bindet an das TAR Element am 5'-Ende der neu gebildeten prä-mRNA und rekrutiert zelluläre Faktoren, wie beispielsweise P-TEFb, welches die Prozessivität der RNA Polymerase II steigert (32,35,62,63). Zudem greift Tat auch in das Splicing der HIV mRNA ein. Zum einen verstärkt es das Splicing an der TAR-nahen Hauptspleißstelle (66) und zum anderen reguliert es in seiner acetylierten Form (AcTat) das Splicing durch die Interaktion mit dem Spleißregulator Protein p32 (67), welches als Inhibitor des zellulären Spleißfaktors SRSF1 agiert. Durch die AcTat vermittelte Akkumulation des Spleißregulators p32 am HIV Promotor, und somit in der Nähe der Hauptspleißstelle der HIV RNA, wird das Tat-unterstützte Splicing inhibiert (67). Ein mögliches Verringern der Tat-abhängigen Akkumulation von p32 an der HIV prä-mRNA durch Substanz #7, hätte zur Folge, dass das Splicing nicht mehr ausreichend gehemmt werden könnte, wodurch es, wie für die Behandlung mit Substanz #7 in LC5-RIC Zellen gezeigt, zu einer Anhäufung von MSmRNA käme. Auch die extreme Schwankung der DsRed1 Produktion im *1st step* des EASY-HIT könnte auf einen direkten oder indirekten Einfluss von Substanz #7 auf Tat hindeuten. Tat ist absolut notwendig für die Expression des Reporterproteins. Wird die Interaktion von Tat mit der TAR Region oder zellulären Transkriptionsfaktoren gestört oder aber auch in dessen Produktion oder Degradation eingegriffen, kann sich dies schon in einer Inhibition der Fluoreszenz im *1st step* des EASY-HIT Assays niederschlagen. Allerdings scheint solch ein Effekt aufgrund der hohen Standardabweichung zwischen einzelnen Experimenten von vielen Faktoren abzuhängen, die möglicherweise nicht alle notwendig sind, um am Ende zu der resultierenden anti-HIV Wirkung zu führen.

Aufgrund der essentiellen Bedeutung von Tat während der Genexpression von HIV stehen Inhibitoren, die an dieser Stelle des Replikationszyklus eingreifen, schon länger im Fokus der Forschung (222). Bisher können Tat bzw. HIV-1 Transkriptioninhibitoren in drei Kategorien unterteilt werden; Wirkstoffe, die die Interaktion von Tat mit der TAR Region unterbinden oder Tat

durch direkte Bindung an die unter anderem für den Transport in den Nukleus und die Bindung an die TAR Region essentielle basische Domäne inhibieren, sowie Tat/P-TEFb-Inhibitoren (222). Keiner der untersuchten Wirkstoffe hat es bisher bis zur Anwendung geschafft. Dies liegt hauptsächlich an der fehlenden Spezifität oder, wie bei dem auch in dieser Dissertation als Referenzsubstanz verwendeten FLV aus der Klasse der Tat/P-TEFb-Inhibitoren, an der zu hohen Zytotoxizität im primären Zellmodell (198,214,217). Wie schon zuvor demonstriert, unterscheidet sich die anti-HIV Wirkung von Substanz #7 grundsätzlich von FLV. Der Vergleich von Substanz #7 mit anderen Tat-Inhibitoren lässt eine Einordnung in die beiden anderen Kategorien auch nicht zu. Zur Bindung an die TAR-Region werden eher kationische Wirkstoffe (223), zur Interaktion mit der basischen Domäne von Tat eher negativ geladene Moleküle wie Heparansulfate verwendet (224,225). Da Substanz #7 als unpolares und stark hydrophobes Molekül diese chemischen Eigenschaften jedoch nicht teilt, käme für eine direkte Interaktion mit Tat und einer daraus resultierenden Inhibition des HIV Replikationszyklus höchstens die für die Transaktivierung und die Bindung an Cofaktoren notwendige und ebenfalls hydrophobe Core-Domäne des Tat Proteins infrage (222).

Auch bei anderen Wirkstoffen wurden bereits ähnliche Effekte auf das Splicing von HIV Transkripten nachgewiesen. Das Indol-Derivat IDC16 inhibiert beispielsweise das Splicing der prä-mRNA, wodurch schon die Bildung von MSmRNA und somit die Expression der frühen Proteine Tat, Rev und Nef unterbunden wird (226). Ein solcher Effekt von Substanz #7 ist auszuschließen, da es ansonsten nicht zu einer Erhöhung der MSmRNA in LC5-RIC Zellen, sowie zu einem Signal im 1st step des EASY-HIT kommen würde. Balachandran *et al.* beschreibt ebenso eine anti-HIV Wirkung dreier chemisch verschiedener Substanzen 791, 833 und 892 auf posttranskriptionellem Level der Genexpression von HIV (227). Diese Wirkstoffe führen wie auch das Aureothin-Derivat #7 zu einer Erhöhung der MSmRNA, allerdings kommt es zusätzlich zu einer Reduktion der Proteine Tat und Rev. Dies kann wie oben schon beschrieben für die Behandlung mit Substanz #7 nicht zutreffen, da dies ansonsten in einer klaren und konsistenten Reduktion von DsRed1 im 1st step des EASY-HIT Assays, die mit der Inhibition der Virusproduktion einhergeht, resultieren würde. Der Einsatz des Digitalisglycosides Digoxin führt durch Modifikation der zellulären SR Spleißproteine zur alternativen Nutzung der Spleißstellen im Verlauf des posttranskriptionellen Splicings der HIV mRNA, wodurch speziell die Expression von Rev und infolgedessen die gesamte HIV Expression inhibiert wird (228). Eine Behandlung mit 8-Azaguanin blockiert den Rev-vermittelten Transport der ungespleißten und einfach gespleißten Transkripte aus dem Nukleus ins Zytoplasma der Zelle durch zytoplasmatische Akkumulation von Rev (229). Sowohl bei Digoxin als auch bei 8-Azaguanin werden, wie auch durch Behandlung mit Substanz #7, speziell die späte HIV Genexpression herunterreguliert und die MSmRNA Spezies erhöht detektiert. 8-Azaguanin wirkt hierbei am ehesten vergleichbar mit Substanz #7, da es auch hier zu einer Verschiebung der Lokalisation von

Rev aus dem Nukleus ins Zytoplasma stattfindet, jedoch ist die anti-HIV Aktivität von Substanz #7 mehr als 1000-fach potenter als die antivirale Wirkung von 8-Azaguanin (229). Mit großzügiger Unterstützung des Cochrane Labors vom Institut für Molekulare Genetik an der University of Toronto, Kanada war es im Rahmen dieser Dissertation möglich die Wirkung von Substanz #7 während eines Laboraufenthaltes in Toronto im gleichen zellulären System zu testen, in dem auch die Effekte der angesprochenen Wirkstoffe Digoxin, 8-Azaguanin, sowie 791, 833 und 892 analysiert wurden (227-229). Die hier verwendete HeLa rtTA HIVGagGFP (C7) Zelllinie enthält ein tetO/Doxycyclin-aktivierbares provirales HIV-Konstrukt. GFP wird hierbei im ORF von *gag* codiert, die Deletion großer Teile des *pol*-Gens, sowie Mutationen in *tat* und dem Bereich der TAR Region führen zur Inaktivierung des Virus (178,230). Die Behandlung der HeLa C7 Zelllinie mit Substanz #7 hatte keinen Einfluss auf die Doxycyclin-aktivierte Produktion später Proteine. Aufgrund dieses Resultates muss es sich bei Substanz #7 um eine antivirale Wirkungsweise handeln, die sich, trotz der teilweisen Übereinstimmung mancher Ergebnisse, vollkommen von der anti-HIV Aktivität der hier aufgeführten und in der HeLa C7 Zelllinie aktiven Moleküle unterscheidet. Der Hauptunterschied des HIV Kontruktes der HeLa C7 Zellen im Vergleich zu den in dieser Dissertation durchgeführten Wildtyp-Infektionen liegt hinsichtlich des Transkriptions- und Splicing-Apparates in der Nutzung des Doxycyclin-induzierten tetO-Systems, welches die im eigentlichen Replikationszyklus essentiellen Funktionen des Transkriptionsaktivators Tat ersetzt, sowie die womöglich entscheidenden Mutationen in der TAR Region und im Bereich des *tat*-Gens. Möglicherweise lässt dieses Ausbleiben der inhibitorischen Wirkung in den HeLa C7 Zellen darauf schließen, dass das Tat Protein und dessen regulatorische Wirkung auf für die HIV Infektion wichtigen zellulären Prozesse bei der antiviralen Wirkungsweise von Substanz #7 eine essentielle Rolle spielt.

5.2.5 Substanz #7 zeigt allgemeine, sowie HIV spezifische Effekte auf zelluläre

Mechanismen und Signalwege

Da die Genexpression von HIV entscheidend von zellulären Faktoren abhängig ist, wurden im Verlauf dieser Dissertation erste Untersuchungen zu möglichen Auswirkungen von Substanz #7 auf zelluläre Prozesse angestellt. Hierzu wurden Proteomics-Analysen Substanz #7 behandelter und HIV inokulierter, sowie nicht inokulierter PBMC durchgeführt. Nur ein kleiner Teil von 5-10 % der detektierten Proteine wird durch die Behandlung mit Substanz #7 beeinflusst. Dies spricht für einen spezifischen Effekt des Aureothin-Derivates #7 und gegen eine globale, möglicherweise toxische Wirkung auf große Teile der zellulären Mechanismen. Mittels detaillierter Pathway-

Analysen konnte gezeigt werden, dass sich Substanz #7 sowohl auf Prozesse in HIV inokulierten als auch in nicht inokulierten PBMC auswirken kann. Möglicherweise werden diese Prozesse unabhängig von HIV durch Substanz #7 beeinflusst (s. 4.3.3, Abbildung 34 und 7.6, Tabelle A3). Andererseits war es möglich der Behandlung mit Substanz #7 auch eine Reihe HIV spezifischer Effekte zuzuordnen. Die in HIV inokulierten PBMC spezifisch regulierten Proteine sind laut einer Datenbank für Signalwege vor allem mit der Kategorie *HIV Infektionen*, aber auch mit *Apoptose* assoziiert (s. 4.3.3, Abbildung 34 und 7.6, Tabelle A3). Dieser sehr eingeschränkte Einfluss der Substanz auf zelluläre Genexpression und Proteinbiosynthese verdeutlicht, dass es sich beim anti-HIV Effekt von Substanz #7 weniger um ein Resultat unspezifischer zellulärer Nebeneffekte und viel mehr um einen HIV infektionsspezifischen Effekt handelt.

Eine sehr wichtige Klasse zellulärer und für die HIV Expression essentieller Faktoren bilden die SR Proteine. Diese sehr umfangreiche Gruppe an RNA-bindenden Proteinen kontrolliert die HIV Genexpression durch ihren Einfluss auf die Transkription, das Splicing, die 3'-Polyadenylierung der mRNA, sowie die Translation und werden auch als Zielfaktoren für die Entwicklung neuer HIV Inhibitoren diskutiert (231). Beispielsweise reguliert das SR Protein und Spleißfaktor SRSF1 nicht nur die Genexpression durch Regulierung der Spleißmaschinerie und Modifizierung der RNA Polymerase II Aktivität, sondern zeigt auch inhibitorische Effekte hinsichtlich der HIV Transkription (232,233). SRSF1 bindet in Abwesenheit von Tat an die TAR Region. Sobald genügend Tat produziert wurde, wird SRSF1 durch Tat verdrängt und die Transkription kann verstärkt ablaufen. Bei Überexpression von SRSF1 wird Tat jedoch wieder erfolgreich verdrängt, die Transkription um das 100-fache abgeschwächt und die Replikation von HIV inhibiert (234). Zudem gibt es im HIV Genom Bindestellen für SRSF1 im Bereich verschiedener Spleißstellen, wodurch eine vermehrte Produktion des SR Proteins auch zu einer Inhibition des Splicings führen kann (35). Eine detaillierte Analyse eines möglicherweise regulatorischen Einflusses von Substanz #7 auf die Funktionen von SRSF1 oder anderer SR Proteine könnte eine Erklärung für den anti-HIV Effekt von Substanz #7 mit sich bringen. Die Daten der Proteomics-Analyse können hierzu erste, jedoch auch nur eingeschränkte Hinweise liefern. Die Behandlung mit Substanz #7 führt in den PBMC von einem der drei untersuchten Spendern zu einer signifikanten Reduktion des SRSF4 Spleißfaktors, sowie der SRSF Proteinkinase 2, alle anderen detektierten SR Proteine bleiben unverändert (SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF6 und SRSF7). Bei den beiden anderen Spendern ist solch eine Veränderung jedoch nicht zu beobachten. Die in dieser Dissertation durchgeführten Proteomics-Analysen geben nur Auskunft über die Substanz #7 induzierte Regulation der Expressionshöhe der jeweiligen Proteine, allerdings werden hierbei anschließende Modifikationen wie Phosphorylierung nicht berücksichtigt. Die Funktion der SR Proteine hängt stark von solchen posttranslationalen

Modifikationen ab (231,232), weshalb ein Einfluss von Substanz #7 auf SR Proteine nicht ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend bewirkt die Behandlung HIV infizierter Zellen mit Substanz #7 eine starke Inhibition der Virusreplikation auf Ebene der posttranskriptionalen Expression, womöglich ausgelöst durch einen direkten oder indirekten Einfluss von Substanz #7 auf Tat- oder Rev-vermittelte HIV infektionsspezifische Signalwege und biologische Prozesse innerhalb der infizierten Zielzelle.

5.3 Substanz #7 zeigt ein breites und hochpotentes Wirkspektrum gegen HI Viren aller Genotypen und Wirtstropismen

Das HI Virus zeichnet sich durch seine genetische, aber auch strukturelle Diversität aus. Zum einen existieren viele phylogenetisch verschiedene Virusstränge von HIV, die in zwei Typen, HIV-1 und HIV-2, und nachfolgend in unterschiedliche Gruppen und Subtypen unterteilt werden können (17). Zum anderen ist es HIV unabhängig des Genotyps und auch während einer schon manifestierten Infektion im Patienten möglich durch Änderung der strukturellen Beschaffenheit des Oberflächenproteins gp120 den Tropismus zu verändern, wodurch das Virus die Zelle entweder X4-trop, also durch Binden an den Korezeptor CXCR4, oder R5-trop mittels Interaktion mit dem CCR5-Rezeptor infizieren kann (14,60,199). Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Dissertation nicht nur eine potentiell breite antivirale Anwendung der Behandlung mit Substanz #7 gegen HIV-Stämme unterschiedlicher Genotypen, sondern auch verschiedener Tropismen untersucht.

Der anti-HIV Effekt von Substanz #7 erweist sich sowohl bei X4- als auch R5-tropen Viren als gleichermaßen potent (s. 4.4, Abbildung 35). Dies bestätigt die bisher beschriebene Wirkungsweise von Substanz #7. Da es sich hierbei um einen posttranskriptionalen Effekt gegen das Virus handelt, verläuft die Inhibition der Virusreplikation unabhängig des viralen Eintritts in die Zelle. Im Vergleich zu Substanz #7 bewirkt Maraviroc, ein CCR5-Antagonist, nur eine Reduktion der Infektion durch R5-trope Viren, dieser Wirkstoff erzielt keinerlei Wirkung gegen X4-trope Viren (126). Solch ein selektiver anti-HIV Effekt erschwert den Einsatz in der antiretroviralen Therapie, Maraviroc kann erst nach Kontrolle des Virustropismus verabreicht werden und verliert im Verlauf der Infektion seine Wirkung, da sich der Tropismus von HIV über die Zeit zumeist Richtung X4-Tropismus verschiebt (14,60,199). Daher ist die Tropismus-unabhängige Inhibition von HIV ein Vorteil für die Behandlung mit Substanz #7.

Die Behandlung mit dem Aureothin-Derivat #7 führte auch zu einer starken Inhibition der Infektion mit klinischen Virusisolaten der Genotypen HIV-1 Gruppe M, HIV-1 Gruppe O, sowie HIV-2 (s. 4.5.1, Abbildung 36). Das breite Wirkspektrum von Substanz #7 gegen sowohl HIV-1 als auch HIV-2 Infektionen unterstreicht einmal mehr das Vorliegen einer neuartigen, eher zellulären Wirkungsweise von Substanz #7. Da HIV-2 phylogenetisch teils weiter von HIV-1 entfernt ist als manche SIV-Virusstämme (s. 1.1.2.4, Abbildung 3) (17), können nicht alle in der Klinik gegen HIV-1 eingesetzten Medikamente auch zur Behandlung von HIV-2 Infektionen herangezogen werden. Strukturelle Unterschiede einzelner Proteinstrukturen von HIV-2, wie der Reversen Transkriptase oder dem Oberflächenprotein gp120, verhindern beispielsweise einen effektiven Einsatz des Fusionsinhibitors T-20 oder des NNRTI EFV (200,201). Diese teilweise selektiven Effekte verdeutlichen den Nachteil des direkt auf virale Komponenten zugeschnittenen Wirkstoffdesigns. Werden, wie es für eine Behandlung mit Substanz #7 womöglich zutrifft, eher zelluläre Faktoren reguliert, die in der HIV Infektion eine Rolle spielen, kann dies zu einem breit wirksamen antiviralen Effekt gegen alle Genotypen von HIV führen.

Eines der größten Probleme in der Therapie von HIV liegt in der Fähigkeit des Virus sich der Wirkung der eingesetzten Medikamente durch Resistenzmutationen zu entziehen. Daher wurden in dieser Dissertation auch die antiviralen Effekte von Substanz #7 gegen Viren getestet, die in der Klinik zum vollständigen Therapieversagen führten. Substanz #7 war es auch hier möglich die Infektion ohne Verlust der anti-HIV Aktivität zu inhibieren, während das verwendete Patientenisolat gegen die Referenzsubstanzen EFV und DTG Resistenzen aufzeigt (s. 4.5.2, Abbildung 37). Auch anhand dieser Resultate lässt sich ein Wirkmechanismus von Substanz #7 ableiten, der sich vollkommen von dem der in der Therapie eingesetzten und hier verwendeten Referenzsubstanzen unterscheidet, da es möglich ist, auch dieses multiresistente Virus mithilfe von Substanz #7 zu inhibieren.

5.4 Substanz #7 zeigt synergistische anti-HIV Aktivität in Kombination mit RT- und Integraseinhibitoren

Aufgrund der schnellen Resistenzbildung bei der Durchführung von Monotherapien (93), werden HIV Patienten in der Regel mit einem Medikamentencocktail aus jeweils zwei nukleosidischen RT-Inhibitoren (NRTI), sowie einem Medikament aus einer der anderen Wirkstoffklassen therapiert (92). Um im Zuge dieser Dissertation zu überprüfen, ob sich Substanz #7 für den Einsatz in Kombination mit in der HIV-Therapie eingesetzten Medikamenten eignet, wurde die anti-HIV

Aktivität von Kombinationen aus Substanz #7 und jeweils eines für die Klinik relevanten Wirkstoffes unterschiedlicher Wirkstoffklassen untersucht.

Die vorliegenden Daten aus den durchgeführten Kombinationsexperimenten sprechen für eine synergistische anti-HIV Aktivität zwischen Substanz #7 und den eingesetzten NRTI FTC bzw. 3TC, sowie dem Integraseinhibitor DTG. Das Zusammenspiel mit dem NNRTI EFV zeigt noch eine moderate Synergie, während eine Kombination aus Substanz #7 und dem Proteaseinhibitor SQV eher additiv bis antagonistisch wirksam ist (s. 4.6, Abbildung 39). Die eher antagonistische antivirale Wirkung einer Substanz #7/SQV Kombination könnte auf die hohe Affinität von Substanz #7 zur Bindung von Proteinen zurückzuführen sein. Substanz #7 würde in diesem Fall das Peptidomimetikum SQV (235) binden, wodurch die beiden Wirkstoffe sich gegenseitig abfangen und möglicherweise daran hindern ihre eigentliche Wirkung entfalten zu können.

Zusammenfassend konnte ein sehr gutes synergistisches Zusammenspiel der anti-HIV Aktivitäten von Substanz #7 in Kombination mit RT- und Integraseinhibitoren demonstriert werden. Diese Resultate eröffnen einen möglichen zukünftigen Einsatz von Substanz #7 in der antiretroviralen Kombinationstherapie mit ausgewählten Wirkstoffen.

5.5 Substanz #7 als mögliche Basis zur Entwicklung eines neuen Wirkstoffes für die antivirale Therapie

Die in der vorliegenden Dissertation analysierte neue Substanzklasse MAGIC besticht durch ihre starke anti-HIV Aktivität und ihren möglichen therapeutischen Nutzen aufgrund der effektiven Wirkung gegen HI Viren aller Genotypen und Wirtszelltropismen, sowie der synergistischen anti-HIV Wirkung in Kombination mit den RT-Inhibitoren FTC, 3TC und EFV bzw. dem Integraseinhibitoren DTG. Es handelt sich hierbei um vollständig synthetisch herstellbare Derivate des Naturstoffes Aureothin, die sich chemisch und funktionell von allen bisherigen für die klinische Anwendung zugelassenen anti-HIV Medikamenten unterscheiden. Unter Verwendung der aus SAR Studien hervorgegangenen Leitsubstanz #7 konnte gezeigt werden, dass es sich bei der antiviralen Wirkung um einen spezifischen Effekt auf die posttranskriptionelle Genexpression von HIV handelt. Daten aus Proteomics-Analysen deuten hierbei auf einen HIV spezifischen Effekt von Substanz #7 auf zelluläre Mechanismen und Signalwege hin, die in der Replikation von HIV eine Rolle spielen.

Um die genaue Wirkungsweise und mögliche interagierende Zielmoleküle von Substanz #7 in Zukunft genauer analysieren und identifizieren zu können, sollen MAGIC-Derivate mit Photoaffinitätslabeln und Alkylgruppen synthetisiert werden. Mithilfe dieser chemischen Gruppen wäre es möglich den Wirkstoff kovalent an eventuelle Bindungs- und Interaktionspartner

anzuknüpfen und diese mittels Click-Chemie basierter Extraktion und anschließender massenspektrometrischer Analyse zu identifizieren (236). Das in dieser Dissertation untersuchte Aureothin-Derivat #24 wurde wegen seiner Azidgruppe schon für einen solchen Click-Chemie Ansatz herangezogen, führte jedoch aufgrund des für die kovalente Bindung notwendigen, aber fehlenden Photoaffinitätslabels noch zu keinem Ergebnis.

In den Jahren von 2011-2014 wurden im Bereich der „small molecules“ insgesamt 16 antiviral wirksame Substanzen auf den Markt gebracht. Jedoch können mithilfe dieser Medikamente lediglich HIV und HCV Infektionen behandelt werden (149). Es fehlt daher auch weiterhin an wirksamen Therapiemöglichkeiten für die meisten anderen virusbedingten Erkrankungen, wie Influenza- oder Adenovirus-Infektionen. In diesem Kontext wurden die antiviralen Eigenschaften von Substanz #7 neben HIV auch gegen andere Viren getestet. Hierbei deuteten erste Ergebnisse ebenfalls auf eine äußerst potente antivirale Aktivität gegen das Influenza A Virus, Adenovirus und Hepatitis B Virus hin, während keine antiviralen Effekte bei der Behandlung von Infektionen mit dem Semliki-Forest Virus, dem Vesicular Stomatitis Virus, dem Chikungunya Virus oder dem Masernvirus festgestellt werden konnten. Die untersuchten Viren stammen allesamt aus komplett unterschiedlichen Virusordnungen und -familien. Jedoch haben alle von Substanz #7 inhibierten Viren, hinsichtlich der in dieser Dissertation erarbeiteten Wirkungsweise gegen HIV, eine Eigenschaft gemeinsam, in der sie sich von den nicht-inhibierten Viren unterscheiden: sie sind alle auf alternatives Splicing durch die zelluläre Spleißmaschinerie angewiesen (35,237-239). Wenn diese Hypothese weiterhin zutrifft, könnte Substanz #7 möglicherweise auch die Replikation des Humanen Papillomavirus, HTLV, Polyomaviren, sowie verschiedener Herpesviren inhibieren, da alternatives Splicing auch für diese Viren essentiell zur Virusreplikation beiträgt (240-243). Falls sich ein solcher gemeinsamer zellulärer Wirkmechanismus für die Behandlung unterschiedlicher Viruserkrankungen durch Substanz #7 in zukünftigen Untersuchungen bestätigen sollte, hätte Substanz #7 das Potential als Basis zur Entwicklung des ersten Breitband-Virostatikums dienen zu können.

Auch beinahe 40 Jahre nach der ersten AIDS Diagnose und der Entdeckung von HIV als Erreger der Erkrankung bleibt HIV/AIDS eine zwar behandelbare, jedoch unheilbare Infektionskrankheit. HIV ist das wohl am besten untersuchte Virus überhaupt. Das Virus verfügt über eine Vielzahl an speziellen Mechanismen, die es ermöglichen dem Immunsystem entgegenzuwirken, es herunterzuregulieren oder diesem auszuweichen. Die Infektion von Zellen des Immunsystems selbst und die Fähigkeit in diesen Zellen in einen latenten Zustand übergehen zu können, während dessen es dem Immunsystem verwehrt bleibt infizierte Zellen zu erkennen und gezielt zu

eliminieren, spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Zudem stellt sich die hohe Mutationsrate des Virus gegen die mittlerweile ausgeweitet angelegte und hochaktive Kombinationstherapie. Die in dieser Dissertation beschriebene neue Gruppe an antiviralen Wirkstoffen, MAGIC, und besonders die Leitsubstanz #7 geben, aufgrund der hochpotenten und im Vergleich zu allen anderen in der Klinik angewandten Medikamenten neuartigen Wirkungsweise, sowie des breiten gegen alle HIV Genotypen und Wirtstropismen gerichteten Wirkspektrums und des synergistischen Zusammenspiels in Kombination mit RT- und Integraseinhibitoren, neue Hoffnung in der Bekämpfung von HIV/AIDS und könnten so zu einem weiteren effektiven Puzzlestück in der zukünftigen Therapie von HIV werden.

6. Zusammenfassung

Laut Weltgesundheitsorganisation WHO sind weltweit rund 37,9 Millionen Menschen von einer Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) betroffen. Ohne Behandlung entwickeln HIV infizierte Patienten das „Acquired Immune Deficiency Syndrome“ (AIDS), welches zur Zerstörung des Immunsystems und letztendlich zum Tod führt. Im Jahr 2018 starben Hochrechnungen zufolge 770.000 HIV Infizierte an den Folgen der HIV Infektion. Daher wird die HIV/AIDS Pandemie noch immer als eine der größten Bürden der Menschheit bezeichnet. Die antiretrovirale Kombinationstherapie (cART) gilt als Goldstandard in der Behandlung der HIV Infektion. Während es die cART ermöglicht die Viruslast im Blut eines HIV infizierten Patienten unterhalb des Detektionslimits zu reduzieren, führt diese Therapieoption allerdings weder zur Ausheilung der Infektionserkrankung noch kann dadurch das Auftreten resistenter Viren langfristig verhindert werden. Aus diesem Grund bleibt es auch weiterhin von größter Wichtigkeit die Entwicklung neuer, hochpotenter anti-HIV Wirkstoffe voranzutreiben.

Der Naturstoff Aureothin wurde im Verlauf eines Hochdurchsatz-Screenings als Substanz mit starkem anti-HIV Potential identifiziert und infolgedessen in dieser Dissertation als Grundlage zur Entwicklung der neuen Substanzklasse „*Multiple Gamma-Pyrone Inspired Compounds*“ (MAGIC), bestehend aus 33 vollsynthetischen Derivaten, herangezogen. Die daraus hervorgegangene optimierte Leitsubstanz #7 zeichnet sich durch ihre starke anti-HIV Aktivität ($IC_{90} < 45$ nM), Photostabilität und verbesserte Zytotoxizität aus. Substanz #7 inhibiert die HIV Infektion durch spezifisches Eingreifen in die posttranskriptionellen Vorgänge der Genexpression des HIV Genoms und somit mit einer vollkommen neuartigen Wirkungsweise, verglichen mit bereits zur Therapie zugelassenen anti-HIV Wirkstoffen. Die Proteomanalyse primärer Humanzellen deutet darauf hin, dass Substanz #7 besonders zelluläre mit der HIV Infektion assoziierte Signalwege beeinflusst, ohne dabei zu toxischen Nebenwirkungen zu führen. Substanz #7 zeigt zudem ein breites Wirkspektrum gegen alle HIV Wirtstropismen und Genotypen, einschließlich HIV-1 und HIV-2, sowie hohe Synergie in Kombination mit in der Klinik eingesetzten Reverse Transkriptase- und Integraseinhibitoren.

Zusammenfassend präsentiert diese Dissertation mit dem Aureothin-Derivat #7 eine Leitsubstanz zur möglichen zukünftigen Entwicklung einer neuen Klasse von HIV Inhibitoren, die es ermöglicht HIV Infektionen auf eine bisher einzigartige, zellbasierte Art und Weise bekämpfen zu können.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle A1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
/NM	/Naturstoffimitat
3TC	Lamivudin
ABC	Abacavir
ADME	Administration, Distribution, Metabolismus, Exkretion
AIDS	engl. „acquired immune deficiency syndrome“
APV	Amprenavir
ARM	Arginin-reiches Motiv
ARV	engl. „AIDS related virus“
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudin
B	Biologische Makromoleküle
BF	Hellfeld
BIC	Bictegravir
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cART	Antiretrovirale Kombinationstherapie
CC ₅₀	Zytotoxizitäts-Konzentration 50 %
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDK9	Cyclin-abhängige Kinase 9
COBI	Cobicistat
Ctrl	Kontrolle
d4T	Stavudin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
ddC	Zalcitabin
ddI	Didanosin
DLV	Delavirdin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium

Abkürzung	Bedeutung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-triphosphate
DOR	Doravirin
DRV	Darunavir
DTG	Dolutegravir
DTT	Dithiothreitol
EASY-HIT	Exilatorisches Vollreplikations-Assay System zur Identifizierung und Analyse von HIV Inhibitoren
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EFV	Efavirenz
EGTA	Ethylenglycol-bis(amino-ethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	engl. „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
Env	engl. „Envelope“
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ETR	Etravirin
EVG	Elvitegravir
fAPV	Fosamprenavir
FBS	Fetales Rinderserum
FDA	Food & Drug Administration
FLV	Flavopiridol
FTC	Emtricitabin
g	Gravitation
GFP	grünfluoreszierendes Protein
gp	Glykoprotein
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
hIL-2	Humanes Interleukin-2
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HTLV	Humanes T-lymphotropes Leukämie Virus

Abkürzung	Bedeutung
IBZ	Ibalizumab
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration 50 %
IC ₉₀	Inhibitorische Konzentration 90 %
IDAV	Immundefizienz-Assoziiertes Virus
IDV	Indinavir
IN	Integrase
INSTI	Integrase-Strangtransfer Inhibitor
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LAV	Lymphadenopathie-assoziiertes Virus
LPV/r	Lopinavir/Ritonavir
LRA	engl. „latency reactivating agent“
LTR	engl. „long terminal repeat“
m	Zahl der Replikate innerhalb eines Experimentes
MAGIC	Multiple Antiviral Gamma-Pyron Inspired Compounds
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MOI	Multiplizität der Infektion
MS	<i>Vollständig gespleißt</i>
MVC	Maraviroc
N	Unveränderte Naturstoffe
n	Anzahl Wiederholungen eines Experimentes
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogen-phosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Botanische Wirkstoffe
ND	Naturstoffderivate
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
Nef	Negativ regulierender Faktor
NFV	Nelfinavir
NNRTI	Nicht-nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
NP40	Nonidet®P40

Abkürzung	Bedeutung
NRTI	Nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
NVP	Nevirapin
ORF	Offenes Leseraster
P-TEFb	engl. „positive transcription elongation factor“
PBMC	Mononukleäre Zellen des Periphären Blutes
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PEP	Postexpositionsprophylaxe
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PIC	Prä-Integrations-Komplex
PR	Protease
PrEP	Präexpositionsprophylaxe
RAL	Raltegravir
Rev	Expressionsregulator Protein
RIC	rotfluoreszierende Zellen
RIL	Rilpivirin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRE	Rev Response Element
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
RTV	Ritonavir
R _x	Rest (im Molekül)
S	Synthetische Wirkstoffe
S*	Synthetische Wirkstoffe, deren Pharmakophor von Naturstoffen abstammt
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
SQV	Saquinavir
T-20	Enfuvirtid

Abkürzung	Bedeutung
TAF	Tenofovir-Alafenamid
TAR	<i>Trans</i> -activation Response Element
Tat	Transkriptions-Transaktivator
TCID ₅₀	tissue culture infection dose
TDF	Tenofovir
TOA	<i>Time-of-addition</i> Assay
TPV	Tipranavir
ÜN	Über Nacht
US	<i>ungespleißt</i>
V	Impfstoffe
Vif	Viraler Infektivitätsfaktor
Vpr	Virales Protein R
Vpu	Virales Protein U
Vpx	Virales Protein X
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZT	Zimmertemperatur
μ	mikro

7.4 Übersicht zur Zytotoxizität von MAGIC-Derivaten in LC5-RIC Zellen

Tabelle A2. Zytotoxizität von Aureothin und dessen synthetischer Derivate in LC5-RIC Zellen. Gezeigt sind die Konzentrationen halbmaximaler Toxizität (CC_{50}) jeder Substanz (#) nach 48 h Behandlung, ermittelt durch den CellTiter-Blue® Assay. Mittelwert und Standardabweichung wurden jeweils aus Daten von drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Triplikaten berechnet ($n = 3$; $m = 3$; $\pm SD$; n.d.= nicht definiert). Der Selektivitätsindex ergibt sich aus dem Quotienten des CC_{50} , sowie des IC_{50} aus Tabelle 14. Zugehörige Molekülstrukturen s. 1.2.3, Abbildung 13.

Substanz #	CellTiter-Blue® Assay CC_{50} (nM)	Selektivitätsindex CC_{50}/IC_{50}
0	> 10.000	> 4.500
1	> 10.000	> 1.850
2	> 10.000	n.d.
3	> 10.000	> 6.250
4	> 10.000	> 23
5	> 10.000	> 150
6	> 10.000	> 1.350
7	> 10.000	> 2.000
8	> 10.000	> 34
9	> 10.000	> 42
10	> 10.000	> 100
11	> 10.000	> 9
12	> 10.000	> 1.250
13	> 10.000	> 1.700
14	> 10.000	> 780
15	> 10.000	> 1.100
16	> 10.000	> 105
17	> 10.000	> 19
18	> 10.000	> 9
19	> 10.000	> 310
20	> 10.000	> 320
21	> 10.000	> 850
22	> 10.000	> 70
23	> 10.000	> 13
24	> 10.000	> 600
25	> 10.000	> 200

Substanz #	CellTiter-Blue® Assay CC ₅₀ (nM)	Selektivitätsindex CC ₅₀ / IC ₅₀
26	> 10.000	n.d.
27	> 10.000	> 900
28	> 10.000	> 2.200
29	> 10.000	> 260
30	> 10.000	> 110
31	> 10.000	> 170
32	> 10.000	> 600
33	> 10.000	> 165
34	> 10.000	> 135

7.5 Anti-HIV Wirkung von MAGIC-Derivaten in H9 Zellen

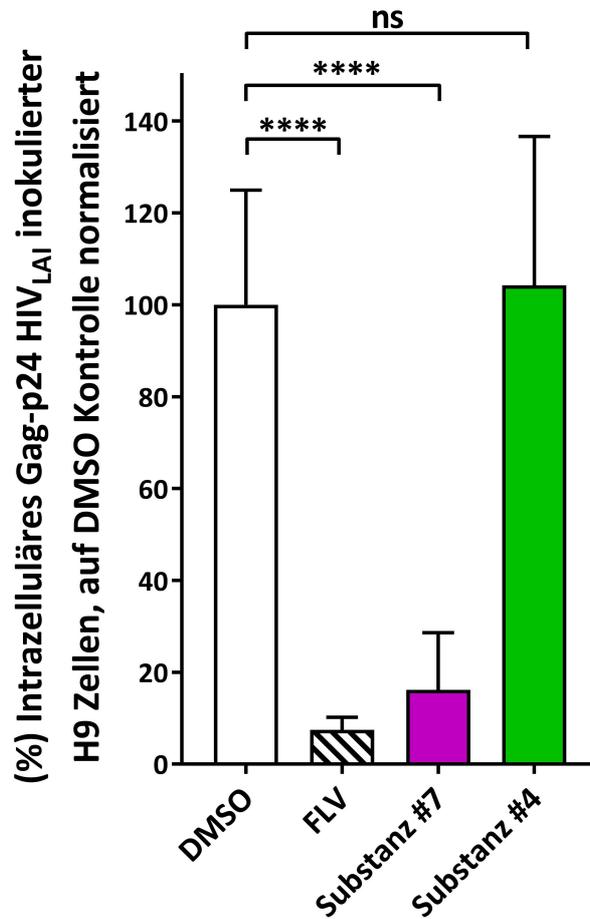


Abbildung A4. Effekte von Substanz #7 auf HIV spezifische Proteinexpression in H9 Zellen. Dargestellt sind die Anteile (%) intrazellulären Gag-p24 HIV_{LAI} inokulierter H9 Zellen, die mit Beginn der Inokulation des Virus für 48 h mit entweder DMSO (weiß), Flavopiridol (FLV, diagonal gestreift) oder den Aureothin-Derivaten #7 (magenta) und #4 (grün) mit jeweils 100 nM behandelt wurden. Mittelwert und Standardabweichung wurden jeweils aus Daten von drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Duplikaten berechnet ($n = 3$; $m = 2$; SD) und auf die DMSO Kontrolle normalisiert. Um zu prüfen, ob sich die Effekte behandelter Proben statistisch signifikant ($P < 0.05$) von der DMSO Kontrolle unterscheiden, wurde ein one-way ANOVA Signifikanztest (Dunnett's test) durchgeführt. Die Werte der statistischen Signifikanz (P Werte) sind durch Sternchen (*) angezeigt. **** $P \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant.

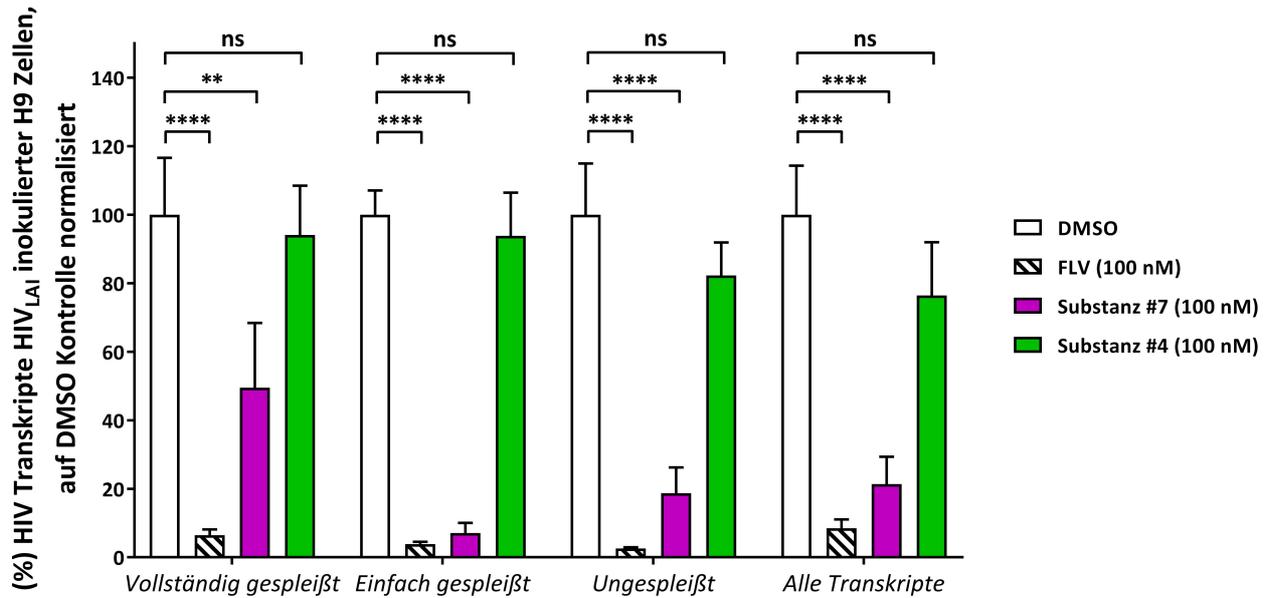


Abbildung A5. Effekte von Substanz #7 auf HIV spezifische Transkription in H9 Zellen. Dargestellt sind die Anteile (%) der HIV Transkripte (*Vollständig gespleißt*, *Einfach gespleißt*, *Ungespleißt* und *Alle Transkripte*) HIV-1_{LAI} inokulierte H9 Zellen, die mit Beginn der Inokulation des Virus für 48 h mit entweder DMSO (weiß), Flavopiridol (FLV, diagonal gestreift) oder den Substanzen #7 (magenta) und #4 (grün) mit jeweils 100 nM behandelt wurden. Mittelwert und Standardabweichung wurden jeweils aus Daten von drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Duplikaten berechnet ($n = 3$; $m = 2$; SD) und auf die DMSO Kontrolle normalisiert. Um zu prüfen, ob sich die Effekte behandelter Proben statistisch signifikant ($P < 0.05$) von der DMSO Kontrolle unterscheiden, wurde ein two-way ANOVA Signifikanztest (Dunnnett's test) durchgeführt. Die Werte der statistischen Signifikanz (P Werte) sind durch Sternchen (*) angezeigt. $*P \leq 0.1$, $****P \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant.

7.6 Zusatz zur Proteomicsanalyse

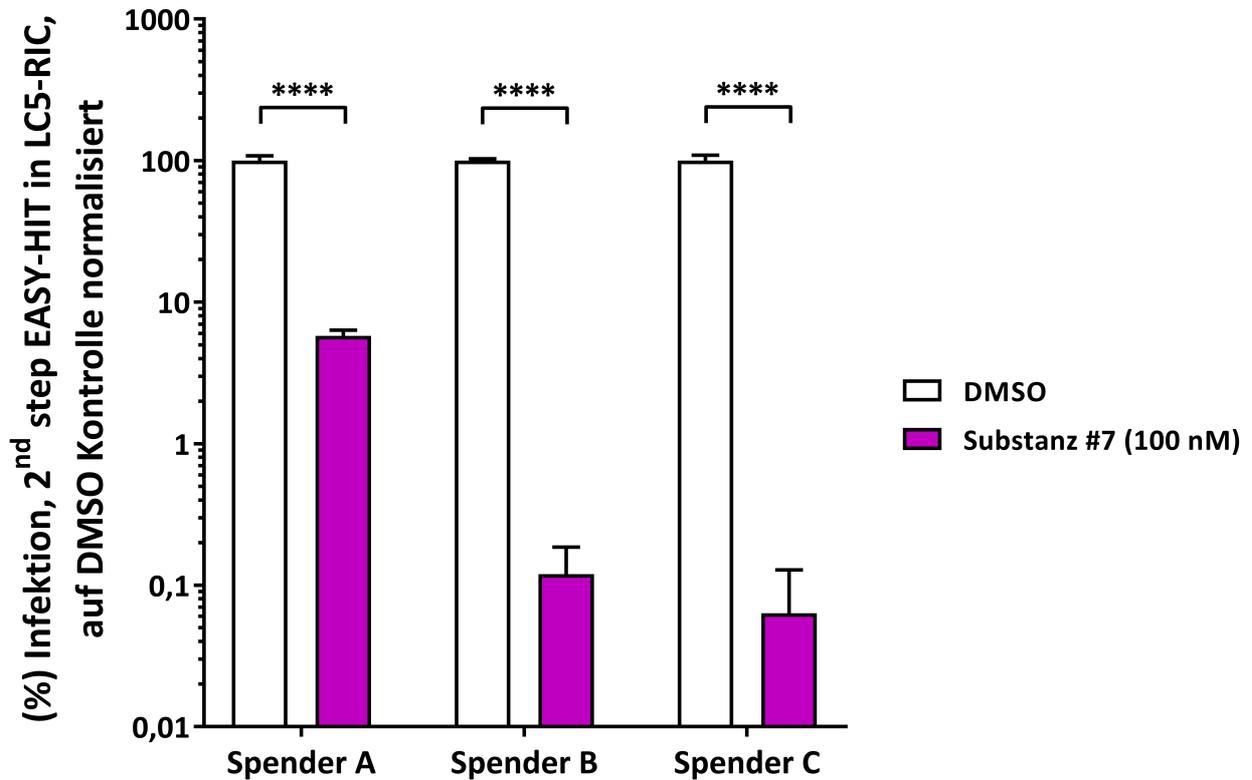


Abbildung A6. EASY-HIT Kontrolle des anti-HIV Effektes von Substanz #7 in HIV-1 inokulierten und zur Proteomicsanalyse verwendeten PBMC. Das Proteom in PBMC Proteinlysaten wurde nur zur weiteren Analyse herangezogen, wenn die anti-HIV Aktivität von Substanz #7 mittels 2nd step EASY-HIT (Kontrolle der Produktion infektiöser Viruspartikel) bestätigt werden konnte. Hierfür wurden LC5-RIC Zellen mit Überständen der HIV-1_{LAI} inokulierten und simultan zur Inokulation mit Substanz #7 behandelten (48 h Behandlung) PBMC inokuliert. Dargestellt ist die inhibitorische Aktivität von Substanz #7 (magenta) in PBMC der Spender A-C in logarithmischer Auftragung der Anteile (%) der Infektion im Vergleich zur DMSO Kontrolle (weiß). Um zu prüfen, ob sich die Effekte behandelter Proben statistisch signifikant ($P < 0.05$) von der DMSO Kontrolle unterscheiden, wurde ein two-way ANOVA Signifikanztest (Dunnnett's test) durchgeführt. Die Werte der statistischen Signifikanz (P Werte) sind durch Sternchen (*) angezeigt. **** $P \leq 0.0001$.

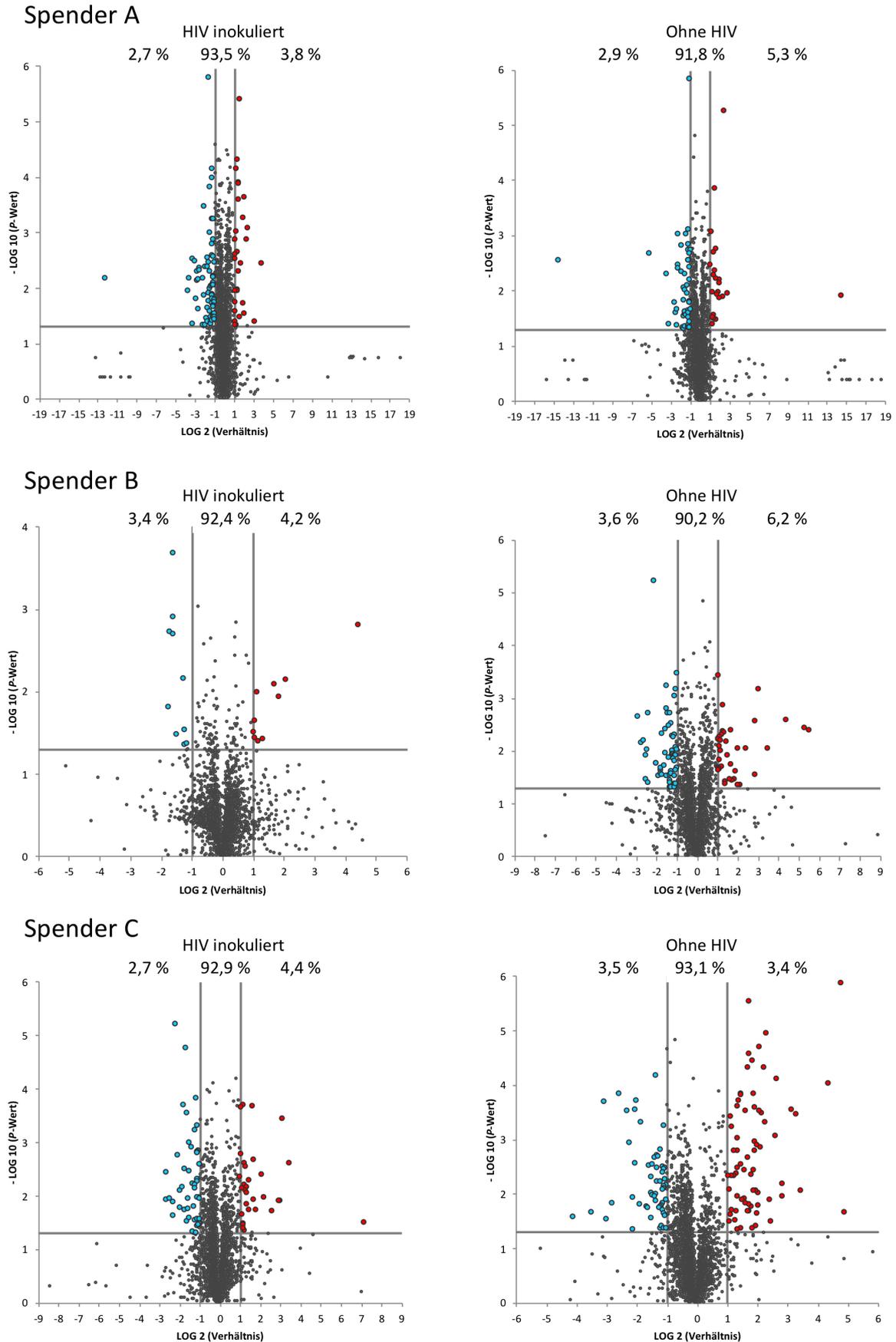


Abbildung A7. Volcano Plots der Proteomicsanalyse aus drei Spendern. Dargestellt sind die prozentualen Anteile herunterregulierter (links), unveränderter (Mitte) und hochregulierter Proteine (rechts) in HIV-1 inokulierten, sowie nicht inokulierten PBMC aus den Spendern A-C. Angefärbte Proteine zeigen signifikante Änderung (≥ 2 -fach).

Tabelle A3. Daten zur Proteomics-Enrichment-Analyse der differentiell exprimierten Proteine Substanz #7 behandelter PBMC. Aufgeführt sind die zu Abbildung 32 (s. 4.3.3) korrespondierenden Daten, berechnet auf der Grundlage von 289 hoch- und 372 runterregulierten Genen/Proteinen aus Substanz #7 behandelten und HIV-1_{LAI} inokulierten oder nicht-inokulierten PBMC von insgesamt drei verschiedenen Spendern. ¹HIV inokuliert und hochregulierte Gene/Proteine, ²HIV inokuliert und runterregulierte Gene/Proteine, ³nicht inokuliert und hochregulierte Gene/Proteine, ⁴nicht inokuliert und runterregulierte Gene/Proteine.

	Bezeichnung	Kategorie	¹ HIV↓	² HIV↑	³ uninok.↓	⁴ uninok.↑
A	# GO-biologischer Prozesse		350	178	454	347
Rang 1-10 (P Wert)	Immunantwort	Immun-system	4,59E-09			8,45E-08
	Immunsystemprozesse		1,20E-08	5,51E-07		
	Zellaktivierung		1,71E-07			
Rang >10 (P Wert)	Virusprozesse	Virale Infektion		1,02E-04	4,24E-04	9,48E-05
	Virusreplikationszyklus			1,24E-03		6,79E-05
	Reaktion auf Virus		9,57E-03	6,49E-03	4,55E-03	
	Intrazellulärer Virustransport			8,86E-04		
	Virale Genexpression			4,71E-06		2,09E-03
	Virale Transkription			8,96E-06		1,09E-03
	Immunantwort	Immun-system			5,72E-03	
	Immunsystemprozesse				9,66E-14	6,43E-07
	Zellaktivierung				4,37E-14	9,65E-05
	Reaktion auf Interferon-γ			7,83E-05		5,24E-04
	Aktivierung der Leukozyten		4,91E-05	3,74E-04	3,89E-08	1,11E-04
	Aktivierung myeloider Leukozyten		5,89E-05		3,89E-08	9,08E-05
	Leukozytenmigration		5,19E-07		4,09E-09	
	Leukozyten vermittelte Immunität		1,01E-05		3,13E-08	8,54E-04
	Regulation des IκB Kinase/NFκB Signalwegs			2,30E-04		5,80E-05
B	# kanonischer Signalwege		26	8	23	15
Rang 1-10 (P Wert)	Hämostase	Bezug zu HIV Infektion	1,72E-06		3,07E-15	
	Blutgerinnung				4,10E-11	
	HIF-1α Transkriptionsfaktor-netzwerk		3,89E-05		7,36E-06	
	Innate Immunsystem		9,53E-05		4,44E-07	
	Extrazelluläre Matrixorganisation		1,94E-04		2,52E-06	
	Immunsystem		1,40E-03		6,53E-06	9,21E-04

	Bezeichnung	Kategorie	¹ HIV↓	² HIV↑	³ uninok.↓	⁴ uninok.↑	
	HIV-1 Nef: negativer Effektor von Fas/ TNFα		4,33E-04				
	Apoptose-Caspase-Kaskade		7,35E-04				
Rang >10 (P Wert)	Apoptotische Signale als Antwort auf DNA Schäden	Apoptose	2,15E-03				
	Induktion der Apoptose durch dr3 und dr4/5 Tod-Rezeptoren		9,21E-03				
	Apoptose-Signalweg		5,65E-03				
	FAS Signalweg		5,78E-03				
	TNFα		6,28E-03				
	Innate Immunsystem	Bezug zu HIV Infektion				7,43E-03	
	Regulation des Zellzyklus durch plk3		4,55E-03		5,30E-03		
	Blutgerinnung		9,72E-03				
	Syndecan-4-vermittelte Signale		3,08E-03				
	Chorea Huntington		7,15E-03				
C	# Krankheiten - MeSH		2528	253	2591	925	
Rang 1-10 (P Wert)	Lymphatische Erkrankungen	Immun- erkran- kungen	3,72E-16				
	Lymphoproliferative Störungen		6,36E-16				
	Immunproliferative Störungen		1,56E-14				
	Immunologische Defizienzsyndrome		3,56E-15				
	RNA Virus Infektionen		4,91E-15				
	Lentivirus Infektionen		2,86E-14				
Rang >10 (P Wert)	Lymphatische Erkrankungen	Immun- erkran- kungen			2,43E-15		
	Lymphoproliferative Störungen				8,28E-13	7,96E-04	
	Immunproliferative Störungen				8,28E-13	5,66E-04	
	Immunologische Defizienzsyndrome			8,14E-05	7,17E-15	5,80E-07	
	Lentivirus Infektionen			1,36E-04	1,99E-16	7,99E-07	
	RNA Virus Infektionen			1,43E-04	1,92E-17	1,63E-05	
	HIV Infektionen			7,51E-14	1,53E-04	4,97E-16	1,67E-06
	DNA Virus Infektionen			3,18E-08	1,81E-04	2,85E-13	1,01E-05
Retrovirus Infektionen		4,23E-13	8,33E-05	5,32E-16	9,52E-07		
D	# Unigene Gewebe		79	82	80	81	
Rang	Hämolympheoides System		6,49E-17	5,15E-30	1,76E-12	1,03E-34	

/. Anhang

	Bezeichnung	Kategorie	¹ HIV↓	² HIV↑	³ uninok.↓	⁴ uninok.↑
1-10 (P Wert)	Blut	Blutzellen		1,93E-26		2,23E-37
	Leukozyten					5,31E-29
Rang >10 (P Wert)	Blut	Blutzellen	2,28E-11		1,36E-09	
	Leukozyten			3,54E-20	5,17E-09	

8. Referenzen

1. Gottlieb, M. S. (1981) Epidemiologic Notes and Reports: Pneumocystis Pneumonia --- Los Angeles. in *Morbidity and Mortality Weekly Report*
2. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871
3. Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., and Popovic, M. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-867
4. Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., and Weiss, R. (1986) What to call the AIDS virus? *Nature* **321**
5. Cohen, J., and Enserink, M. (2008) Nobel Prize in Physiology or Medicine. HIV, HPV researchers honored, but one scientist is left out. *Science* **322**, 174-175
6. Pincock, S. (2008) HIV discoverers awarded Nobel Prize for medicine. *Lancet* **372**, 1373
7. WHO. (2019) HIV/AIDS - Global Health Observatory Data. www.who.int/gho/hiv/en/
8. UNAIDS. (2019) AIDSinfo. Geneva: <https://aidsinfo.unaids.org/>
9. WHO. (2019) Progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2019. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/324797/WHO-CDS-HIV-19.7-eng.pdf?ua=1>
10. CDC. (2019) HIV Transmission. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html>
11. Cohen, M. S., Chen, Y. Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M. C., Kumarasamy, N., Hakim, J. G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J. H., Godbole, S. V., Mehendale, S., Chariyalertsak, S., Santos, B. R., Mayer, K. H., Hoffman, I. F., Eshleman, S. H., Piwowar-Manning, E., Wang, L., Makhema, J., Mills, L. A., de Bruyn, G., Sanne, I., Eron, J., Gallant, J., Havlir, D., Swindells, S., Ribaud, H., Elharrar, V., Burns, D., Taha, T. E., Nielsen-Saines, K., Celentano, D., Essex, M., Fleming, T. R., and Team, H. S. (2011) Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med* **365**, 493-505
12. Rodger, A. J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., Degen, O., Corbelli, G. M., Estrada, V., Geretti, A. M., Beloukas, A., Raben, D., Coll, P., Antinori, A., Nwokolo, N., Rieger, A., Prins, J. M., Blaxhult, A., Weber, R., Van Eeden, A., Brockmeyer, N. H., Clarke, A., Del Romero Guerrero, J., Raffi, F., Bogner, J. R., Wandeler, G., Gerstoft, J., Gutierrez, F., Brinkman, K., Kitchen, M., Ostergaard, L., Leon, A., Ristola, M., Jessen, H., Stellbrink, H. J., Phillips, A. N., Lundgren, J., and Group, P. S. (2019) Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *Lancet* **393**, 2428-2438
13. Hecht, F. M., Busch, M. P., Rawal, B., Webb, M., Rosenberg, E., Swanson, M., Chesney, M., Anderson, J., Levy, J., and Kahn, J. O. (2002) Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS* **16**, 1119-1129
14. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., and Schätzl, H. (2010) *Molekulare Virologie*, 3 ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

15. WHO. (2007) HIV/AIDS Programme - Strengthening health services to fight HIV/AIDS - WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children.
16. Kramer, A., Biggar, R. J., Hampl, H., Friedman, R. M., Fuchs, D., Wachter, H., and Goedert, J. J. (1992) Immunologic markers of progression to acquired immunodeficiency syndrome are time-dependent and illness-specific. *Am J Epidemiol* **136**, 71-80
17. Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K. L., and Macallan, D. C. (2013) Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev Med Virol* **23**, 221-240
18. Gurtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M., and Kaptue, L. (1994) A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* **68**, 1581-1585
19. McCutchan, F. E. (2006) Global epidemiology of HIV. *J Med Virol* **78 Suppl 1**, S7-S12
20. Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Leme, V., Damond, F., Robertson, D. L., and Simon, F. (2009) A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**, 871-872
21. Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D., Osmanov, S., Isolation, W.-U. N. f. H., and Characterisation. (2011) Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* **25**, 679-689
22. Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (2011) Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a006841
23. Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., and Wain-Hobson, S. (1990) Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**, 356-359
24. Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H., and Johnson, P. R. (1989) An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**, 389-392
25. Zhu, T., Korber, B. T., Nahmias, A. J., Hooper, E., Sharp, P. M., and Ho, D. D. (1998) An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594-597
26. Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D. E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J. J., Kabongo, J. M., Kalengayi, R. M., Van Marck, E., Gilbert, M. T., and Wolinsky, S. M. (2008) Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* **455**, 661-664
27. Gierstorfer, C. (2016) AIDS - Erbe der Kolonialzeit. Deutschland, Frankreich, Belgien
28. Garry, R. F., Witte, M. H., Gottlieb, A. A., Elvin-Lewis, M., Gottlieb, M. S., Witte, C. L., Alexander, S. S., Cole, W. R., and Drake, W. L., Jr. (1988) Documentation of an AIDS virus infection in the United States in 1968. *JAMA* **260**, 2085-2087
29. Jaffe, H. W., Darrow, W. W., Echenberg, D. F., O'Malley, P. M., Getchell, J. P., Kalyanaraman, V. S., Byers, R. H., Drennan, D. P., Braff, E. H., Curran, J. W., and et al. (1985) The acquired immunodeficiency syndrome in a cohort of homosexual men. A six-year follow-up study. *Ann Intern Med* **103**, 210-214
30. Stevens, C. E., Taylor, P. E., Zang, E. A., Morrison, J. M., Harley, E. J., Rodriguez de Cordoba, S., Bacino, C., Ting, R. C., Bodner, A. J., Sarngadharan, M. G., and et al. (1986) Human T-cell lymphotropic virus type III infection in a cohort of homosexual men in New York City. *JAMA* **255**, 2167-2172

31. German Advisory Committee Blood, S. A. o. P. T. b. B. (2016) Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother* **43**, 203-222
32. Frankel, A. D., and Young, J. A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25
33. Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K., and et al. (1985) Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**, 277-284
34. Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Segeal, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011) SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**, 654-657
35. Karn, J., and Stoltzfus, C. M. (2012) Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006916
36. Hansen, M. M. K., Wen, W. Y., Ingerman, E., Razooky, B. S., Thompson, C. E., Dar, R. D., Chin, C. W., Simpson, M. L., and Weinberger, L. S. (2018) A Post-Transcriptional Feedback Mechanism for Noise Suppression and Fate Stabilization. *Cell* **173**, 1609-1621 e1615
37. Hansen, M. M. K., and Weinberger, L. S. (2019) Post-Transcriptional Noise Control. *Bioessays* **41**, e1900044
38. Pollard, V. W., and Malim, M. H. (1998) The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**, 491-532
39. Wolff, H., Hadian, K., Ziegler, M., Weierich, C., Kramer-Hammerle, S., Kleinschmidt, A., Erfle, V., and Brack-Werner, R. (2006) Analysis of the influence of subcellular localization of the HIV Rev protein on Rev-dependent gene expression by multi-fluorescence live-cell imaging. *Exp Cell Res* **312**, 443-456
40. Purcell, D. F., and Martin, M. A. (1993) Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* **67**, 6365-6378
41. Damgaard, C. K., Andersen, E. S., Knudsen, B., Gorodkin, J., and Kjems, J. (2004) RNA interactions in the 5' region of the HIV-1 genome. *J Mol Biol* **336**, 369-379
42. Watts, J. M., Dang, K. K., Gorelick, R. J., Leonard, C. W., Bess, J. W., Jr., Swanstrom, R., Burch, C. L., and Weeks, K. M. (2009) Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* **460**, 711-716
43. Peeters, M., and Sharp, P. M. (2000) Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* **14 Suppl 3**, S129-140
44. Chen, J., Nikolaitchik, O., Singh, J., Wright, A., Bencsics, C. E., Coffin, J. M., Ni, N., Lockett, S., Pathak, V. K., and Hu, W. S. (2009) High efficiency of HIV-1 genomic RNA packaging and heterozygote formation revealed by single virion analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13535-13540
45. Muriaux, D., and Darlix, J. L. (2010) Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol* **7**, 744-753
46. Khan, M. A., Aberham, C., Kao, S., Akari, H., Gorelick, R., Bour, S., and Strebel, K. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol* **75**, 7252-7265

47. Niedrig, M., Gelderblom, H. R., Pauli, G., Marz, J., Bickhard, H., Wolf, H., and Modrow, S. (1994) Inhibition of infectious human immunodeficiency virus type 1 particle formation by Gag protein-derived peptides. *J Gen Virol* **75 (Pt 6)**, 1469-1474
48. Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J. D., Grise, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A., and Roux, K. H. (2006) Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**, 847-852
49. Gelderblom, H. R. (1991) Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**, 617-637
50. Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273
51. Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A., and Sodroski, J. G. (1998) The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705-711
52. Hill, C. P., Worthylake, D., Bancroft, D. P., Christensen, A. M., and Sundquist, W. I. (1996) Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3099-3104
53. Freed, E. O., and Martin, M. A. (1996) Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* **70**, 341-351
54. Kondo, E., and Gottlinger, H. G. (1996) A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* **70**, 159-164
55. Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A., and Freed, E. O. (1995) p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* **69**, 6810-6818
56. Wang, J., Smerdon, S. J., Jager, J., Kohlstaedt, L. A., Rice, P. A., Friedman, J. M., and Steitz, T. A. (1994) Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7242-7246
57. Piller, S. C., Caly, L., and Jans, D. A. (2003) Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV? *Curr Drug Targets* **4**, 409-429
58. Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D. C., Oravec, T., Hascall, V. C., and Norcross, M. A. (1993) Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 167-174
59. Connell, B. J., and Lortat-Jacob, H. (2013) Human immunodeficiency virus and heparan sulfate: from attachment to entry inhibition. *Front Immunol* **4**, 385
60. Clapham, P. R., and Weiss, R. A. (1997) Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. *Nature* **388**, 230-231
61. Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648-659
62. Spector, C., Mele, A. R., Wigdahl, B., and Nonnemacher, M. R. (2019) Genetic variation and function of the HIV-1 Tat protein. *Med Microbiol Immunol* **208**, 131-169

63. Rana, T. M., and Jeang, K. T. (1999) Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys* **365**, 175-185
64. Price, D. H. (2000) P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **20**, 2629-2634
65. Gu, J., Babayeva, N. D., Suwa, Y., Baranovskiy, A. G., Price, D. H., and Tahirov, T. H. (2014) Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb and AFF4. *Cell Cycle* **13**, 1788-1797
66. Mueller, N., Pasternak, A. O., Klaver, B., Cornelissen, M., Berkhout, B., and Das, A. T. (2018) The HIV-1 Tat Protein Enhances Splicing at the Major Splice Donor Site. *J Virol* **92**
67. Berro, R., Kehn, K., de la Fuente, C., Pumfery, A., Adair, R., Wade, J., Colberg-Poley, A. M., Hiscott, J., and Kashanchi, F. (2006) Acetylated Tat regulates human immunodeficiency virus type 1 splicing through its interaction with the splicing regulator p32. *J Virol* **80**, 3189-3204
68. Levin, A., Hayouka, Z., Brack-Werner, R., Volsky, D. J., Friedler, A., and Loyter, A. (2009) Novel regulation of HIV-1 replication and pathogenicity: Rev inhibition of integration. *Protein Eng Des Sel* **22**, 753-763
69. Geyer, M., Fackler, O. T., and Peterlin, B. M. (2001) Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep* **2**, 580-585
70. O'Neill, E., Kuo, L. S., Krisko, J. F., Tomchick, D. R., Garcia, J. V., and Foster, J. L. (2006) Dynamic evolution of the human immunodeficiency virus type 1 pathogenic factor, Nef. *J Virol* **80**, 1311-1320
71. Roeth, J. F., and Collins, K. L. (2006) Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 548-563
72. Le Gall, S., Heard, J. M., and Schwartz, O. (1997) Analysis of Nef-induced MHC-I endocytosis. *Res Virol* **148**, 43-47
73. Mangasarian, A., and Trono, D. (1997) The multifaceted role of HIV Nef. *Res Virol* **148**, 30-33
74. Kirchhoff, F., Schindler, M., Specht, A., Arhel, N., and Munch, J. (2008) Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2621-2636
75. Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998) Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem* **273**, 13347-13352
76. Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M. A., Ratner, L., Lane, C. M., Moore, M. S., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998) Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO J* **17**, 909-917
77. Bour, S., Schubert, U., and Strebel, K. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J Virol* **69**, 1510-1520
78. Neil, S. J., Zang, T., and Bieniasz, P. D. (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**, 425-430
79. Pujol, F. M., Laketa, V., Schmidt, F., Mukenhirn, M., Muller, B., Boulant, S., Grimm, D., Keppler, O. T., and Fackler, O. T. (2016) HIV-1 Vpu Antagonizes CD317/Tetherin by Adaptor Protein-1-Mediated Exclusion from Virus Assembly Sites. *J Virol* **90**, 6709-6723

80. Kerkau, T., Bacik, I., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., Hunig, T., Schimpl, A., and Schubert, U. (1997) The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med* **185**, 1295-1305
81. Henriet, S., Mercenne, G., Bernacchi, S., Paillart, J. C., and Marquet, R. (2009) Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 211-232
82. Matthews, T. J., Weinhold, K. J., Lyerly, H. K., Langlois, A. J., Wigzell, H., and Bolognesi, D. P. (1987) Interaction between the human T-cell lymphotropic virus type IIIB envelope glycoprotein gp120 and the surface antigen CD4: role of carbohydrate in binding and cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5424-5428
83. Eiden, L. E., and Lifson, J. D. (1992) HIV interactions with CD4: a continuum of conformations and consequences. *Immunol Today* **13**, 201-206
84. Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J. D., Penhallow, R. C., Bensch, K. G., and Engleman, E. G. (1987) pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**, 659-668
85. Rankovic, S., Varadarajan, J., Ramalho, R., Aiken, C., and Rousso, I. (2017) Reverse Transcription Mechanically Initiates HIV-1 Capsid Disassembly. *J Virol* **91**
86. Gianotti, N., Moretti, F., Tambussi, G., Capiluppi, B., Ferrari, M., and Lazzarin, A. (1999) The rationale for a study on HIV-1 reverse transcriptase mutations and outcome of antiretroviral therapy with two nucleoside analogs. *J Biol Regul Homeost Agents* **13**, 158-162
87. Pabis, M., Corsini, L., Vincendeau, M., Tripsianes, K., Gibson, T. J., Brack-Werner, R., and Sattler, M. (2019) Modulation of HIV-1 gene expression by binding of a ULM motif in the Rev protein to UHM-containing splicing factors. *Nucleic Acids Res* **47**, 4859-4871
88. Checkley, M. A., Luttge, B. G., and Freed, E. O. (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* **410**, 582-608
89. Zhang, X., Zhou, T., Frabutt, D. A., and Zheng, Y. H. (2016) HIV-1 Vpr increases Env expression by preventing Env from endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD). *Virology* **496**, 194-202
90. FDA. FDA approval of small molecule Retrovir Capsules 1987, Zugänglich über: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/019910s033lbl.pdf.
91. Gottlieb, M. S., Wolfe, P. R., and Chafey, S. (1987) Response of AIDS-related thrombocytopenia to intravenous and oral azidothymidine (3'-azido-3'-deoxythymidine). *AIDS Res Hum Retroviruses* **3**, 109-114
92. Vitoria, M., Rangaraj, A., Ford, N., and Doherty, M. (2019) Current and future priorities for the development of optimal HIV drugs. *Curr Opin HIV AIDS* **14**, 143-149
93. Vella, S., Schwartzlander, B., Sow, S. P., Eholie, S. P., and Murphy, R. L. (2012) The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. *AIDS* **26**, 1231-1241

94. Ross, E. L., Weinstein, M. C., Schackman, B. R., Sax, P. E., Paltiel, A. D., Walensky, R. P., Freedberg, K. A., and Losina, E. (2015) The clinical role and cost-effectiveness of long-acting antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* **60**, 1102-1110
95. Baril, J. G., Angel, J. B., Gill, M. J., Gathe, J., Cahn, P., van Wyk, J., and Walmsley, S. (2016) Dual Therapy Treatment Strategies for the Management of Patients Infected with HIV: A Systematic Review of Current Evidence in ARV-Naive or ARV-Experienced, Virologically Suppressed Patients. *PLoS One* **11**, e0148231
96. Maggiolo, F., Gulminetti, R., Pagnucco, L., Digaetano, M., Benatti, S., Valenti, D., Callegaro, A., Ripamonti, D., and Mussini, C. (2017) Lamivudine/dolutegravir dual therapy in HIV-infected, virologically suppressed patients. *BMC Infect Dis* **17**, 215
97. McCormack, S., Dunn, D. T., Desai, M., Dolling, D. I., Gafos, M., Gilson, R., Sullivan, A. K., Clarke, A., Reeves, I., Schembri, G., Mackie, N., Bowman, C., Lacey, C. J., Apea, V., Brady, M., Fox, J., Taylor, S., Antonucci, S., Khoo, S. H., Rooney, J., Nardone, A., Fisher, M., McOwan, A., Phillips, A. N., Johnson, A. M., Gazzard, B., and Gill, O. N. (2016) Pre-exposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection (PROUD): effectiveness results from the pilot phase of a pragmatic open-label randomised trial. *Lancet* **387**, 53-60
98. Jack, A. (2016) PrEP, Truvada, and Gilead. *BMJ* **354**, i4800
99. Cardo, D. M., Culver, D. H., Ciesielski, C. A., Srivastava, P. U., Marcus, R., Abiteboul, D., Heptonstall, J., Ippolito, G., Lot, F., McKibben, P. S., and Bell, D. M. (1997) A case-control study of HIV seroconversion in health care workers after percutaneous exposure. Centers for Disease Control and Prevention Needlestick Surveillance Group. *N Engl J Med* **337**, 1485-1490
100. Gatanaga, H., and Oka, S. (2019) Comment on: Tenofovir DF/emtricitabine/rilpivirine as HIV post-exposure prophylaxis: results from a multicentre prospective study. *J Antimicrob Chemother*
101. CDC. (2019) HIV Post-Exposition Prophylaxis PEP. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/pep.html>
102. Abram, M. E., Ferris, A. L., Shao, W., Alvord, W. G., and Hughes, S. H. (2010) Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J Virol* **84**, 9864-9878
103. Levy, D. N., Aldrovandi, G. M., Kutsch, O., and Shaw, G. M. (2004) Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4204-4209
104. Coffin, J. M. (1995) HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**, 483-489
105. Keele, B. F., Giorgi, E. E., Salazar-Gonzalez, J. F., Decker, J. M., Pham, K. T., Salazar, M. G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J. L., Gao, F., Anderson, J. A., Ping, L. H., Swanstrom, R., Tomaras, G. D., Blattner, W. A., Goepfert, P. A., Kilby, J. M., Saag, M. S., Delwart, E. L., Busch, M. P., Cohen, M. S., Montefiori, D. C., Haynes, B. F., Gaschen, B., Athreya, G. S., Lee, H. Y., Wood, N., Seoighe, C., Perelson, A. S., Bhattacharya, T., Korber, B. T., Hahn, B. H., and Shaw, G. M. (2008) Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7552-7557
106. Perelson, A. S., and Ribeiro, R. M. (2013) Modeling the within-host dynamics of HIV infection. *BMC Biol* **11**, 96

107. Clutter, D. S., Jordan, M. R., Bertagnolio, S., and Shafer, R. W. (2016) HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect Genet Evol* **46**, 292-307
108. Whitcomb, J. M., Parkin, N. T., Chappey, C., Hellmann, N. S., and Petropoulos, C. J. (2003) Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Infect Dis* **188**, 992-1000
109. Melikian, G. L., Rhee, S. Y., Taylor, J., Fessel, W. J., Kaufman, D., Towner, W., Troia-Cancio, P. V., Zolopa, A., Robbins, G. K., Kagan, R., Israelski, D., and Shafer, R. W. (2012) Standardized comparison of the relative impacts of HIV-1 reverse transcriptase (RT) mutations on nucleoside RT inhibitor susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 2305-2313
110. Rosen, S., Long, L., Sanne, I., Stevens, W. S., and Fox, M. P. (2011) The net cost of incorporating resistance testing into HIV/AIDS treatment in South Africa: a Markov model with primary data. *J Int AIDS Soc* **14**, 24
111. Levison, J. H., Wood, R., Scott, C. A., Ciaranello, A. L., Martinson, N. A., Rusu, C., Losina, E., Freedberg, K. A., and Walensky, R. P. (2013) The clinical and economic impact of genotype testing at first-line antiretroviral therapy failure for HIV-infected patients in South Africa. *Clin Infect Dis* **56**, 587-597
112. Tang, M. W., and Shafer, R. W. (2012) HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs* **72**, e1-25
113. Campbell, T. B., Shulman, N. S., Johnson, S. C., Zolopa, A. R., Young, R. K., Bushman, L., Fletcher, C. V., Lanier, E. R., Merigan, T. C., and Kuritzkes, D. R. (2005) Antiviral activity of lamivudine in salvage therapy for multidrug-resistant HIV-1 infection. *Clin Infect Dis* **41**, 236-242
114. Castagna, A., Danise, A., Menzo, S., Galli, L., Gianotti, N., Carini, E., Boeri, E., Galli, A., Cernuschi, M., Hasson, H., Clementi, M., and Lazzarin, A. (2006) Lamivudine monotherapy in HIV-1-infected patients harbouring a lamivudine-resistant virus: a randomized pilot study (E-184V study). *AIDS* **20**, 795-803
115. Melikian, G. L., Rhee, S. Y., Varghese, V., Porter, D., White, K., Taylor, J., Towner, W., Troia, P., Burack, J., Dejesus, E., Robbins, G. K., Razzeca, K., Kagan, R., Liu, T. F., Fessel, W. J., Israelski, D., and Shafer, R. W. (2014) Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. *J Antimicrob Chemother* **69**, 12-20
116. Larder, B. A. (1994) Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Gen Virol* **75 (Pt 5)**, 951-957
117. Vingerhoets, J., Tambuyzer, L., Azijn, H., Hoogstoel, A., Nijs, S., Peeters, M., de Bethune, M. P., De Smedt, G., Woodfall, B., and Picchio, G. (2010) Resistance profile of etravirine: combined analysis of baseline genotypic and phenotypic data from the randomized, controlled Phase III clinical studies. *AIDS* **24**, 503-514
118. King, M. S., Rode, R., Cohen-Codar, I., Calvez, V., Marcelin, A. G., Hanna, G. J., and Kempf, D. J. (2007) Predictive genotypic algorithm for virologic response to lopinavir-ritonavir in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3067-3074
119. de Meyer, S., Vangeneugden, T., van Baelen, B., de Paepe, E., van Marck, H., Picchio, G., Lefebvre, E., and de Bethune, M. P. (2008) Resistance profile of darunavir: combined 24-week results from the POWER trials. *AIDS Res Hum Retroviruses* **24**, 379-388

120. Shahriar, R., Rhee, S. Y., Liu, T. F., Fessel, W. J., Scarsella, A., Towner, W., Holmes, S. P., Zolopa, A. R., and Shafer, R. W. (2009) Nonpolymorphic human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase treatment-selected mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4869-4878
121. Barber, T. J., Harrison, L., Asboe, D., Williams, I., Kirk, S., Gilson, R., Bansi, L., Pillay, D., Dunn, D., Database, U. H. D. R., and Committees, U. K. C. H. C. S. S. (2012) Frequency and patterns of protease gene resistance mutations in HIV-infected patients treated with lopinavir/ritonavir as their first protease inhibitor. *J Antimicrob Chemother* **67**, 995-1000
122. Dolling, D. I., Dunn, D. T., Sutherland, K. A., Pillay, D., Mbisa, J. L., Parry, C. M., Post, F. A., Sabin, C. A., Cane, P. A., Database, U. H. D. R., and Study, U. K. C. H. C. (2013) Low frequency of genotypic resistance in HIV-1-infected patients failing an atazanavir-containing regimen: a clinical cohort study. *J Antimicrob Chemother* **68**, 2339-2343
123. Eron, J. J., Clotet, B., Durant, J., Katlama, C., Kumar, P., Lazzarin, A., Poizot-Martin, I., Richmond, G., Soriano, V., Ait-Khaled, M., Fujiwara, T., Huang, J., Min, S., Vavro, C., Yeo, J., and Group, V. S. (2013) Safety and efficacy of dolutegravir in treatment-experienced subjects with raltegravir-resistant HIV type 1 infection: 24-week results of the VIKING Study. *J Infect Dis* **207**, 740-748
124. Huang, W., Frantzell, A., Fransen, S., and Petropoulos, C. J. (2013) Multiple genetic pathways involving amino acid position 143 of HIV-1 integrase are preferentially associated with specific secondary amino acid substitutions and confer resistance to raltegravir and cross-resistance to elvitegravir. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 4105-4113
125. Brumme, Z. L., Goodrich, J., Mayer, H. B., Brumme, C. J., Henrick, B. M., Wynhoven, B., Asselin, J. J., Cheung, P. K., Hogg, R. S., Montaner, J. S., and Harrigan, P. R. (2005) Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. *J Infect Dis* **192**, 466-474
126. Gulick, R. M., Lalezari, J., Goodrich, J., Clumeck, N., DeJesus, E., Horban, A., Nadler, J., Clotet, B., Karlsson, A., Wohlfeiler, M., Montana, J. B., McHale, M., Sullivan, J., Ridgway, C., Felstead, S., Dunne, M. W., van der Ryst, E., Mayer, H., and Teams, M. S. (2008) Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* **359**, 1429-1441
127. Frentz, D., Boucher, C. A., and van de Vijver, D. A. (2012) Temporal changes in the epidemiology of transmission of drug-resistant HIV-1 across the world. *AIDS Rev* **14**, 17-27
128. Rhee, S. Y., Blanco, J. L., Jordan, M. R., Taylor, J., Lemey, P., Varghese, V., Hamers, R. L., Bertagnolio, S., Rinke de Wit, T. F., Aghokeng, A. F., Albert, J., Avi, R., Avila-Rios, S., Bessong, P. O., Brooks, J. I., Boucher, C. A., Brumme, Z. L., Busch, M. P., Bussmann, H., Chaix, M. L., Chin, B. S., D'Aquin, T. T., De Gascun, C. F., Derache, A., Descamps, D., Deshpande, A. K., Djoko, C. F., Eshleman, S. H., Fleury, H., Frange, P., Fujisaki, S., Harrigan, P. R., Hattori, J., Holguin, A., Hunt, G. M., Ichimura, H., Kaleebu, P., Katzenstein, D., Kiertiburanakul, S., Kim, J. H., Kim, S. S., Li, Y., Lutsar, I., Morris, L., Ndembu, N., Ng, K. P., Paranjape, R. S., Peeters, M., Poljak, M., Price, M. A., Ragonnet-Cronin, M. L., Reyes-Teran, G., Rolland, M., Sirivichayakul, S., Smith, D. M., Soares, M. A., Soriano, V. V., Ssemwanga, D., Stanojevic, M., Stefani, M. A., Sugiura, W., Sungkanuparph, S., Tanuri, A., Tee, K. K., Truong, H. M., van de Vijver, D. A., Vidal, N., Yang, C., Yang, R., Yebra, G., Ioannidis, J. P., Vandamme, A. M., and Shafer, R. W. (2015) Geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an individual-patient- and sequence-level meta-analysis. *PLoS Med* **12**, e1001810

129. Li, J. F., Linley, L., Kline, R., Ziebell, R., Heneine, W., and Johnson, J. A. (2016) Sensitive sentinel mutation screening reveals differential underestimation of transmitted HIV drug resistance among demographic groups. *AIDS* **30**, 1439-1445
130. Siliciano, R. F., and Greene, W. C. (2011) HIV latency. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a007096
131. Koppensteiner, H., Brack-Werner, R., and Schindler, M. (2012) Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology* **9**, 82
132. Posch, W., Lass-Flörl, C., and Wilflingseder, D. (2013) *Role of Dendritic Cell Subsets On HIV-Specific Immunity*, Current Perspectives in HIV Infection
133. Brack-Werner, R. (1999) Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *AIDS* **13**, 1-22
134. Schneider, M., Tigges, B., Meggendorfer, M., Helfer, M., Ziegenhain, C., and Brack-Werner, R. (2015) A new model for post-integration latency in macroglial cells to study HIV-1 reservoirs of the brain. *AIDS* **29**, 1147-1159
135. Eisele, E., and Siliciano, R. F. (2012) Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity* **37**, 377-388
136. Gallo, R. C. (2016) Shock and kill with caution. *Science* **354**, 177-178
137. Kunze, C., Herrmann, A., Bauer, A., and Brack-Werner, R. (2018) HIV-Reservoirs außerhalb des T-Zell-Pools - Gibt es Strategien gegen die latente Infektion? in *MMW Fortschritte der Medizin*, Springer Medizin, München
138. Khalili, K., Kaminski, R., Gordon, J., Cosentino, L., and Hu, W. (2015) Genome editing strategies: potential tools for eradicating HIV-1/AIDS. *J Neurovirol* **21**, 310-321
139. News, G. (2018) Scientist who claims to have made gene-edited babies speaks in Hong Kong. <https://www.youtube.com/watch?v=0jILo9y71s0>
140. Ledford, H. (2019) CRISPR babies: when will the world be ready? *Nature* **570**, 293-296
141. Stern, L. C., and Ebers, G. (1875) Papyrus Ebers: Das hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift, herausgegeben mit Inhaltsangabe und Einleitung versehen von Georg Ebers, mit hieroglyphisch-lateinischem Glossar von Ludwig Stern, mit Unterstützung des Königlich Sächsischen Cultusministeriums. W. Englemann, Leipzig
142. Swinney, D. C., and Anthony, J. (2011) How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov* **10**, 507-519
143. Swinney, D. C. (2013) Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clin Pharmacol Ther* **93**, 299-301
144. Kremb, S., Helfer, M., Heller, W., Hoffmann, D., Wolff, H., Kleinschmidt, A., Cepok, S., Hemmer, B., Durner, J., and Brack-Werner, R. (2010) EASY-HIT: HIV full-replication technology for broad discovery of multiple classes of HIV inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 5257-5268
145. Swinney, D. C. (2013) The contribution of mechanistic understanding to phenotypic screening for first-in-class medicines. *J Biomol Screen* **18**, 1186-1192

146. IUPAC. (2004) Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the „Gold Book“). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997)
147. Krasavin, M., Lukin, A., Zhurilo, N., Kovalenko, A., Zahanich, I., Zozulya, S., Moore, D., and Tikhonova, I. G. (2016) Novel free fatty acid receptor 1 (GPR40) agonists based on 1,3,4-thiadiazole-2-carboxamide scaffold. *Bioorg Med Chem* **24**, 2954-2963
148. Roberts, R. A., Kavanagh, S. L., Mellor, H. R., Pollard, C. E., Robinson, S., and Platz, S. J. (2014) Reducing attrition in drug development: smart loading preclinical safety assessment. *Drug Discov Today* **19**, 341-347
149. Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016) Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* **79**, 629-661
150. Cragg, G. M., Newman, D. J., and Snader, K. M. (1997) Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* **60**, 52-60
151. Newman, D. J., Cragg, G. M., and Snader, K. M. (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* **66**, 1022-1037
152. Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **70**, 461-477
153. Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **75**, 311-335
154. Reayi, A., and Arya, P. (2005) Natural product-like chemical space: search for chemical dissectors of macromolecular interactions. *Curr Opin Chem Biol* **9**, 240-247
155. Dandapani, S., and Marcaurelle, L. A. (2010) Current strategies for diversity-oriented synthesis. *Curr Opin Chem Biol* **14**, 362-370
156. Ehrhardt, C., Hrinčius, E. R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., Dreschers, S., Schmolke, M., Planz, O., and Ludwig, S. (2007) A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res* **76**, 38-47
157. Helfer, M., Koppensteiner, H., Schneider, M., Rebensburg, S., Forcisi, S., Muller, C., Schmitt-Kopplin, P., Schindler, M., and Brack-Werner, R. (2014) The root extract of the medicinal plant *Pelargonium sidoides* is a potent HIV-1 attachment inhibitor. *PLoS One* **9**, e87487
158. Rebensburg, S., Helfer, M., Schneider, M., Koppensteiner, H., Eberle, J., Schindler, M., Gurtler, L., and Brack-Werner, R. (2016) Potent in vitro antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. *Sci Rep* **6**, 20394
159. K, M. (1953) Chemical studies on antibiotal substances, IV. A crystalline toxic substance of *Streptomyces thioluteus*. *J Antibiot (Tokyo)* **6**, 137-138
160. Hirata, Y., Nakata, H., K., Y., K., O., and T., N. (1961) The structure of Aureothin, a nitro compound obtained from *Streptomyces thioluteus*. *Tetrahedron* **14**, 252-274
161. Kakinuma, K., Hanson, C. A., and Rinehart Jr., K. L. (1976) Spectinabilin, a new nitro-containing metabolite isolated from *Streptomyces spectabilis*. *Tetrahedron* **32**, 217-222

162. Muller, M., Kusebauch, B., Liang, G., Beaudry, C. M., Trauner, D., and Hertweck, C. (2006) Photochemical origin of the immunosuppressive SNF4435C/D and formation of orinocin through "polyene splicing". *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 7835-7838
163. Hall, L. H., Maynard, E. L., and Kier, L. B. (1989) Structure-activity relationship studies on the toxicity of benzene derivatives: III. Predictions and extension to new substituents. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**, 431-436
164. Jacobsen, M. F., Moses, J. E., Adlington, R. M., and Baldwin, J. E. (2005) A short total synthesis of aureothin and N-acetylaureothamine. *Org Lett* **7**, 641-644
165. Liang, G., Seiple, I. B., and Trauner, D. (2005) Stereoselective syntheses of the bioactive polypropionates aureothin, N-acetylaureothamine, and aureonitrile. *Org Lett* **7**, 2837-2839
166. Henrot, M., Jean, A., Peixoto, P. A., Maddaluno, J., and De Paolis, M. (2016) Flexible Total Synthesis of (+/-)-Aureothin, a Potent Antiproliferative Agent. *J Org Chem* **81**, 5190-5201
167. Werneburg, M., and Hertweck, C. (2008) Chemoenzymatic total synthesis of the antiproliferative polyketide (+)-(R)-aureothin. *ChemBiochem* **9**, 2064-2066
168. Werneburg, M., Busch, B., He, J., Richter, M. E., Xiang, L., Moore, B. S., Roth, M., Dahse, H. M., and Hertweck, C. (2010) Exploiting enzymatic promiscuity to engineer a focused library of highly selective antifungal and antiproliferative aureothin analogues. *J Am Chem Soc* **132**, 10407-10413
169. Jacobsen, M. F., Moses, J. E., Adlington, R. M., and Baldwin, J. E. (2006) The biomimetic synthesis of SNF4435C SNF4435D, and the total synthesis of the polyene metabolites aureothin, N-acetyl-aureothamine and spectinabilin. *Tetrahedron* **62**, 1675-1689
170. Wachinger, M., Kleinschmidt, A., Winder, D., von Pechmann, N., Ludvigsen, A., Neumann, M., Holle, R., Salmons, B., Erfle, V., and Brack-Werner, R. (1998) Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J Gen Virol* **79 (Pt 4)**, 731-740
171. Wolff, H., Brack-Werner, R., Neumann, M., Werner, T., and Schneider, R. (2003) Integrated functional and bioinformatics approach for the identification and experimental verification of RNA signals: application to HIV-1 INS. *Nucleic Acids Res* **31**, 2839-2851
172. Sena-Esteves, M., Saeki, Y., Camp, S. M., Chiocca, E. A., and Breakefield, X. O. (1999) Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons. *J Virol* **73**, 10426-10439
173. Popovic, M., Read-Connole, E., and Gallo, R. C. (1984) T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III. *Lancet* **2**, 1472-1473
174. Mann, D. L., O'Brien, S. J., Gilbert, D. A., Reid, Y., Popovic, M., Read-Connole, E., Gallo, R. C., and Gazdar, A. F. (1989) Origin of the HIV-susceptible human CD4+ cell line H9. *AIDS Res Hum Retroviruses* **5**, 253-255
175. Peden, K., Emerman, M., and Montagnier, L. (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**, 661-672

176. Freed, E. O., Englund, G., and Martin, M. A. (1995) Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J Virol* **69**, 3949-3954
177. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
178. Balachandran, A., and Cochrane, A. (2017) Screening for small molecule inhibitors of HIV-1 Gag expression. *Methods* **126**, 201-208
179. Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., and Nitsche, A. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 856-862
180. Brussel, A., and Sonigo, P. (2003) Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J Virol* **77**, 10119-10124
181. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., and Minor, L. (2004) Cell Viability Assays. in *Assay Guidance Manual* (Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Bejcek, B., Caaveiro, J. M. M., Chung, T. D. Y., Dahlin, J. L., Devanaryan, V., Foley, T. L., Glicksman, M., Hall, M. D., Haas, J. V., Inglese, J., Iversen, P. W., Kahl, S. D., Kales, S. C., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Trask, O. J., Jr., Weidner, J. R., Wildey, M. J., Xia, M., and Xu, X. eds.), Bethesda (MD). pp
182. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**, 5421-5426
183. Gould, S. J., and Subramani, S. (1988) Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem* **175**, 5-13
184. Reed, L. J. M. (1938) A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *The American Journal of Hygiene* **27**, 493-497
185. Chou, T. C., and Martin, N. (2005) CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values. ComboSyn Inc., Paramus (NJ)
186. Chou, T. C., and Talalay, P. (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**, 27-55
187. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408
188. Reinhard, T. (2010) Molekularbiologische Methoden, UTB GmbH
189. Wisniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* **6**, 359-362
190. Grosche, A., Hauser, A., Lepper, M. F., Mayo, R., von Toerne, C., Merl-Pham, J., and Hauck, S. M. (2016) The Proteome of Native Adult Muller Glial Cells From Murine Retina. *Mol Cell Proteomics* **15**, 462-480
191. Lepper, M. F., Ohmayer, U., von Toerne, C., Maison, N., Ziegler, A. G., and Hauck, S. M. (2018) Proteomic Landscape of Patient-Derived CD4+ T Cells in Recent-Onset Type 1 Diabetes. *J Proteome Res* **17**, 618-634

192. Brosch, M., Yu, L., Hubbard, T., and Choudhary, J. (2009) Accurate and sensitive peptide identification with Mascot Percolator. *J Proteome Res* **8**, 3176-3181
193. Vollhardt, K. P. C., and Schore, N. E. (2011) *Organische Chemie*, WILEY-VCH, Weinheim
194. Krasavin, M., Lukin, A., Zhurilo, N., Kovalenko, A., Zahanich, I., and Zozulya, S. (2016) Novel agonists of free fatty acid receptor 1 (GPR40) based on 3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)propanoic acid scaffold. *J Enzyme Inhib Med Chem* **31**, 1404-1410
195. Hazen, R. J., Harvey, R. J., St Clair, M. H., Ferris, R. G., Freeman, G. A., Tidwell, J. H., Schaller, L. T., Cowan, J. R., Short, S. A., Romines, K. R., Chan, J. H., and Boone, L. R. (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. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4465-4473
196. Hare, S., Smith, S. J., Metifiot, M., Jaxa-Chamiec, A., Pommier, Y., Hughes, S. H., and Cherepanov, P. (2011) Structural and functional analyses of the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir (S/GSK1349572). *Mol Pharmacol* **80**, 565-572
197. Nakata, H., Amano, M., Koh, Y., Kodama, E., Yang, G., Bailey, C. M., Kohgo, S., Hayakawa, H., Matsuoka, M., Anderson, K. S., Cheng, Y. C., and Mitsuya, H. (2007) Activity against human immunodeficiency virus type 1, intracellular metabolism, and effects on human DNA polymerases of 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2701-2708
198. Chao, S. H., Fujinaga, K., Marion, J. E., Taube, R., Sausville, E. A., Senderowicz, A. M., Peterlin, B. M., and Price, D. H. (2000) Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J Biol Chem* **275**, 28345-28348
199. Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., and Landau, N. R. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666
200. Witvrouw, M., Pannecouque, C., Van Laethem, K., Desmyter, J., De Clercq, E., and Vandamme, A. M. (1999) Activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV-2 and SIV. *AIDS* **13**, 1477-1483
201. Borrego, P., Calado, R., Marcelino, J. M., Bartolo, I., Rocha, C., Cavaco-Silva, P., Doroana, M., Antunes, F., Maltez, F., Caixas, U., Barroso, H., and Taveira, N. (2012) Baseline susceptibility of primary HIV-2 to entry inhibitors. *Antivir Ther* **17**, 565-570
202. Chou, T. C. (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* **58**, 621-681
203. Feng, J. Y., Ly, J. K., Myrick, F., Goodman, D., White, K. L., Svarovskaia, E. S., Borroto-Esoda, K., and Miller, M. D. (2009) The triple combination of tenofovir, emtricitabine and efavirenz shows synergistic anti-HIV-1 activity in vitro: a mechanism of action study. *Retrovirology* **6**, 44
204. Taniguchi, M., Watanabe, M., Nagai, K., Suzumura, K., Suzuki, K., and Tanaka, A. (2000) Gamma-pyrone compounds with selective and potent anti-Helicobacter pylori activity. *J Antibiot (Tokyo)* **53**, 844-847
205. Friedrich, T., van Heek, P., Leif, H., Ohnishi, T., Forche, E., Kunze, B., Jansen, R., Trowitzsch-Kienast, W., Hofle, G., Reichenbach, H., and et al. (1994) Two binding sites of inhibitors in NADH: ubiquinone

- oxidoreductase (complex I). Relationship of one site with the ubiquinone-binding site of bacterial glucose:ubiquinone oxidoreductase. *Eur J Biochem* **219**, 691-698
206. Otoguro, K., Ishiyama, A., Namatame, M., Nishihara, A., Furusawa, T., Masuma, R., Shiomi, K., Takahashi, Y., Yamada, H., and Omura, S. (2008) Selective and potent in vitro antitrypanosomal activities of ten microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* **61**, 372-378
207. Jansen, R., Kunze, B., Wray, V., Reichenbach, H., Jurkiewicz, E., Hunsmann, G., and Höfle, G. (1991) Antibiotics from gliding bacteria, XLIII. Phenoxan: A novel inhibitor of HIV-1 infection in cell cultures from *Polyangium* sp., strain PI VO19 (Myxobacteria). *Liebigs Annalen der Chemie* **1991**, 707-708
208. Bach, G., Zeeck, A., Hunsmann, G., and Jurkiewicz, E. (1993) Antivirale Substanzen und diese enthaltende Arzneimittel. in *Deutsches Patentamt* (Göttingen, D. P. G. ed., Deutschland
209. Zhou, Y., Wang, J., Gu, Z., Wang, S., Zhu, W., Acena, J. L., Soloshonok, V. A., Izawa, K., and Liu, H. (2016) Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II-III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas. *Chem Rev* **116**, 422-518
210. Carbone, M., Ciavatta, M. L., Wang, J. R., Cirillo, I., Mathieu, V., Kiss, R., Mollo, E., Guo, Y. W., and Gavagnin, M. (2013) Extending the record of bis-gamma-pyrone polypropionates from marine pulmonate mollusks. *J Nat Prod* **76**, 2065-2073
211. Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., and Wendoloski, J. J. (1999) A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem* **1**, 55-68
212. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 3-26
213. Oishi, H., Hosokawa, T., Okutomi, T., Suzuki, K., and Ando, K. (1969) Pesticidal Activity of Aureothin. *Agricultural and Biological Chemistry* **33:12**, 1790-1791
214. Ali, A., Ghosh, A., Nathans, R. S., Sharova, N., O'Brien, S., Cao, H., Stevenson, M., and Rana, T. M. (2009) Identification of flavopiridol analogues that selectively inhibit positive transcription elongation factor (P-TEFb) and block HIV-1 replication. *Chembiochem* **10**, 2072-2080
215. Tabarrini, O., Desantis, J., and Massari, S. (2016) Recent advances in the identification of Tat-mediated transactivation inhibitors: progressing toward a functional cure of HIV. *Future Med Chem* **8**, 421-442
216. Kadia, T. M., Kantarjian, H. M., and Konopleva, M. (2019) Myeloid cell leukemia-1 dependence in acute myeloid leukemia: a novel approach to patient therapy. *Oncotarget* **10**, 1250-1265
217. Liu, X., Shi, S., Lam, F., Pepper, C., Fischer, P. M., and Wang, S. (2012) CDKI-71, a novel CDK9 inhibitor, is preferentially cytotoxic to cancer cells compared to flavopiridol. *Int J Cancer* **130**, 1216-1226
218. Zhou, B. B., and Elledge, S. J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439
219. Daniel, R., Kao, G., Taganov, K., Greger, J. G., Favorova, O., Merkel, G., Yen, T. J., Katz, R. A., and Skalka, A. M. (2003) Evidence that the retroviral DNA integration process triggers an ATR-dependent DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4778-4783

220. Nunnari, G., Argyris, E., Fang, J., Mehlman, K. E., Pomerantz, R. J., and Daniel, R. (2005) Inhibition of HIV-1 replication by caffeine and caffeine-related methylxanthines. *Virology* **335**, 177-184
221. Malim, M. H., and Cullen, B. R. (1991) HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**, 241-248
222. Li, L., Dahiya, S., Kortagere, S., Aiamkitsumrit, B., Cunningham, D., Pirrone, V., Nonnemacher, M. R., and Wigdahl, B. (2012) Impact of Tat Genetic Variation on HIV-1 Disease. *Adv Virol* **2012**, 123605
223. Hamy, F., Brondani, V., Florsheimer, A., Stark, W., Blommers, M. J., and Klimkait, T. (1998) A new class of HIV-1 Tat antagonist acting through Tat-TAR inhibition. *Biochemistry* **37**, 5086-5095
224. Rusnati, M., Tulipano, G., Spillmann, D., Tanghetti, E., Oreste, P., Zoppetti, G., Giacca, M., and Presta, M. (1999) Multiple interactions of HIV-I Tat protein with size-defined heparin oligosaccharides. *J Biol Chem* **274**, 28198-28205
225. Pirrone, V., Wigdahl, B., and Krebs, F. C. (2011) The rise and fall of polyanionic inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res* **90**, 168-182
226. Bakkour, N., Lin, Y. L., Maire, S., Ayadi, L., Mahuteau-Betzer, F., Nguyen, C. H., Mettling, C., Portales, P., Grierson, D., Chabot, B., Jeanteur, P., Branlant, C., Corbeau, P., and Tazi, J. (2007) Small-molecule inhibition of HIV pre-mRNA splicing as a novel antiretroviral therapy to overcome drug resistance. *PLoS Pathog* **3**, 1530-1539
227. Balachandran, A., Wong, R., Stoilov, P., Pan, S., Blencowe, B., Cheung, P., Harrigan, P. R., and Cochrane, A. (2017) Identification of small molecule modulators of HIV-1 Tat and Rev protein accumulation. *Retrovirology* **14**, 7
228. Wong, R. W., Balachandran, A., Ostrowski, M. A., and Cochrane, A. (2013) Digoxin suppresses HIV-1 replication by altering viral RNA processing. *PLoS Pathog* **9**, e1003241
229. Wong, R. W., Balachandran, A., Haaland, M., Stoilov, P., and Cochrane, A. (2013) Characterization of novel inhibitors of HIV-1 replication that function via alteration of viral RNA processing and rev function. *Nucleic Acids Res* **41**, 9471-9483
230. Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Verhoef, K., Marzio, G., Das, A. T., and Berkhout, B. (2006) The genetic stability of a conditional live HIV-1 variant can be improved by mutations in the Tet-On regulatory system that restrain evolution. *J Biol Chem* **281**, 17084-17091
231. Mahiet, C., and Swanson, C. M. (2016) Control of HIV-1 gene expression by SR proteins. *Biochem Soc Trans* **44**, 1417-1425
232. Zhong, X. Y., Wang, P., Han, J., Rosenfeld, M. G., and Fu, X. D. (2009) SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Mol Cell* **35**, 1-10
233. Paz, S., and Caputi, M. (2015) SRSF1 inhibition of HIV-1 gene expression. *Oncotarget* **6**, 19362-19363
234. Paz, S., Krainer, A. R., and Caputi, M. (2014) HIV-1 transcription is regulated by splicing factor SRSF1. *Nucleic Acids Res* **42**, 13812-13823
235. Kim, A. E., Dintaman, J. M., Waddell, D. S., and Silverman, J. A. (1998) Saquinavir, an HIV protease inhibitor, is transported by P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 1439-1445

-
236. Wright, M. H., and Sieber, S. A. (2016) Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products. *Nat Prod Rep* **33**, 681-708
237. Dubois, J., Terrier, O., and Rosa-Calatrava, M. (2014) Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less. *MBio* **5**, e00070-00014
238. Biasiotto, R., and Akusjarvi, G. (2015) Regulation of human adenovirus alternative RNA splicing by the adenoviral L4-33K and L4-22K proteins. *Int J Mol Sci* **16**, 2893-2912
239. Duriez, M., Mandouri, Y., Lekbaby, B., Wang, H., Schnuriger, A., Redelsperger, F., Guerrero, C. I., Lefevre, M., Fauveau, V., Ahodantin, J., Quetier, I., Chhuon, C., Gourari, S., Boissonnas, A., Gill, U., Kennedy, P., Debzi, N., Sitterlin, D., Maini, M. K., Kremsdorf, D., and Soussan, P. (2017) Alternative splicing of hepatitis B virus: A novel virus/host interaction altering liver immunity. *J Hepatol* **67**, 687-699
240. Huang, Y., and Carmichael, G. G. (2009) RNA processing in the polyoma virus life cycle. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**, 4968-4977
241. Journo, C., Douceron, E., and Mahieux, R. (2009) HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol* **4**, 425-440
242. Klymenko, T., and Graham, S. V. (2012) Human papillomavirus gene expression is controlled by host cell splicing factors. *Biochem Soc Trans* **40**, 773-777
243. Krug, L. T. (2013) Complexities of gammaherpesvirus transcription revealed by microarrays and RNAseq. *Curr Opin Virol* **3**, 276-284

9. Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir auf meinem gesamten Weg unterstützend zur Seite standen, mit mir gefeiert haben, wenn ich erfolgreich ein paar Schritte nach vorne gegangen bin, mich aber auch aufgefangen haben, wenn es mal nicht so gut lief.

Ich möchte mich auch ganz besonders bei Martin bedanken, für all die Unterstützung, die spannenden wissenschaftlichen Diskussion zum Projekt und darüber hinaus und natürlich für seinen Rückhalt und seine Ausdauer, mich bei Rückschlägen wieder aufzubauen und mir Kraft zu geben.

Ich möchte mich auch besonders bei Ruth bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat in ihrer Arbeitsgruppe an diesem wunderbaren und spannenden Projekt zu arbeiten, dass sie mir alle Freiräume gegeben hat mich als angehender Wissenschaftler in diesem Projekt selbst zu entfalten, mit ihrer Unterstützung, ihren Ratschlägen und natürlich mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung trotzdem immer dafür gesorgt hat, dass ich dabei den roten Faden nicht verliere und immer weiter erfolgreich nach vorne gehen kann.

Ein ganz großes Dankeschön geht auch an Johanna, die mich bei all der Pipettierarbeit im Labor unterstützt hat und ohne deren Unterstützung so manches nicht so glatt gelaufen wäre. Ein riesiges Dankeschön für die Diskussionsfreudige Zusammenarbeit und all die tollen und witzigen Momente im Labor geht natürlich auch an Christine, Johanna und Amelie, sowie meine Masterantin Alisha, die mit viel Engagement und Enthusiasmus an diesem Projekt mitgearbeitet hat.

Dankeschön auch an Markus und Martha, die den Grundstein für dieses Projekt gelegt haben und Aureothin aus einer riesigen Naturstoffsammlung herausgepickt haben.

Ich möchte mich auch bei Sabrina, Samuel und Deniz, sowie Katrin, Joachim, Andreas und Karsten bedanken, dass sie mir ermöglicht haben über den Tellerrand von HIV hinauszublicken, um MAGIC auch gegen Adeno-, Masern-, Chikungunya-, Semliki Forest, Vesicular Stomatitis, Hepatitis B und Influenza A Viren zu testen. Zudem möchte ich mich bei Peter für all seine Hilfe und allen anderen Kollegen und Kolleginnen am Institut für Virologie für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein Dank geht auch an die Mitglieder meines Thesis-Committees Bettina Kempkes und Manfred Rösner, für all die angenehmen Diskussionen, Anregungen und Kritik zum Projekt. Ganz besonders möchte ich hierbei Manfred hervorheben, der bei Fragen immer ein offenes Ohr hatte und vor allem bei Diskussionen zur Chemie immer helfend zur Seite stand.

Ich möchte mich bei Thomas Werner und Stefanie Hauck für die Zusammenarbeit und ihre Unterstützung bei den Proteomicsarbeiten bedanken.

Ein Dank geht auch an Oliver Plettenberg und Wiebke Hutwelker für das Synthetisieren und Bereitstellen einiger MAGIC-Derivate, sowie an Lutz Gürtler und Josef Eberle für das Zurverfügungstellen der HIV Patientenisolate und den positiven Diskurs.

Ich möchte mich auch bei Sandra Lösgen, Sabrina Schreiner, Tobias Gulder und Theo Rein für die erfolgreichen und ertragreichen Kollaborationsarbeiten bedanken.

Ein großer Dank geht zudem an Alan Cochrane, für die interessanten und spannenden Diskussionen zum Projekt und der Möglichkeit, Erfahrung in seinem Labor in Toronto sammeln zu können.

~ DANKE ~

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexander Frank Herrmann
Geburtsdatum/-ort	12.03.1991 in Landau/Pfalz
Adresse	Hofäckerallee 27, 85774 Unterföhring
Telefon	0163-1648381
Email	h-alex91@web.de
Nationalität	Deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

2016-2019	Promotion am Institut für Virologie, Helmholtz Zentrum München mit dem Titel „Charakterisierung der anti-HIV Wirkung der neuen auf dem Naturstoff Aureothin basierenden Substanzklasse MAGIC“.
2013-2015	Masterstudium im Fachbereich Biochemie an der Technischen Universität München. Masterarbeit am Institut für Virologie mit dem Titel „Analysis of the influence of polyphenols on Paramyxo- and Flavivirus infections“
2010-2013	Bachelorstudium im Fachbereich Biochemie an der Technischen Universität München. Bachelorarbeit am Institut für Virologie mit dem Titel „Interferon- α treatment of hepatitis C virus infected Huh7.5diff cells leads to an inversion of hepatitis C induced dedifferentiation“
2001-2010	Besuch des PAMINA Gymnasium Herxheim mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

11. Veröffentlichungen

11.1 Paper

Herrmann, A., Roesner, M., Werner, T., Hauck, S. H., Koch, A., Bauer, A., Schneider, M., Brack-Werner, R. (2019). „Potent inhibition of HIV replication in primary human cells by novel synthetic polyketides inspired by Aureothin“ in Revision bei *Scientific Reports*.

Hofmann, S., Mai, J., Masser, S., Groitl, P., **Herrmann, A.**, Sternsdorf, T., Brack-Werner, R., Schreiner, S. (2019). „ATO (Arsenic Trioxide) effects on PML nuclear bodies reveals antiviral intervention capacity“, in *Advanced Science*.

Qian, Z., Bruhn, T., D' Agostino, P. M., **Herrmann, A.**, Haslbeck, M., Fiedler, H.-P., Brack-Werner, R., Gulder T. A. M. (2019). „Discovery of the Streptoketides by Direct Cloning and Rapid Heterologous Expression of a Cryptic PKS II Gene Cluster from *Streptomyces* sp. Tü6314“ in *The Journal of Organic Chemistry*.

Sib, A., Milzarek, T. M., **Herrmann, A.**, Oubraham, L., Müller, J. I., Pichlmair, A., Brack-Werner, R., Gulder T. A. M. (2019). „Chemo-Enzymatic Total Synthesis of Sorbicatechol Structural Analogs and Evaluation of Their Anti-Viral Potential“ in *ChemBioChem*.

Gassen, N. C., Niemeyer, D., Muth, D., Corman, V. M., Martinelli, S., Gassen, A., Hafner, K., Papies, J., Mösbauer, K., Zellner, A., Zannas, A. S., **Herrmann, A.**, Holsboer, F., Brack-Werner, R., Boshart, M., Müller-Myhsok, B., Drosten, C., Müller, M. A., Rein, T. (2019). „SKP2 attenuates autophagy through Beclin1-ubiquitination and its inhibitors combat MERS-Coronavirus infection“ in *Nature Communications*.

Overacker, R. D., Banerjee, S., Neuhaus, G. F., Milicevic Sephton, S., **Herrmann, A.**, Strother, J. A., Brack-Werner, R., Blakemore, P. R., Loesgen, S. (2019). „Biological Evaluation of Molecules of the azaBINOL Class as Antiviral Agents: Inhibition of HIV-1 RNase H Activity by 7-Isopropoxy-8-(naphth-1-yl)quinoline“ in *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.

Kunze, C., **Herrmann, A.**, Bauer, A., Brack-Werner, R. (2018). „HIV-Reservoirs außerhalb des T-Zell-Pools - Gibt es Strategien gegen die latente Infektion?“ in *MMW Fortschritte der Medizin*.

11.2 Vorträge auf Konferenzen

4/2016 4. Interdisziplinäres Doktorandenseminar des Deutschen Arbeitskreises für Analytische Spektroskopie (DAAS). Titel: „Identification of natural compounds as new antiviral products by bioassay-guided fractionation“

11.3 Posterpräsentationen auf Konferenzen

4/2018 HDDC 2018 International Helmholtz Drug Discovery Conference. Titel: „HIV inhibitors - γ -pyrone derivatives with unique mode of action“

4/2016 Frontiers of Retrovirology. Titel: „Identification of natural compounds as new antiviral products by bioassay-guided fractionation“

12. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 29.08.2019

Alexander Frank Herrmann

(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

Dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.

München, den 29.08.2019

Alexander Frank Herrmann

(Unterschrift)