

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie (Lehrstuhl Virologie)

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. U. Koszinowski

***In-vitro* Testung neuer HIV-Replikationsinhibitoren
im Vergleich mit etablierten Substanzen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christine Huber

aus

München

Jahr

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Eberle

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. F.-D. Goebel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: _____

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2007

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. med. Josef Eberle für die Möglichkeit bedanken, diese experimentelle Doktorarbeit im HIV-Forschungsbereich machen zu können, ferner für seine Unterstützung und Geduld während der gesamten Dauer dieser Arbeit. Auch danke ich Dr. med. Martin Obermeier, Dr. rer. nat. Susanne Hillebrand und Frau Hiroko Matsuba für ihre Hilfe und Unterstützung.

Großer Dank gilt vor allem meinen Eltern, Dr. med. Hans und Tina Huber, für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums und dieser Arbeit.

In Gedenken an Klaus (gestorben 1991).

Inhaltsübersicht

Danksagung	I
Inhaltsübersicht	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	16
3 Versuchsaufbau und- ablauf	28
4 Ergebnisse	34
5 Diskussion	55
6 Zusammenfassung	62
Literatur- und Quellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XVI
Curriculum Vitae	XVIII

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsübersicht	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie der HIV-Infektion	1
1.2 Übertragungswege	2
1.3 Diagnostik	2
1.4 Herkunft und Heterogenität der Humanen Immundefizienzviren	3
1.5 Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion ohne Therapie	4
1.6 Viruslast und CD4-Zellzahl	4
1.7 Morphologie von HIV-1	4
1.8 Organisation des viralen Genoms	6
1.9 Replikationszyklus des HI-Virus	8
1.10 Reverse Transkriptase	9
1.11 Protease	11
1.12 Bisherige Angriffspunkte in der HIV-Therapie und neue Ansatzpunkte	12
1.12.1 NRTIs	12
1.12.2 NNRTIs	12
1.12.3 PIs	13
1.12.4 Neue Ansatzpunkte in der HIV-Therapie	13
1.13 Fragestellung und Zielsetzung	14
2 Material und Methoden	16
2.1 HUT 78- und V 79-Zellen	16
2.2 Viren	17
2.3 RT-Test (Reverse Transkriptase-Test, nicht radioaktiv) und Prinzip	17

2.4	Replikationsinhibitoren	18
2.4.1	Potentielle Protease-Inhibitoren	18
2.4.2	Potentielle Rev-Inhibitoren	19
2.4.3	Reverse Transkriptase-Inhibitoren	21
2.4.3.1.	RT-Inhibitor-Konzentrationen bei frisch infizierten HUT 78-Zellen	21
2.4.3.2	RT-Inhibitor-Konzentrationen bei chronisch infizierten HUT 78-Zellen.....	23
2.5	Statistische Auswertung	24
2.6	Toxizitätstest: Trypanblau Assay	24
2.7	Lyse-Puffer und Pipetten.....	27
3	Versuchsaufbau und- ablauf	28
3.1	Versuchsaufbau von Protease-, Rev- und RT-Inhibitoren bei chronisch infizierten HUT 78-Zellen	28
3.1.1	Versuchsablauf (Versuch I).....	30
3.2	Versuchsaufbau von RT-Inhibitoren bei frisch infizierten HUT 78-Zellen.....	31
3.2.1	Versuchsablauf (Versuch II)	32
3.3	RT-Messung von Versuch I und II (3.1.1 und 3.2.1).....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Neue Replikationsinhibitoren bei chronisch infizierten HUT 78-Zellen	34
4.1.1	Uvaol (Substanz #1, PI) bei HIV-1/M	34
4.1.2	Uvaol (Substanz #1, PI) bei HIV-1/O	36
4.1.3	Nandrolon (Substanz #3, PI) bei HIV-1/M	37
4.1.4	Nandrolon (Substanz #3, PI) bei HIV-1/O	38
4.1.5	Coumermycin (Substanz #4, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/M.....	39
4.1.6	Coumermycin (Substanz #4, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/O.....	40
4.1.7	Nr. 1445896 (Substanz #7, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/M.....	41
4.1.8	Nr. 1445896 (Substanz #7, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/O	42
4.2	RT-Inhibitoren bei chronisch infizierten HUT 78-Zellen	43
4.2.1	AZT bei HIV-1/M	43
4.2.2	AZT bei HIV-1/O	44
4.2.3	DDC bei HIV-1/M	45
4.2.4	DDC bei HIV-1/O	46
4.2.5	DDI bei HIV-1/M.....	47
4.2.6	DDI bei HIV-1/O	48

4.2.7	NVP bei HIV-1/M.....	49
4.2.8	NVP bei HIV-1/O.....	50
4.3	RT-Inhibitoren bei frisch infizierten HUT 78-Zellen	51
4.3.1	AZT bei HIV-1/M	51
4.3.2	DDI bei HIV-1/M.....	52
4.3.3	NVP bei HIV-1/M.....	53
5	Diskussion	55
5.1	Vergleich neuer Replikationsinhibitoren bei chronisch infizierten HUT 78-Zellen...	56
5.2	Vergleich RT-Inhibitoren bei chronisch infizierten HUT 78-Zellen	58
5.3	Vergleich RT-Inhibitoren bei frisch infizierten HUT 78-Zellen.....	60
6	Zusammenfassung.....	62
	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	VIII
	Abbildungsverzeichnis	XVI
	Curriculum Vitae.....	XVIII

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AZT	Azidothymidin
CA	Kapsid–Antigen
CCR5	C-C CHEMOKINE RECEPTOR 5
CDC	Centers for Disease Control
CD4-Zellzahl	T-Helfer Zellen
Cpd	cytotoxic point of dose
DDC	Dideoxycytidin
DDI	Dideoxyinosin
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
ELISA	Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay
env	envelope
gag	group-antigen
gp	Glycoprotein (z.B. gp41, gp120, gp160)
HAART	Hochaktive Antiretrovirale Therapie
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
HUT 78	cutaneous T-cell lymphoma-Zelllinie
IN	Integrase
INV	Invirase= Saquinavir
IDV	Indinavir= Crixivan
LC	Lethal Concentration
LP	Lyse-Puffer
LTR	long terminal repeat
MA	Matrixprotein
mRNA	messenger RNA
NC	Nukleoprotein
nef	negative factor (ein Abschnitt im Virus-Genom)

NNRTI	Nicht-Nukleosidartige Reverse Transkriptase Inhibitoren
NRTI	Nukleosidartige Reverse Transkriptase Inhibitoren
NtRTI	Nukleotidartige Reverse Transkriptase Inhibitoren
NVP	Nevirapin
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen
PI	Protesase Inhibitor
POD	Peroxidase
pol	Polymerase (ein Abschnitt im Virus-Genom)
PR	Protease
rev	regulator of expression of virion (ein Abschnitt im Virus-Genom)
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	Rev responsive element
RT	Reverse Transkriptase
RTV	Ritonavir
SIV	Simian Immundefizienz Virus
SU	surface
TDF	Tenofovir
TAR	tat acceptance region
Tat	transactivation of transcription; transactivator
Th1/2	T-Helfer Lymphozyten-Untergruppen
TM	Transmembranprotein
ÜS	Überstand (Virushaltiger Zellkulturüberstand)
vif	virion infectivity factor (ein Abschnitt im Virus-Genom)
VL	Viruslast
vpr	virus protein R (ein Abschnitt im Virus-Genom)
vpu	virus protein U (ein Abschnitt im Virus-Genom)
V 79	Lungenzellen aus der Lunge junger, chinesischer Hamster (<i>Cricetulus griseus</i>)

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der HIV-Infektion

Seit dem Beginn der AIDS-Epidemie sind mehr als zwei Jahrzehnte vergangen. 1981 wurden erstmals bei einer Gruppe homosexueller Männer schwere, opportunistische Infektionen beschrieben und für diese Krankheitsentität 1982 der Begriff AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) eingeführt. 1983 entdeckte die Arbeitsgruppe von Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris das ursächliche Virus, was 1984 von Robert Gallo am National Cancer Institute in Bethesda bestätigt wurde. Diese beiden Arbeitsgruppen isolierten aus den Lymphozyten von AIDS-Patienten Retroviren, die anfangs mit dem Namen LAV (lymphadenopathy-associated virus) beziehungsweise HTLV-III bezeichnet wurden. Es zeigte sich aber, dass das neue Virus nicht eng mit dem humanen T-Zell-Leukämie-Virus verwandt war (Barre-Sinoussi *et al.* 1983, Broder *et al.* 1984, Gallo *et al.* 1984). Die heute international gebräuchliche Bezeichnung HIV (human immunodeficiency virus) wurde ab 1986 verwendet. In den frühen 70er-Jahren war HIV-1 bereits in ganz Afrika (Getchell *et al.* 1987) verbreitet. In Nordamerika war es ab 1968, wenn auch mit sehr niedriger Prävalenz, zu finden (Robbins *et al.* 2003). Allerdings war die Zeitspanne zwischen Infektion und dem Auftreten von AIDS-definierenden Komplikationen länger als zunächst angenommen. Es handelte sich also um eine Virusinfektion mit jahrelanger Inkubationszeit, in der die Infektion weiter verbreitet werden konnte. Die Infektion hat sich weltweit seit Mitte der 80er-Jahre ausgebreitet (Abb.1.1).

Im Jahre 2004 lebten weltweit knapp 40 Millionen Menschen (Robert-Koch-Institut, Stand 2005) mit HIV. Der größte Anteil davon in Afrika. Die stärkste Zunahme der Ausbreitung lässt sich in den UdSSR-Nachfolgestaaten, Indien und China verzeichnen.

In Deutschland befanden sich nach Erhebung des Robert-Koch-Instituts (Stand Ende 2005) ca. 43000 Menschen mit einer HIV-Infektion, ca. 2000 Neuinfektionen pro Jahr werden geschätzt. 9% der Neuinfektionen erfolgten durch kontaminierte Injektionsnadeln bei i.v. Drogenabusus, 50% der Neuinfizierten sind Männer, die Sex mit Männern hatten, und 18% infizierten sich heterosexuell. Weniger als 1% betrug die vertikale Transmissionsrate des Virus (Mutter-Kind) aufgrund geeigneter Präventionsmaßnahmen.

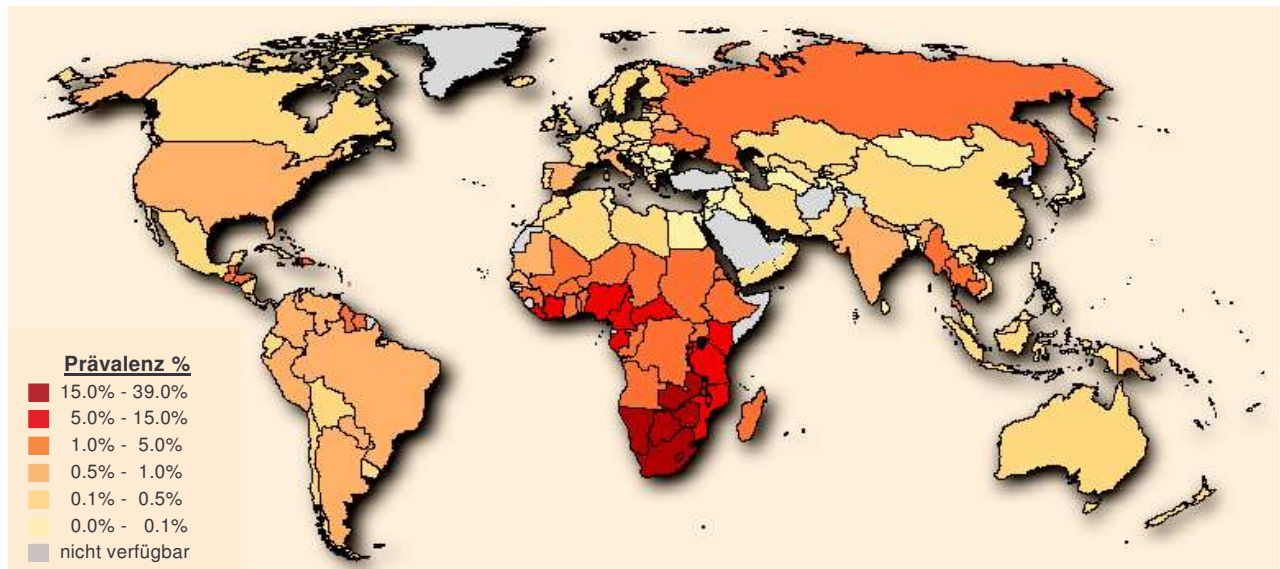


Abbildung 1.1: HIV-Prävalenz bei Erwachsenen.

Die Weltkarte zeigt die regionale Verteilung HIV-infizierter Erwachsener (UNAIDS 2003).

1.2 Übertragungswege

Beim Menschen erfolgt die Übertragung durch vaginal- oder Samenflüssigkeit bei ungeschütztem Sexualkontakt, durch gemeinsame Benutzung von Drogenbestecken und durch kontaminiertes Blut und Blutprodukte, solange keine geeignete Spenderauswahl und Spendertestung gewährleistet wird. Das Virus wird selten vor, häufiger bei der Geburt oder auch beim Stillen von infizierten Frauen auf deren Kinder übertragen.

1.3 Diagnostik

Für die Diagnostik der HIV-Infektion stehen mehrere Tests zur Verfügung. In der Regel dient ein ELISA (Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay) als Screeninguntersuchung, mit dem sich Antikörper gegen das HI-Virus nachweisen lassen. Diese sind bei den heute gebräuchlichen ELISAs der 3. und 4. Generation bereits nach ca. 4 bis 6 Wochen nachweisbar. Der erste ELISA-Test zum Nachweis von HIV-Antikörpern war 1985 erhältlich (CDC 1985a). Diese Suchteste erfassen Antikörper, die gegen alle HIV-1 und HIV-2 gebildet werden, mit Präferenz auf der konstanten Region von gp120 und dem N-terminalen Abschnitt von gp41. Herstellerspezifisch finden zusätzlich Antigene aus der Reversen Transkriptase und

dem p24-Protein Verwendung (Gürtler *et al.* 1998, Janssen *et al.* 1998). Fällt ein solcher ELISA reaktiv aus, wird der Test zunächst wiederholt. Falls das Ergebnis wieder reaktiv ist, wird ein Bestätigungstest, ein sogenannter Western-Blot (Immuno-Blot), angeschlossen. Hierbei müssen für HIV-1 neben 2 der Glykoproteinbanden (gp160, gp120 und gp41) auch eine Bande aus dem gag- oder pol-Bereich vorhanden sein. Zur Bestätigung einer HIV-2-Infektion müssen zwei der Glykoproteinbanden gp130, gp105 und gp36 vorhanden sein. Ferner gibt es den quantitativen Nachweis von Virus RNA zur Therapieindikation und – Steuerung. Selten wird der qualitative Nachweis viraler Nukleinsäuren zur Diagnosesicherung aus DNA von PBMCs (z.B. bei Kinder von HIV-infizierten Müttern) benutzt. Die Teste der 4.Generation erlauben zusätzlich den Nachweis des viralen p24-Antigens und verkürzen somit das serologische Fenster zwischen Infektion und Nachweisbarkeit.

1.4 Herkunft und Heterogenität der Humanen Immundefizienzviren

Nach Isolierung wurden HIV-1 und -2, die beide der Lentivirus-Subfamilie zugeordnet waren, unterschieden. Die Viren haben ihren Ursprung in Afrika. Mittels retrospektiver, serologischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass schon vor 1980 dort Antikörper gegen HIV in der Bevölkerung sporadisch vorhanden waren.

HIV-1 entstand nach Überschreiten der Speziesbarriere durch zoonotische Übertragungen von SIV_{cpz} (Simian Immunodeficiency Virus-Chimpanzee) auf den Menschen. Es lassen sich drei HIV-1-Gruppen M (major), N (non-M, non-O) und O (outlier) unterscheiden. Weitere Diversifikationen führten dann zu einzelnen Subtypen (Gao *et al.* 1999, Hahn *et al.* 2000). Weltweit überwiegt Gruppe M mit den 9 Subtypen (A bis D, F bis H, J und K). In Nordamerika und Europa überwiegen Subtyp B, weltweit der Subtyp C. HIV-1 der Gruppe O scheinen in Kamerun und benachbarten Ländern in West- und Zentralafrika endemisch zu sein, sind aber mit einer Prävalenz von 2-5% der HIV positiven Proben auch dort eine Minderheit (Gürtler *et al.* 1996, Zekeng *et al.* 1994). Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die nächsten Verwandten zu den HIV-1-Viren der Gruppe O in Gorillas zu finden sind (Heuverswyn *et al.* 2006). HIV-2 und SIV_{sm} (Simian Immunodeficiency Virus-Sooty Mangabee) sind phylogenetisch eng verwandt. Als Primatenreservoir von HIV-2 wurden Halsbandmangaben (*Cerocebus atys*) identifiziert, die selbst nicht daran erkrankten (Gao *et al.* 1999). Hier wiederum sind sieben unterschiedliche Subtypen bekannt (Yamaguchi *et al.* 2002).

1.5 Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion ohne Therapie

Die Primärinfektion mit HIV verläuft häufig inapparent. Nur in ca. 20 bis 30 Prozent der Fälle geht sie mit grippe- oder mononucleoseähnlichen Symptomen und Lymphknotenschwellung einher. Es kommt zum vorübergehenden Absinken der CD4-positiven Lymphozyten auf unter 500 Zellen pro Mikroliter und zur Verschiebung des CD4/ CD8-Zellquotienten auf weniger als 0,5. Daran schließt sich ein lang dauerndes, symptomfreies Latenzstadium an. Zwar sind HIV-spezifische Antikörper nachweisbar, infektiöses Virus findet man im peripheren Blut jedoch nicht regelmäßig und in meist geringer Konzentration. Im späteren Krankheitsverlauf können Beschwerden oder Erkrankungen auftreten, die nach heute geltender Klassifikation der klinischen Kategorie B (CDC 1993b) zugeordnet sind. Sie sind zwar nicht AIDS-definierende Krankheiten, aber ursächlich auf die HIV-Infektion zurückzuführen. Später treten dann AIDS-definierende Erkrankungen auf (Kategorie C) - im Median 8 bis 10 Jahre nach Erst-Infektion. Diese führen nach individuell unterschiedlich langer Zeit zum Tod.

1.6 Viruslast und CD4-Zellzahl

Die zwei wichtigsten Laborparameter, die bei HIV-infizierten Personen regelmäßig zu kontrollieren sind, sind die sogenannte Viruslast (Anzahl der HIV-RNA-Kopien pro Milliliter Plasma) und die CD4-Zellzahl (T-Helfer-Zellzahl pro Mikroliter). Einige Monate nach Infektion kommt es zur Stabilisierung der CD4-Zellzahl. Die anfangs hohe Viruslast sinkt weitgehend auf ein stabiles Niveau ab, was auch als viraler Setpoint bezeichnet wird. Dieser ist allerdings individuell, meist liegt er zwischen 10.000 bis 50.000 Kopien/ml. Auch Setpoints unter 50 Kopien/ml kommen vor. Je höher die Viruslast bzw. der virale Setpoint ist, desto rascher fallen die CD4-Zellzahlen im Laufe der Jahre ab. Unter 200 CD4-Zellen/ μ l muss mit AIDS-definierenden Erkrankungen gerechnet werden.

1.7 Morphologie von HIV-1

HIV-1-Viruspartikel sind im Durchmesser ca. 145nm groß und von einer Lipoproteinhülle umgeben (Abb.1.2). Eingebettet in die Virushülle sind 72 Protrusionen (knobs), die aus Trimeren des gp120-Oberflächenproteins (SU= surface) bestehen. Diese sind nicht-kovalent über Trimere des gp41 (TM= Transmembranprotein) in der Membran verankert. Gp120 ist im

Serum und auch im lymphatischen Gewebe nachweisbar. An der Innenseite der Virushülle befindet sich das Membran-assoziierte p17 (MA= Matrixprotein), welches für ein ikosaederförmiges Grundgerüst unter der Lipidhülle sorgt. Das virale Kapsid besteht aus ca. 1200 Proteinuntereinheiten des p24 (CA= Kapsid-Antigen) und ist von kegelförmiger Gestalt. Das p6 (LI= Linkprotein) verbindet das Kapsid mit der Membran. Im Kapsid befinden sich zwei RNA-Genome, die als Nukleinsäurekomplex an das p7 (NC= Nukleoprotein) gebunden sind. Als weitere virale Komponenten sind die Enzyme p66/51 (RT= Reverse Transkriptase, ein Heterodimer), p32 (IN= Integrase) und p11 (PR= Protease, ein Homodimer) enthalten.

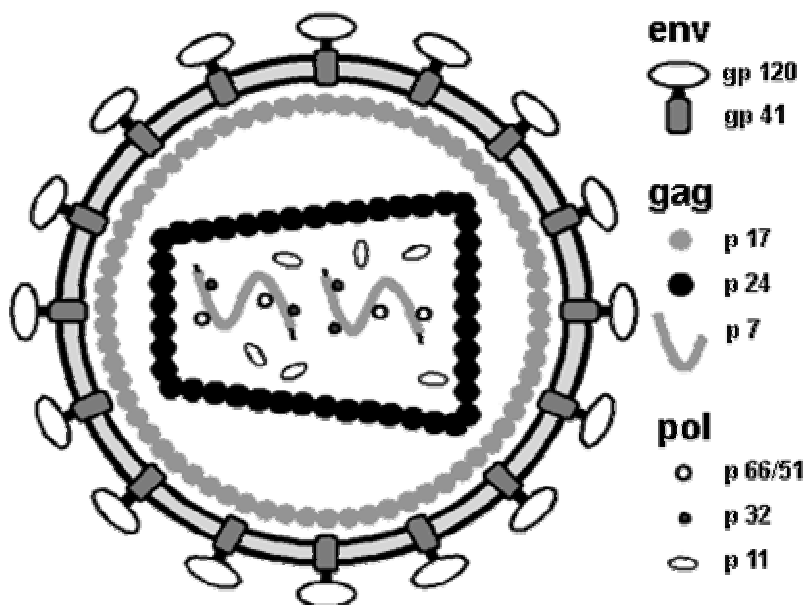


Abbildung 1.2: Aufbau des HIV-Partikels.

Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Eberle, MvP.

1.8 Organisation des viralen Genoms

Replikationskompetente Retroviren benötigen die drei Gene gag, env und pol; gag steht für "group-antigen", pol für "Polymerase" und env für "envelope". Der Aufbau des Genoms ist folgendermaßen: 5' LTR- gag- pol- env- LTR 3', wobei LTR ("long terminal repeat")-Regionen die Teile des viralen Genoms sind, die bei Integration beidseitig mit der zellulären DNA verbunden werden. Sie beinhalten die für Transkription von Retroviren charakteristischen Promotor- und Enhancerregionen (Rosen *et al.* 1985). Die Gene gag und env kodieren das Nukleokapsid und die Glykoproteine der Virushülle (Henderson *et al.* 1992), pol kodiert für die Reverse Transkriptase, die Protease und die Integrase (Reil *et al.* 1993).

HIV-1 enthält 6 zusätzliche Gene (vif, vpr, vif, tat, rev und nef), die zur genetischen Komplexität beitragen und für regulatorische Proteine kodieren (Abb.1.3). Für die Virusreplikation *in vitro* nicht erforderlich sind nef, vif, vpr und vpu. Diese werden deshalb als akzessorische Gene bezeichnet (Wong-Staal 1991).

Tat und rev sind regulatorische Proteine und akkumulieren im Zellkern. Dieser Vorgang ist Voraussetzung für den Übergang von der frühen zur späten Phase des Replikationszyklus. Das Tat-Protein ist essentiell für die Virusreplikation in fast allen Kultursystemen. Es stimuliert die Transkription von HIV-DNA in RNA 100fach.

Rev als nukleärer Exportfaktor ist wichtig für die Umstellung der Expression von den frühen regulatorischen Proteinen zu den später synthetisierten Strukturproteinen (Cullen 1991). Es ist verantwortlich für unterschiedliche Spleißlängen der mRNAs.

Nef wird als regulatorisches Protein früh während des Replikationszyklus produziert und bewirkt die Senkung von CD4 und HLA-Klasse-I-Antigenen an der Oberfläche infizierter Zellen. Somit wird das "Entkommen" vor dem Angriff zytotoxischer T-Zellen begünstigt, die HIV-Peptide nur im Kontext mit HLA-Klasse-I erkennen (Aiken *et al.* 1994, Collins *et al.* 1998, Harris *et al.* 1999).

Vpr kann sowohl zelluläre als auch virale Promotoren stimulieren und scheint für die Virusreplikation in nicht teilenden Zellen wie z.B. Makrophagen von Bedeutung zu sein.

Vpu spielt beim “budding“ eine Rolle, da bei Mutationen in vpu die Viren an der Zelloberfläche verbleiben. Es ist bei der Degradation von CD4-gp160-Komplexen im endoplasmatischen Retikulum beteiligt, damit genügend gp160 für die Neubildung von Virionen bereitsteht.

Vif ist beim intrazellulären Transport viraler Bestandteile beteiligt und somit an der Virusreifung. Seine Zielstruktur ist das zelluläre Protein APOBEC 3G (apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, catalytic polypeptide-like3G), eine Cytidin-Deaminase. Die Wirkung des APOBEC 3G besteht in der Veränderung fremder DNA, so dass diese vom Kontrollsystem abgebaut werden kann. Vif bindet an APOBEC 3G und inaktiviert es. Damit kann die HIV DNA der Zerstörung entgehen (Sheehy *et al.* 2002).

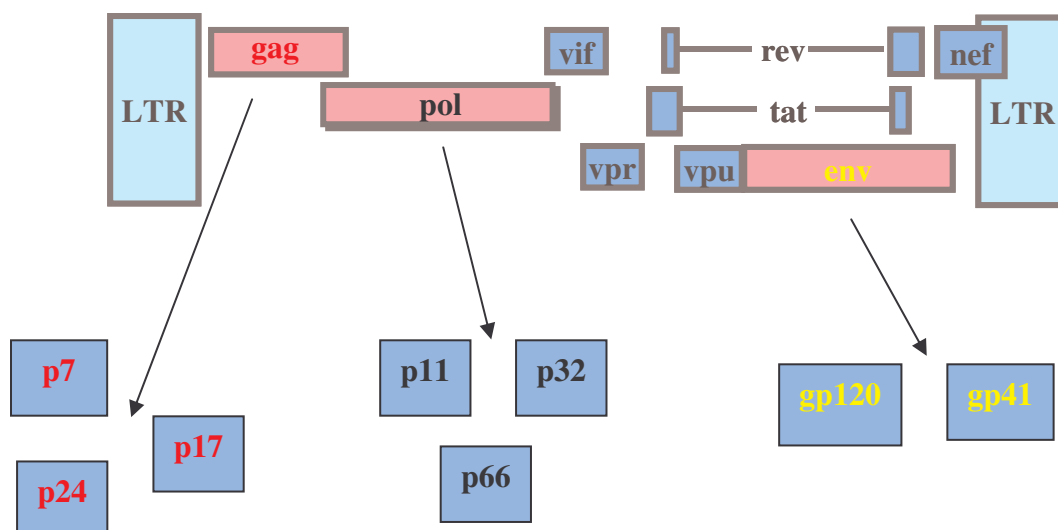


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms

Das provirale, doppelsträngige DNA-Genom ist von Long Terminal Repeats (LTRs) flankiert, von welchen die 5'-LTR als Promotor für die Synthese viraler RNA wirken. Die offenen Leseraster von HIV-1 sind als rosa bzw. blaue Boxen (nähere Erläuterung siehe Text) dargestellt. Die transaktiven Proteine tat und rev sind durch 2 Exons kodiert und regulieren die HIV-1 Genexpression.

1.9 Replikationszyklus des HI-Virus

Das HI-Virus dockt an eine CD4-positive Zelle an. Ebenfalls werden als Korezeptoren CXCR4 (T-tropes HIV-Isolat; auf T-Zellen) oder CCR5 (M-tropes HIV-Isolat; auf Makrophagen) benötigt. Wie im unteren Teil der Abb.1.4 zu sehen ist, adsorbiert das Virus mit dem äußeren Teil des Glykoproteinkomplexes gp120 an den CD4-Rezeptor. Dies bewirkt eine konformationelle Änderung von gp120 und ermöglicht somit eine Interaktion der V3-Schleife des gp120 mit dem jeweiligen Korezeptor. Die Virushüllmembran verschmilzt mit der Cytoplasmamembran. Es kommt zur Fusion mittels der Intermediärstruktur des HIV-Proteins gp41. Durch die Reverse Transkriptase wird das virale RNA-Genom in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Die virale Integrase vermittelt im Zellkern die Integration der Virus-DNA in das Zellgenom. Durch die Polymerase II der Zelle wird die Provirus-DNA transkribiert, wobei anfangs mehrfach gespleißte mRNAs gebildet werden. Diese werden nach dem Export aus dem Zellkern im Cytoplasma zu den viralen Steuerproteinen nef, tat, rev, vif, vpr, vpu und dem Strukturglykoprotein env translatiert. Die im Cytoplasma synthetisierten regulatorischen Proteine tat und rev (auch nef und tev) werden in den Zellkern transportiert. Tat bindet an die Promotorregion und führt somit zur Steigerung der RNA-Expression. Rev wirkt posttranskriptionell und bindet an das RRE-Element (Rev responsive element). Dies leitet dazu über, dass vorwiegend ungespleißte oder nur einfach gespleißte mRNAs aus dem Kern transportiert werden. Die Translation der gag-, pol- und env-Proteine findet an diesen RNA-Spezies statt. Die neuen Virionen erhalten ungespleißte RNA als genomische RNA. Der Vorläufer pr160 der Hüllproteine wird im endoplasmatischen Retikulum mehrfach glykosyliert. Eine Trimerisierung findet bereits hier statt. Nach im Golgi-Apparat erfolgter Spaltung werden gp120 SU und gp41 TM zur Zellmembran transportiert. Dort kommt es zur sogenannten "self-assembly". Genomische RNA, pol-Proteine mit Enzymfunktion und gag-Strukturproteine werden in bestimmter Ordnung verpackt. Nach Ausknospung und Fertigstellung der Hülle wird das noch nicht infektiöse Virion von der Zelle freigesetzt. Durch die virale Protease erfolgt die Reifung zu infektiösen Viren mittels Spaltung der gag- und gag/ pol-Vorläuferproteine (Prozessierung in Matrix-, Capsid-, Nukleokapsid-Proteine sowie Reverse Transkriptase und Integrase). Somit kommt es durch die Protease zu morphologischen und funktionellen Reifung.

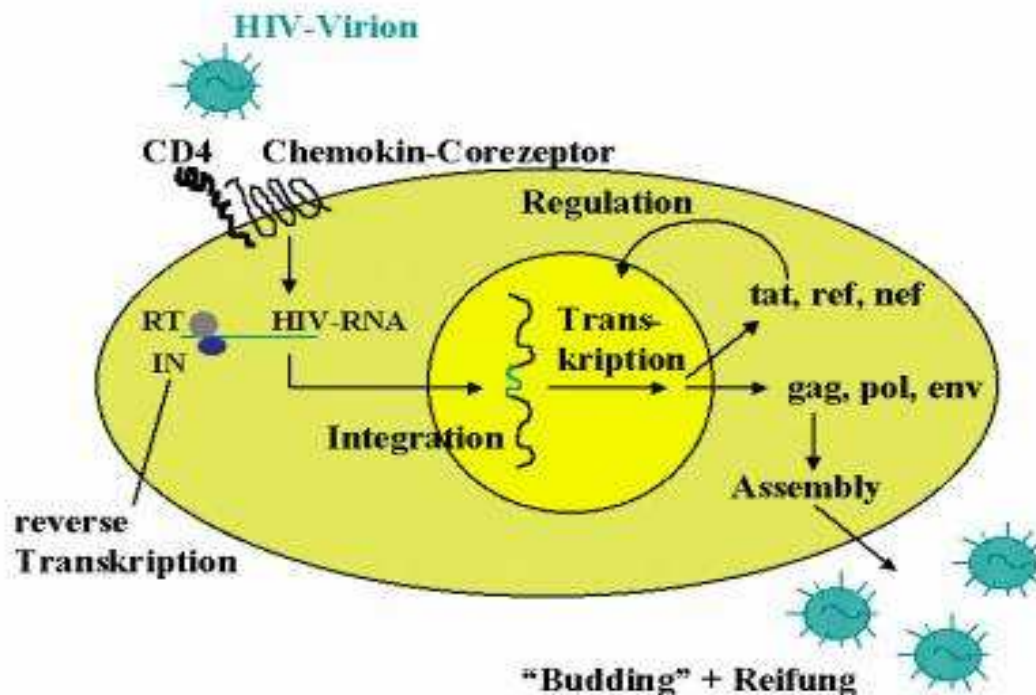


Abbildung 1.4: Replikationszyklus eines Virus innerhalb einer CD4-Zielzelle.

(<http://www.hiv.net/2010/buch/pathophy.htm>; abgerufen am 10.01.2007).

1.10 Reverse Transkriptase

Die Mg^{2+} -abhängige Reverse Transkriptase (RT) kann sowohl als RNA- als auch als DNA-abhängige DNA-Polymerase wirken und enthält zudem noch eine RNaseH, die RNA-Anteile von DNA/ RNA-Hybridsträngen abbaut (Coffin 1990).

Die RT ist ein Heterodimer aus zwei Proteineinheiten mit einem Molekulargewicht von 66kD und 51kD. Die Kristallstruktur des Enzyms im Komplex mit Nevirapin wurde zu Beginn der neunziger Jahre ermittelt (Kohlstaedt *et al.* 1992a, Smerdon *et al.* 1994). Inzwischen existieren drei Strukturen des Enzyms ohne Liganden (Rodgers *et al.* 1995, Esnouf *et al.* 1995, Hsiou *et al.* 1996) und einige zusätzliche RT-Strukturen in Verbindung mit Inhibitoren (Ding *et al.* 1995, Ren *et al.* 1995). Die Polymerasestruktur gleicht einer rechten Hand, die Untereinheit p66 wird als Finger, innere Handfläche und Daumen dargestellt (Kohlstaedt *et al.* 1992b, Abb.1.5). Die kleinere Untereinheit entsteht durch Abspaltung des carboxyterminalen RNaseH-Teils. Folglich ist das 51kD-Protein mit der aminoterminalen Region der größeren Untereinheit identisch. Die RNase-Aktivität befindet sich in der

carboxyterminalen Region der größeren Untereinheit, die Polymerasefunktionen sind durch aminoterminalen Aminosäuren definiert.

Die RT bewirkt im frühen Teil des Replikationszyklus die Umschreibung der viralen RNA in doppelsträngige DNA. Sie besitzt keinen Mechanismus zur Kontrolle der Lesegenauigkeit. So werden in die neusynthetisierten Stränge mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} falsche Basen eingebaut. Auch chemisch veränderte Derivate werden eingebaut. Stehen Nukleosidanaloga wie AZT, DDC oder DDI zur Verfügung, führen diese bei Einbau in den DNA-Strang zum Kettenabbruch, und das doppelsträngige DNA-Zwischenprodukt, das für die Integration in das Wirtszellgenom notwendig ist, fehlt.

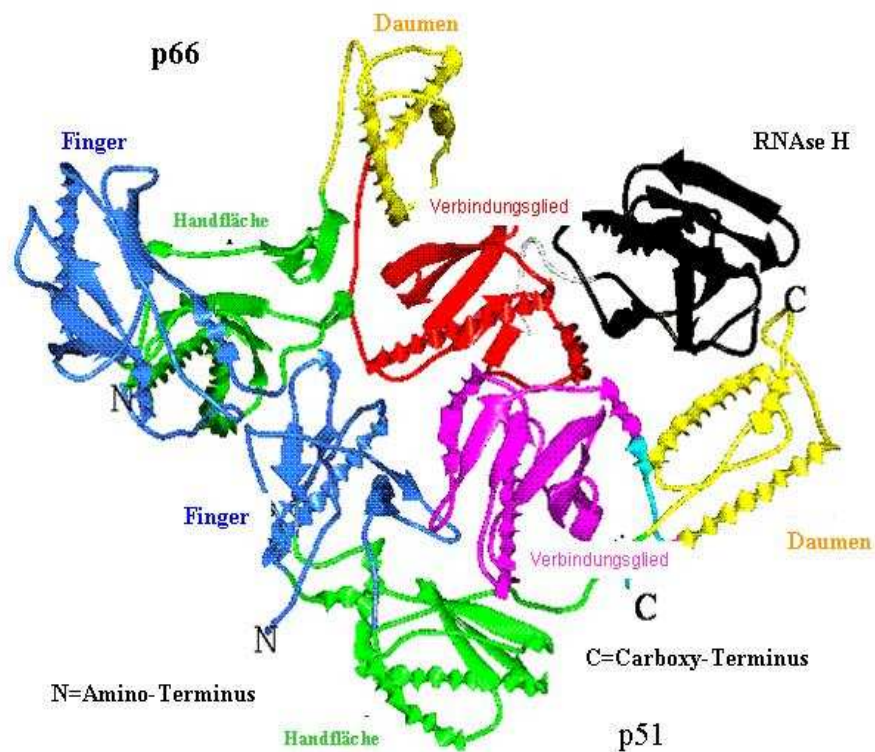


Abbildung 1.5: Reverse Transkriptase.

1.11 Protease

Die Aminosäuresequenz der aktiven Protease ist relativ kurz (99AS) mit einem Molekulargewicht von ca. 10-12 kD. Die Protease ist ein Homodimer, sie besteht somit aus zwei identischen Untereinheiten, deren Kontaktfläche das aktive Zentrum bildet (Lapatto *et al.* 1989, Navia *et al.* 1989, Wlodawer *et al.* 1989). Im aktiven Zentrum befinden sich zwei funktionell wichtige Asparaginsäuren. Das Enzym wirkt als Aspartat-Protease (Asp- Thr- Gly- Sequenz, AS 25- 27, Tho *et al.* 1985). Die beiden Untereinheiten des Dimers sind vor allem durch ein viersträngiges antiparalleles β -Faltblatt, das Amino- und Carboxytermini enthält, verbunden. Zwischen den Untereinheiten ist eine längere Spalte, in welcher die Substratpolypeptide binden und sich die zwei katalytisch bedeutsamen Asp-Reste befinden. Jede Untereinheit hat ein Segment ("flap"), das von einem antiparallelen β -Faltblatt mit einem β -Turn gebildet wird und sich über die substratbindende Spalte erstreckt (Abb. 1.6). Bei Bindung eines PR-Inhibitors oder des Substrates kommt es zur Konformationsänderung des flap. Die Protease ist für die Prozessierung der gag- und gag/ pol-Vorläufer Proteine in die einzelnen Komponenten zuständig, die sich in infektiösen Viruspartikeln vorfinden. Sie wirkt folglich im späten Teil des Replikationszyklus. Bevorzugt findet die Spaltung zwischen Phenylalanin- oder Tyrosin- und Prolinresten statt. Eine Blockierung dieses Vorgangs führt letztendlich zu unreifen, nicht infektiösen Viren, da nur maturierte Komponenten in der Lage sind, voll funktionsfähige, infektiöse Viren zu bilden (von der Helm 1996, Crawford und Goff 1985).

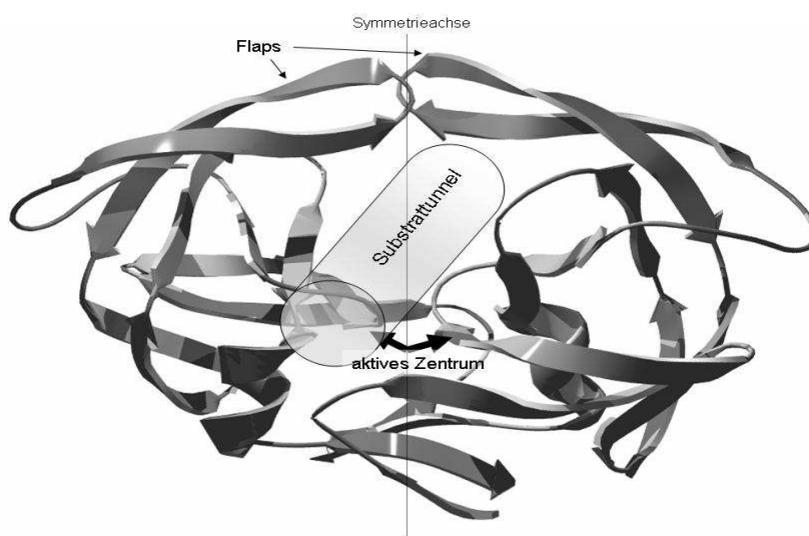


Abbildung 1.6: Protease. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Eberle, MvP.

1.12 Bisherige Angriffspunkte in der HIV-Therapie und neue Ansatzpunkte

Ziel der HIV-Therapie (meist eine 3er Kombination aus den in den folgenden Abschnitten beschriebenen Reverse Transkriptase- und Proteaseinhibitoren) ist es, die Virusproduktion zu senken, indem man verschiedene Schritte im Replikationszyklus des HI-Virus hemmt.

1.12.1 NRTIs

Am längsten eingesetzt werden Medikamente aus der Gruppe der Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs), deren Ansatzpunkt das Enzym Reverse Transkriptase ist. NRTIs konkurrieren als alternative Substrate oder "falsche Bausteine" mit den physiologischen Nukleosiden, sind aber durch geringe Veränderungen am Zuckermolekül zu unterscheiden. Eine Modifikation an der 3'-OH Gruppe der Desoxyribose führt zum Kettenabbruch, da keine Phosphodiesterbrücke aufgebaut werden kann. Alle Nukleosidanaloga werden von der Zelle unverändert aufgenommen und von zellulären Kinasen durch Phosphorylierung in ihre aktive Form (Desoxynukleotid-Triphosphate, dNTP) überführt. Zu den NRTIs zählen z.B. Azidothymidin (AZT), Dideoxycytidin (DDC), Dideoxyinosin (DDI), welche auch in dieser Arbeit verwendet wurden.

Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren wirken wie die Gruppe der NRTIs, aber besitzen zusätzlich noch einen Phosphorsäure-Rest. Tenofovir (TDF) ist ein Adeninphosphonatanalogon. Durch zwei Phosphorylierungsschritte wird es intrazellulär in den aktiven Metaboliten Tenofovirdiphosphat überführt.

1.12.2 NNRTIs

Die zweite Gruppe sind die Nicht-Nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs). Sie hemmen auch die Reverse Transkriptase, aber fungieren nicht als falsche Bausteine, sondern binden nahe am aktiven Zentrum. Es resultiert eine Konformationsänderung an der aktiven Bindungsstelle und die Reverse Transkriptase wird blockiert. NNRTIs müssen im Gegensatz zu NRTIs nicht erst von der Zelle aktiviert werden. Beispiele für NNRTIs sind Nevirapin (NVP) und Efavirenz (EFV).

1.12.3 PIs

Die dritte Gruppe ist die der Protease-Inhibitoren (PIs). Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung des Enzyms Protease, das Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine in seine Untereinheiten spaltet. Ohne Spaltung unterbleibt die Reifung und es entstehen Viruspartikel, die nicht infektiös sind. Synthetische Peptide, welche von den Sequenzen der Schnittstelle abgeleitet sind, inhibieren die Protease. PIs setzen sich genau in das aktive Zentrum der Protease. Sie haben seit 1995 die HIV-Therapie revolutioniert. Zu den PIs zählen zum Beispiel Saquinavir (INV), Indinavir (IDV) und Ritonavir (RTV). Eine weitere Therapiemöglichkeit sind sogenannte geboostete PIs. Durch Zusatz von Ritonavir, welches über dasselbe Abbausystem verstoffwechselt wird wie der PI, wird der Abbau des jeweiligen PI blockiert. Dies hat den Vorteil, dass eine geringere Dosis des PI benötigt wird, um den gleichen Wirkspiegel zu erzielen.

1.12.4 Neue Ansatzpunkte in der HIV-Therapie

Zusätzlich zu den bisher bekannten Replikationshemmern wird an der Entwicklung neuer Substanzen gearbeitet. Diese setzen an neuen Zielstrukturen an. Nachfolgend einige Beispiele.

Entry- Inhibitoren: hierbei gibt es drei Schlüsselstellen beim Eintritt vom HI-Virus in die CD4-Zelle:

1. Bindung von HIV an den CD4-Rezeptor ("Attachment"); sogenannte Attachment-Inhibitoren.
2. Co-Rezeptorantagonisten: Bindung von HIV an Korezeptoren; ein CCR5-Antagonist.
3. Fusionsinhibitoren: Hemmung der Fusion von Virus und Zelle z.B. T-20 (Enfuvirtide, Fuzeon). Dieses bindet an eine Intermediärstruktur des HIV-Proteins gp41, die beim Eintritt von HIV in die Zielzelle während der Fusion entsteht.

Integrasehemmer: Die Integrase steuert die Integration viraler DNA in die Wirts-DNA. Die Entwicklung dieser Substanzen geht nur schleppend voran. Ein Beispiel ist die Substanz S-1360 (Yoshinaga *et al.* 2002).

Vakzinierung: An Impfungen, sowohl für den prophylaktischen als auch für den therapeutischen Einsatz, wird geforscht. Therapeutisch in dem Sinne, dass versucht wird die Immunantwort von bereits HIV-infizierten Personen zu stimulieren (Th1, Th2: cell mediated immunity). Leider hatten in den Jahren 1984-1990 diverse Vakzinierungsversuche keinen messbaren Erfolg. In den letzten Jahren waren einige kleinere Erfolge zu verzeichnen (Kwong *et al.* 1998, Trkola *et al.* 1995; Berzofsky, JA 2001).

1.13 Fragestellung und Zielsetzung

Ein dauerhaftes Problem bereitet die Entwicklung von viraler Resistenz gegen die verschiedenen Medikamente, zum Beispiel wegen Unterdosierung bei unregelmäßiger Medikamenteneinnahme. Ferner bereiten den Patienten oft starke Nebenwirkungen Probleme. Einige dieser Nebenwirkungen sind unter anderem Hepatotoxizität, Laktatazidose, Nephrolithiasis, periphere Polyneuropathien, ZNS-Störungen und Fettverteilungsstörungen. Deshalb wurde und wird in den letzten Jahren an der Entwicklung neuer Medikamente gearbeitet.

Ziel dieser Arbeit ist, die Wirksamkeit neuer Replikationsinhibitoren und schon bekannter zu untersuchen. Die jeweiligen Inhibitoren wurden *in vitro* untersucht, um folgende Fragestellung zu beantworten:

Wie stark wird die Virusreplikation gesenkt, wie schnell kommt es zur Senkung und wirken die Substanzen *in vitro* zytotoxisch?

Untersucht wurden:

- die Reverse Transkriptase (RT)-Aktivität in Zellkulturüberständen als Maß für die Virusreplikation
- die Toxizität der Substanzen
- das Zellverhalten (mikroskopisch)

2 Material und Methoden

2.1 HUT-78- und V 79-Zellen

HUT 78-Zellen (ATTC, Gootenberg *et al.* 1981) wurden bei einer Zelldichte von ca. 10^6 /ml in einer Zellkulturflasche (80cm^2 , Fa. Nunc, Kat.-Nr. 153732) in Medium (RPMI 1640, Fa. Gibco, Kat.-Nr. 21875-034) mit 10% Zusatz von Fetal-Calf-Serum (FCS, Fa. Gibco-BRL, Kat.-Nr. 10270) kultiviert. 5ml Glutamin (Fa. Gibco-BRL, Kat.-Nr. 25030-024), 5ml Penstrep (Penicillin und Streptomycin, Fa. Gibco, Kat.-Nr. 15140114) und 0,4ml Mercaptoethanol (Fa. Sigma, Kat.-Nr. M3148) wurden zugesetzt. Einmal pro Woche wurde ca. ein Drittel des Überstandes abgenommen, verworfen und durch neues Medium (RPMI) ersetzt.

Zur Testung von Substanzen, die in den frühen Schritten der Virusreplikation angreifen, wurden HUT 78-Zellen in einer Dichte von 10^5 Zellen/ml in 96-well Platten (Fa. Nunc, Kat.-Nr. 167008) ausgesät und für 24 Stunden mit den Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen frisch infiziert (jeweils $10\ \mu\text{l}$ HIV-1/M und HIV-1/O). Zweimal pro Woche erfolgte eine Überstandabnahme und ein Mediumwechsel (genauer 3.2. und 2.4.3.1)

Zur Testung von Substanzen, die in den späten Schritten der Virusreplikation angreifen, wurden chronisch infizierte HUT 78-Zellen (jeweils HIV-1/M und HIV-1/O) in einer Zelldichte von 10^5 Zellen/ml in 96-well Platten ausgesät. Anschließend wurden die Inhibitoren zugesetzt (genauer 3.1, 2.4.1, 2.4.2 und 2.4.3.2)

Bei V 79-Zellen handelt es sich um Lungenzellen aus der Lunge junger, chinesischer Hamster (*Cricetulus griseus*, Ford und Yerganian 1958). Diese Zellen dienten nur zur Toxizitätsuntersuchungen der potentiellen Inhibitoren und wurden für keine weiteren Tests verwendet (genauer 2.6).

2.2 Viren

Für die Experimente wurden verschiedene HIV-Isolate eingesetzt. Stellvertretend für HIV-1 Gruppe M wurde das Isolat HIV_{LAI} verwendet. Die frühere Bezeichnung LAV, bzw. HTLV-III_B, stammt ursprünglich von den Kulturen des Laboratory of Tumor Cell Biology ab (Barre-Sinoussi *et al.* 1983). Für die Experimente mit HIV-1 der Gruppe O wurde das Isolat MVP5180 (Gürtler *et al.* 1994) eingesetzt.

2.3 RT-Test (Reverse Transkriptase-Test, nicht radioaktiv) und - Prinzip

Überstände aus den 96-well-Platten bei Mediumwechsel wurden quantitativ auf die Aktivität des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) untersucht. Die RT transkribiert RNA in eine Doppelstrang- DNA-Kopie. Sie wird für die frühe provirale DNA-Synthese benötigt. Die Messung der RT-Aktivität ist somit ein Maß für die retrovirale Vermehrung *in vitro* (Hoffman and Levy 1985). Für die Messung oder Quantifizierung der RT-Aktivität wird klassischerweise die Menge der eingebauten, radioaktiven markierten Nukleotide gemessen. Für die nicht radioaktive Messung und Quantifizierung retroviraler Produkte bzw. Vermehrung in Zellkultursystemen und das Screening von antiviralen Präparaten oder RT-Inhibitoren (Pauwels *et al.* 1990) wurde der in dieser Arbeit verwendete nicht-isotope RT-Test entwickelt: Reverse Transcriptase Assay, chemiluminescent, Roche # 1 828 657 (Eberle und Seibl 1992, Eberle und Knopf 1996).

Der nicht radioaktive RT-Test beruht auf der Fähigkeit der Reversen Transkriptase, DNA zu synthetisieren, angefangen von dem Template/ Primer Hybrid Poly (A) oligo (dT) 15. Anstatt radioaktiv markierten, werden Digoxigenin und Biotin markierte Nukleotide in einem optimalen Verhältnis in ein und dasselbe DNA-Molekül eingebaut, welches durch die Reverse Transkriptase frisch synthetisiert wird. Die Messung und Quantifizierung der synthetisierten DNA als Parameter für die Reverse Transkriptase wird mittels eines Sandwich ELISA-Protokolls durchgeführt (Fa. Behring, Typ: ELISA Processor II plus). Biotin markierte DNA bindet an die Oberfläche eines Mikrotiter Platten Moduls (MTP), das mit Streptavidin beschichtet ist. Im nächsten Schritt bindet ein Antikörper gegen Digoxigenin, der mit einer Peroxidase konjugiert ist (anti-DIG-POD), an die mit Digoxigenin markierte DNA. Im letzten Schritt wird ein Chemilumineszenz-Peroxidase-Substrat (Luminol/ 4-Iodophenol) hinzugegeben. Die Peroxidase katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) die

Oxidation von Luminol, was wiederum durch 4-Iodophenol verstärkt wird. Das dabei entstehende Lichtsignal wird durch einen Mikrotiterplatten Chemilumiszenzleser (Fa. Berthold, Typ: Microlumat LB 96 P) quantifiziert.

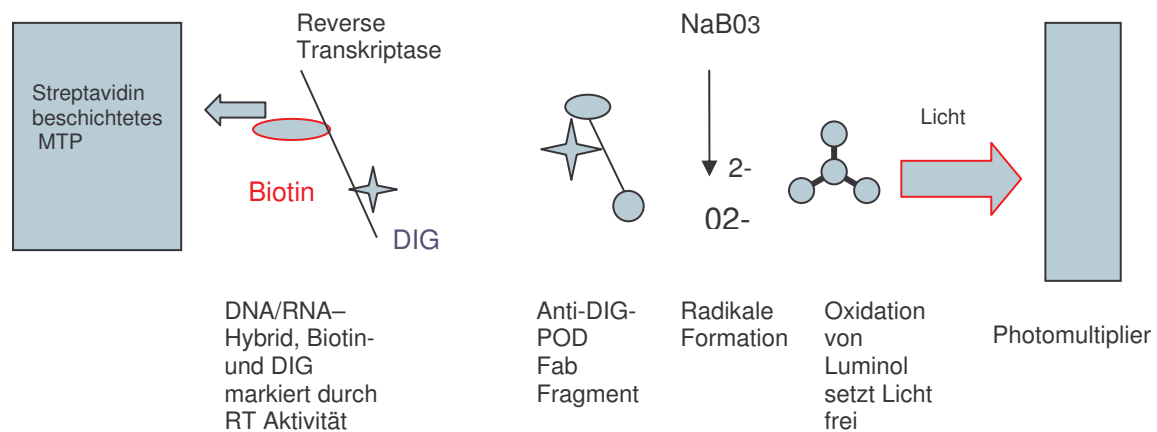


Abbildung 2.1: Chemilumineszenz-Testprinzip

2.4 Replikationsinhibitoren

Für alle Versuche wurden die eingesetzten Substanzen in drei Konzentrationen getestet. Das Verhältnis der Konzentrationen zueinander wurde konstant gehalten; $[c_1]$ = höchste Konzentration, $[c_2] = 1:3 \times [c_1]$; $[c_3] = 1:10 \times [c_1]$. Die Substanzen wurden zunächst in reinem DMSO (Dimethylsulfoxid, Fa. Merck, Kat.-Nr. 9670) gelöst, unter vorsichtiger, tropfenweiser Zugabe von RPMI 1640 auf die Konzentration der Stocklösung verdünnt, steril filtriert und à 100µl aliquotiert bei -20°C gelagert. Bei jedem Versuch wurden aus einem aufgetauten Aliquot der jeweiligen Stocklösung durch weiteres Verdünnen mit komplettem Zellkulturmedium die Endkonzentrationen hergestellt. Die Fa. NASCACELL stellte die hier verwendeten potentiellen Inhibitoren zur Verfügung. Die Substanz Nevirapin wurde freundlicherweise von der Fa. Boehringer Ingelheim bereitgestellt.

2.4.1 Potentielle Protease-Inhibitoren

Die gewählten Konzentrationen für zwei neue Substanzen (Uvaol und Nandrolon), deren Protease-Inhibitorwirkung untersucht wurde, orientierten sich an Referenz-

Veröffentlichungen (Iversen *et al.* 1996, Eberle *et al.* 1995) und am durchgeführten Toxizitätstest (2.6: Trypanblau-Assay).

#1: Uvaol: PI [c1] = 35 μ M
[c2] = 11,7 μ M
[c3] = 3,5 μ M

#3: Nandrolon: PI [c1] = 10 μ M
[c2] = 3,33 μ M
[c3] = 1 μ M

Uvaol ist ein Triterpen-Dialkohol. Es kann zum Beispiel aus den Blättern von *Crataegus pinnatifida* gewonnen werden. Die mögliche Wirkung von Uvaol auf die HIV-1-Protease konnte schon 1999 beobachtet werden (Min *et al.* 1999).

Nandrolon ist ein exogen anaboler Wirkstoff, ein Steroidhormon. Bisher sind seine Wirkungen im HIV-Therapiebereich vor allem zur Förderung der Gewichtszunahme beim HIV- assoziierten Wasting Syndrome bekannt (Gold *et al.* 2006).

Beide Substanzen haben eine Wirkung als Nicht-Substratanaloge Protease-Inhibitoren. 1996 konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass Triterpene zum Beispiel als Dimerisationsinhibitoren der HIV-1-Protease fungieren. Mehrere kleine Peptide mit Sequenzen, die passend zur terminalen Sequenz der Protease sind, können die Zwischenregionen der Proteaseuntereinheiten attackieren und somit die Dimerisation der Untereinheiten und die Enzymaktivität hemmen (Camarasa *et al.* 2006, Hartig *et al.* 2002, Schramm *et al.* 1999, Quere *et al.* 1996).

2.4.2 Potentielle Rev-Inhibitoren

Zwei Rev-Inhibitor-Kandidaten (Coumermycin und Substanz Nr. 1445896) wurden ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Die Auswahl der Konzentrationsverhältnisse erfolgte wie bei 2.4.1.

#4: Coumermycin: Rev [c1] = 23 μ M	#7: Nr. 1445896: Rev [c1] = 69 μ M
[c2] = 7 μ M	[c2] = 23 μ M
[c3] = 2,3 μ M	[c3] = 6,9 μ M

Die Konzentration der jeweiligen Stocklösungen für die neuen Replikationsinhibitoren lag bei 10mM. Je nach unterschiedlicher Substanz wurde eine bestimmte Menge der Stocklösung mit Medium verdünnt, um die entsprechende Testkonzentration [c1] zu erhalten (Uvaol: 35 μ l, Nandrolon: 10 μ l, Coumermycin: 23 μ l und Nr. 1445896: 69 μ l). [c1] wurde dann in 5ml Medium aufgenommen und steril filtriert; [c2] = 1:3 x [c1] wurde durch Mischen von 2ml Medium und 1ml von [c1] hergestellt; [c3] = 1:10 x [c1] aus 2,7ml Medium und 0,3ml von [c1].

Coumermycin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Aminocoumarine, die potente Inhibitoren der DNA-Gyrase sind. Erste Versuche 1993 zeigten eine Wirkung von Coumermycin auf HIV-1 (Jardine *et al.* 1993). Hartig *et al.* konnten bei mehreren Antibiotika, auch aus der Gruppe der Aminocoumarine zeigen, dass es kleine Moleküle gibt, die die Aktivität des HIV-1 Rev-responsive-ribozymes bei der Bindung an Rev modulieren (Hartig *et al.* 2002, Schramm *et al.* 1999).

Bei Substanz Nr. 1445896 handelt es sich um ein kleines Molekül, das durch das SELEX-Verfahren in Nachbildung zu dem entsprechenden, vorher selektierten Aptamer, hergestellt wurde. Aptamere (aus lat. aptus: passen und griech. meros: Teil) sind DNA- oder RNA-Moleküle, die z.B. an Zielstrukturen von Viren binden können. Es handelt sich dabei um dreidimensional gefaltete Oligonukleotide. Beim SELEX-Verfahren (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) wird aus ca. 10^{14} verschiedenen RNA-Ketten zum Beispiel nach einem Aptamer gesucht, das das Zellprotein Cytohesin-2 hemmt, ohne an das sehr ähnliche Cytohesin-1 zu binden. Cytohesin-2 wird dazu an einer Trägersubstanz befestigt und die RNA-Mischungen dazugegeben. Somit können schon einmal die Kandidaten, die an Cytohesin-2 nicht gebunden haben, wieder ausgewaschen werden. Die an das Cytohesin-2 gebundenen, passenden Kandidaten werden danach wieder abgelöst und zu Cytohesin-1 gegeben. Jetzt interessieren nur die Aptamere, die nicht an Cytohesin-1 heften. Diese beiden Aufreinigungsschritte werden so oft wiederholt, bis ein Aptamer gefunden ist, das zwischen den beiden Proteinvarianten eindeutig unterscheiden kann (Famulok *et al.* 1999, Klug *et al.*

1994, Rentmeister *et al.* 2006). Anschließend kann das der Nukleinsäure entsprechende Molekül oder Oligonukleotid synthetisiert werden. Es gibt auch Peptid-Aptamere (meist durch die yeast two-hybrid technique hergestellt), die sich an andere Proteine heften können. Dadurch ist es möglich, unter anderem intrazelluläre molekulare Vorgänge aufzudecken. Schließlich können Peptid-Aptamere durch Bindung an andere Proteine deren Funktion beeinflussen, zum Beispiel komplett blockieren.

2.4.3 Reverse Transkriptase-Inhibitoren

Die gewählten Konzentrationsverhältnisse für die RT-Inhibitoren (Azidothymidin, Dideoxyinosin, Dideoxycytosin und Nevirapin) orientierten sich an Referenz-Veröffentlichungen (Iversen *et al.* 1996, Eberle *et al.* 1995). Die schon bekannten RT-Inhibitoren wurden ausgewählt, um zu zeigen, ob dieses Testverfahren geeignet ist, um Inhibition zu erkennen und um einen Vergleich mit den neuen potentiellen Replikationsinhibitoren herzustellen. Für die Testung von Protease-Inhibitoren lagen entsprechend analoge Daten bereits vor (Eberle *et al.* 1995).

2.4.3.1. RT-Inhibitor-Konzentrationen bei frisch infizierten HUT 78-Zellen

Um die Wirksamkeit der RT-Inhibitoren zu testen wurden HUT 78-Zellen mit den verschiedenen RT-Inhibitoren für 24 Stunden inkubiert, danach wurden sie mit 10 μ l Virusüberstand von HIV-1/M infiziert. Da RT-Inhibitoren optimal im frühen Anteil des HIV-Vermehrungszyklus wirken wurde das Protokoll so gewählt. Grundsätzlich müssen RT-Inhibitoren mittels intrazellulärer Phosphorylierung (Überführung in die Triphosphatform) von der Zelle zuerst aktiviert werden.

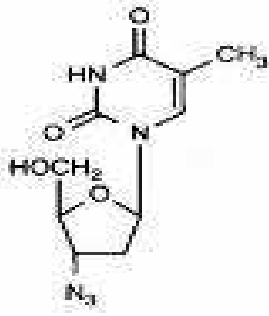


Abbildung 2.2: AZT

AZT:

[c1] = 20μM

[c2] = 6μM

[c3] = 2μM

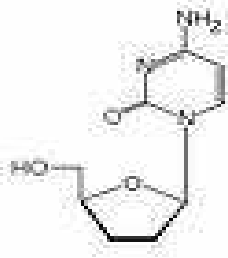


Abbildung 2.3: DDC

DDC:

[c1] = 20μM

[c2] = 6μM

[c3] = 2μM

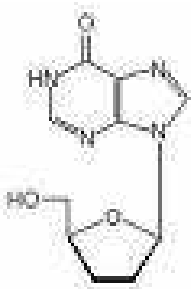


Abbildung 2.4: DDI

DDI:

[c1] = 20μM

[c2] = 6μM

[c3] = 2μM

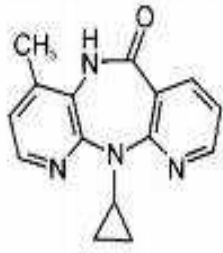


Abbildung 2.5: NVP

NVP:

[c1] = 1 μ M

[c2] = 0,33nM

[c3] = 0,1nM

Die Konzentration der jeweiligen Stocklösungen für die bekannten Replikationsinhibitoren lag bei NVP bei 10mM. Um die entsprechende Testkonzentration [c1] zu erhalten wurden 10 μ l der Stocklösung in 4ml Medium gelöst (zunächst 25 μ M), anschließend 400 μ l in 5ml Medium verdünnt (1 μ M bzw. 1000nM). Bei AZT, DDC, DDI hatte die Stocklösung eine Konzentration von 500 μ M. Je nach unterschiedlicher Substanz wurde eine bestimmte Menge der Stocklösung mit Medium verdünnt, um die entsprechende Testkonzentration [c1] zu erhalten (AZT, DDC, DDI: 400 μ l). [c1] wurde dann in 5ml Medium aufgenommen und steril filtriert; [c2] = 1:3 x [c1] wurde durch Mischen von 2ml Medium und 1ml von [c1] hergestellt; [c3] = 1:10 x [c1] aus 2,7ml Medium und 0,3ml von [c1].

2.4.3.2 RT-Inhibitor-Konzentrationen bei chronisch infizierten HUT 78-Zelle

AZT: [c1] = 10 μ M[c2] = 3 μ M[c3] = 1 μ MDDC: [c1] = 10 μ M[c2] = 3 μ M[c3] = 1 μ M

NVP: [c1] = 0,5nM

[c2] = 0,165 nM

[c3] = 0,05nM

DDI: [c1] = 10 μ M[c2] = 3 μ M[c3] = 1 μ M

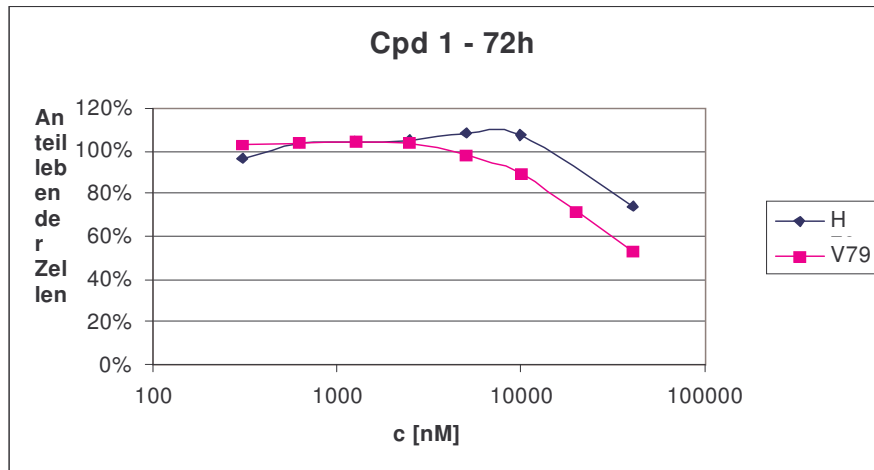
Die Konzentration der jeweiligen Stocklösungen für die bekannten Replikationsinhibitoren lag bei NVP bei 10mM. Um die entsprechende Testkonzentration [c1] zu erhalten wurden 10µl der Stocklösung in 4ml Medium gelöst (zunächst 25µM), anschließend 200µl in 5ml Medium verdünnt (0,5µM bzw. 500nM). Bei AZT, DDC, DDI hatte die Stocklösung eine Konzentration von 500µM. Je nach unterschiedlicher Substanz wurde eine bestimmte Menge der Stocklösung mit Medium verdünnt, um die entsprechende Testkonzentration [c1] zu erhalten (AZT, DDC, DDI: 200µl). [C1] wurde dann in 5ml Medium aufgenommen und steril filtriert; [c2] = 1:3 x [c1] wurde durch Mischen von 2ml Medium und 1 ml von [c1] hergestellt; [c3] = 1:10 x [c1] aus 2,7ml Medium und 0,3ml von [c1].

2.5 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit der StatView-Software (Abacus Concepts Inc., Cary, NC) durchgeführt. Zur statistischen Analyse der Daten wurde der Fisher's PLSD Test verwendet. Die Daten wurden als signifikant definiert, wenn der p-Wert kleiner 0.05 war.

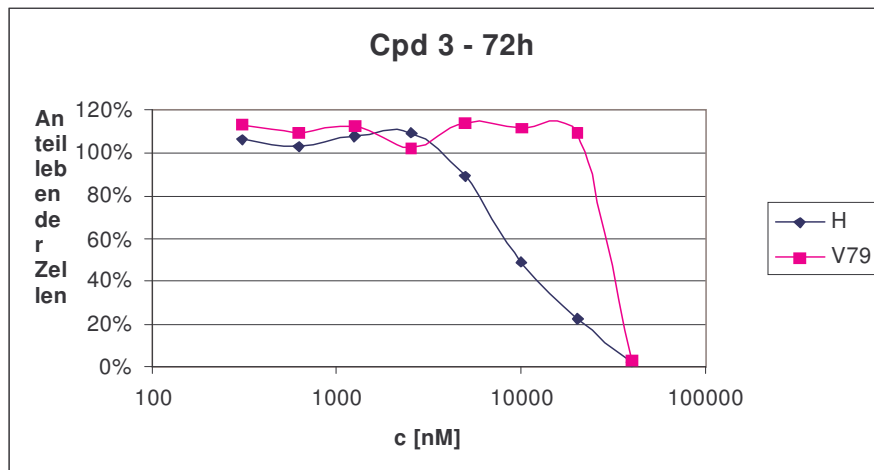
2.6 Toxizitätstest: Trypanblau Assay

Die Toxizitätsdaten für die neuen Inhibitoren (je zwei Protease- und Rev-Inhibitoren) wurden mit dem Trypanblau Exclusion Assay (Fa. Sigma, Kat.-Nr- T8154) ermittelt. Einige Tropfen des Farbstoffes Trypanblau wurden zu den zu messenden Zellproben zugegeben. Vitale Zellen sind in der Lage den Farbstoff aktiv auszuschließen. Bei toten Zellen diffundiert der Farbstoff ins Zytoplasma und färbt dieses blau. Anschließend wurden die Proben in einer Neubauerzählkammer ausgezählt und der prozentuale Anteil blau gefärbter Zellen bestimmt. Die Konzentrationen der Inhibitoren wurden so gewählt, dass bei entsprechender LC₅₀ der Anteil lebender Zellen berücksichtigt wurde. Die Abkürzung Cpd wurde hier für „cytotoxic point of dose“ verwendet. Zur groben Einschätzung der Zytotoxizität für die weitere Versuchsplanung wurden Werte für zwei Zelllinien (HUT 78- und V 79-Zellen) von der Fa. NASCACELL zur Verfügung gestellt.

Substanz #1**Abbildung 2.6: Toxizitätsergebnis Uvaol.**

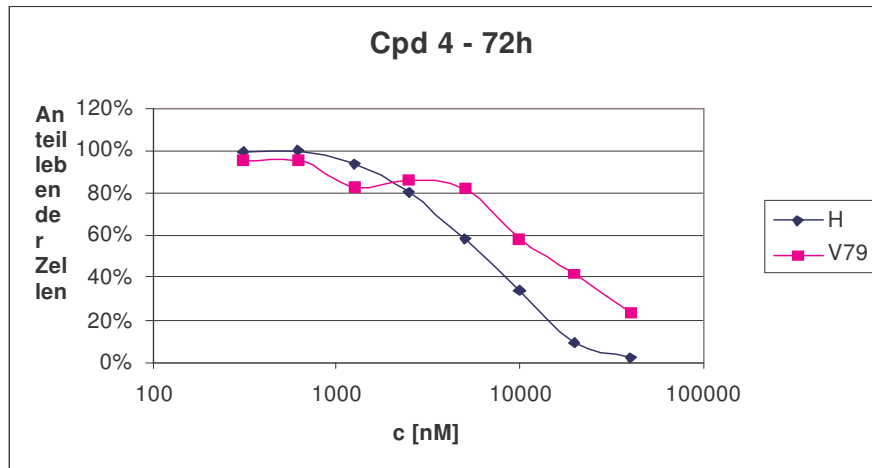
H= HUT 78-Zellen, [c1]= 35 μ M, [c2]= 11,7 μ M, [c3]= 3,5 μ M

LC₅₀ (HUT 78) > 50 μ M, LC₅₀ (V79) > 50 μ M

Substanz #3**Abbildung 2.7: Toxizitätsergebnis Nandrolon.**

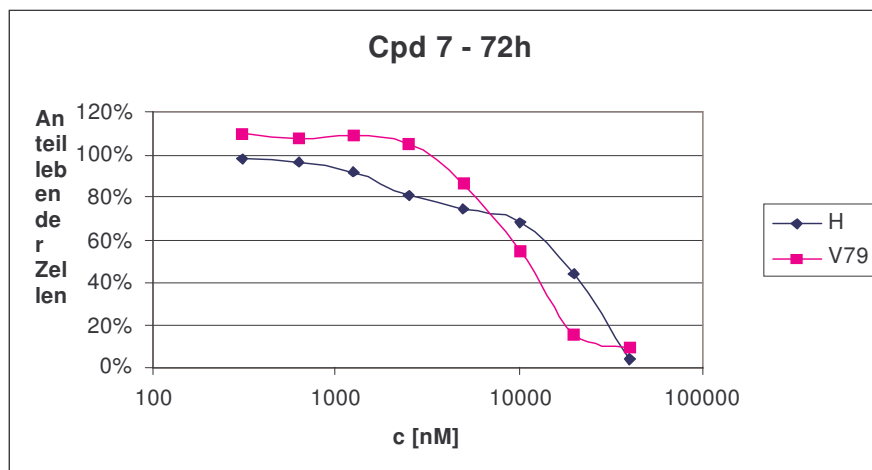
H= HUT 78-Zellen, [c1]= 10 μ M, [c2]= 3,33 μ M, [c3]= 1 μ M

LC₅₀ (HUT 78) = 8 μ M, LC₅₀ (V79) = 30 μ M

Substanz #4**Abbildung 2.8: Toxizitätsergebnis Coumermycin.**

H= HUT 78-Zellen, [c1]= 23 μ M, [c2]= 7 μ M, [c3]= 2,3 μ M

LC₅₀ (HUT 78) = 8 μ M, LC₅₀ (V79) = 20 μ M

Substanz #7**Abbildung 2.9: Toxizitätsergebnis Nr.1445896.**

H= HUT 78-Zellen, [c1]= 69 μ M, [c2]= 23 μ M, [c3]= 6,9 μ M

LC₅₀ (HUT 78) = 20 μ M, LC₅₀ (V79) = 30 μ M

2.7 Lyse-Puffer und Pipetten

Als Lyse-Puffer, um die Retroviren zu lysieren, wurde ein Tris-Puffer verwendet. Herstellung: 50mM Tris, 80mM Magnesiumchlorid, 2,5mM Dithiothreitol, 0,75 EDTA und 0,5% Triton X- 100, pH 7,8. bzw. im RT-KIT enthalten (Reverse Transcriptase Assay, chemiluminescent, Roche # 1 828 657; Eberle und Seibl 1992, Eberle und Knopf 1996). Des weiteren wurden eine Multikanalpipette (25-200 μ l, Fa. Bibby Dunn Labortechnik GmbH) und Pipettenspitzen der Firma Sarstedt (Kat.-Nr. 70.760.002) verwendet.

3 Versuchsaufbau und- ablauf

3.1 Versuchsaufbau von Protease-, Rev- und RT-Inhibitoren bei chronisch infizierten HUT 78-Zellen

Vier 96-well Platten wurden insgesamt verwendet; zwei für die 4 neuen Replikationsinhibitoren (je HIV-1/M und HIV-1/O) und zwei für die RT-Inhibitoren (je HIV-1/M und HIV-1/O). Um eine Zelldichte der HUT 78-Zellen von ca. 5×10^5 Zellen pro Vertiefung zu erreichen, wurden 8ml Zellsuspension aus einer Dauerkulturflasche nach Aufschütteln in ein 15ml Falcontube gegeben, schonend abzentrifugiert (5 min. bei 1200 U) und in 8ml frisches Medium aufgenommen. Je 100 μ l wurden pro Vertiefung vorgegeben. Die Belegung bzw. Einteilung der Platten wurde folgendermaßen vorgenommen:

Pro 96-well Platte wurden 60 Vertiefungen mit Zellen, 36 Vertiefungen am Rand entlang nur mit Medium als Verdunstungsschutz belegt. Die 60 Vertiefungen wurden aufgeteilt auf 4 Replikationsinhibitoren (pro Substanz 12 Vertiefungen, 3 Konzentrationen im Vierfachansatz), d.h. 48 Vertiefungen mit Inhibitoren und 12 Vertiefungen als Kontrolle (K) ohne Inhibitoren (Abb.: 3.1). Die Platten wurden auf Gittern in befeuchtete Edelstahlkammern im Brutschrank bei ca.37°C aufbewahrt (CO₂-Gehalt:5%).

Plattenbelegung bei potentiellen Protease- und Rev-Inhibitoren

HIV-1/M

#1 [c1]	#1 [c1]	#1 [c1]	#1 [c1]	K	K	#3 [c1]	#3 [c1]	#3 [c1]	#3.[c1]
#1 [c2]	#1 [c2]	#1 [c2]	#1 [c2]	K	K	#3 [c2]	#3 [c2]	#3 [c2]	#3 [c2]
#1 [c3]	#1 [c3]	#1 [c3]	#1 [c3]	K	K	#3 [c3]	#3 [c3]	#3 [c3]	#3 [c3]
#4 [c1]	#4 [c1]	#4 [c1]	#4 [c1]	K	K	#7 [c1]	#7 [c1]	#7 [c1]	#7 [c1]
#4 [c2]	#4 [c2]	#4 [c2]	#4 [c2]	K	K	#7 [c2]	#7 [c2]	#7 [c2]	#7 [c2]
#4 [c3]	#4 [c3]	#4 [c3]	#4 [c3]	K	K	#7 [c3]	#7 [c3]	#7 [c3]	#7 [c3]

Abbildung 3.1: HIV-1/M. Plattenbelegung: Potentielle Protease- und Rev-Inhibitoren.

HIV-1/O

#1 [c1]	#1 [c1]	#1 [c1]	#1 [c1]	K	K	#3 [c1]	#3 [c1]	#3 [c1]	#3.[c1]
#1 [c2]	#1 [c2]	#1 [c2]	#1 [c2]	K	K	#3 [c2]	#3 [c2]	#3 [c2]	#3 [c2]
#1 [c3]	#1 [c3]	#1 [c3]	#1 [c3]	K	K	#3 [c3]	#3 [c3]	#3 [c3]	#3 [c3]
#4 [c1]	#4 [c1]	#4 [c1]	#4 [c1]	K	K	#7 [c1]	#7 [c1]	#7 [c1]	#7 [c1]
#4 [c2]	#4 [c2]	#4 [c2]	#4 [c2]	K	K	#7 [c2]	#7 [c2]	#7 [c2]	#7 [c2]
#4 [c3]	#4 [c3]	#4 [c3]	#4 [c3]	K	K	#7 [c3]	#7 [c3]	#7 [c3]	#7 [c3]

Abbildung 3.2: HIV-1/O. Plattenbelegung: Potentielle Protease- und Rev-Inhibitoren.

Plattenbelegung bei RT Inhibitoren

HIV-1/M

AZT[c1]	AZT[c1]	AZT[c1]	AZT[c1]	K	K	DDC[c1]	DDC[c1]	DDC[c1]	DDC[c1]
AZT[c2]	AZT[c2]	AZT[c2]	AZT[c2]	K	K	DDC[c2]	DDC[c2]	DDC[c2]	DDC[c2]
AZT[c3]	AZT[c3]	AZT[c3]	AZT[c3]	K	K	DDC[c3]	DDC[c3]	DDC[c3]	DDC[c3]
DDI[c1]	DDI[c1]	DDI[c1]	DDI[c1]	K	K	NVP[c1]	NVP[c1]	NVP[c1]	NVP[c1]
DDI	DDI[c2]	DDI[c2]	DDI[c2]	K	K	NVP[c2]	NVP[c2]	NVP[c2]	NVP[c2]
DDI[c3]	DDI[c3]	DDI[c3]	DDI[c3]	K	K	NVP[c3]	NVP[c3]	NVP[c3]	NVP[c3]

Abbildung 3.3: HIV-1/M. Plattenbelegung: RT-Inhibitoren.

HIV-1/O

AZT[c1]	AZT[c1]	AZT[c1]	AZT[c1]	K	K	DDC[c1]	DDC[c1]	DDC[c1]	DDC[c1]
AZT[c2]	AZT[c2]	AZT[c2]	AZT[c2]	K	K	DDC[c2]	DDC[c2]	DDC[c2]	DDC[c2]
AZT[c3]	AZT[c3]	AZT[c3]	AZT[c3]	K	K	DDC[c3]	DDC[c3]	DDC[c3]	DDC[c3]
DDI[c1]	DDI[c1]	DDI[c1]	DDI[c1]	K	K	NVP[c1]	NVP[c1]	NVP[c1]	NVP[c1]
DDI[c2]	DDI[c2]	DDI[c2]	DDI[c2]	K	K	NVP[c2]	NVP[c2]	NVP[c2]	NVP[c2]
DDI[c3]	DDI[c3]	DDI[c3]	DDI[c3]	K	K	NVP[c3]	NVP[c3]	NVP[c3]	NVP[c3]

Abbildung 3.4: HIV-1/O. Plattenbelegung: RT-Inhibitoren.

3.1.1 Versuchsaufbau (Versuch I)

Abnahme des Überstands (ÜS) und Mediumwechsel erfolgten an den Tagen 4, 8, 11, 15, 18. Die Überstände wurden nach Lysierung bei -70°C eingefroren. Die Reduktion der RT-Aktivität der jeweiligen Tage wurde als Maß für die Virusreplikationshemmung gemessen. Die Zellbeschaffenheit wurde mikroskopisch begutachtet.

Tag 1:

Gestartet wurde mit 100µl Zellsuspension und 100µl der jeweiligen Inhibitorenkonzentration pro well.

Tag 4:

Erste Überstandsabnahme, Mediumwechsel und Begutachtung der Zellbeschaffenheit. 100µl ÜS wurden vorsichtig abgenommen, ohne dass die Zellen in den 96 Vertiefungen aufgeschüttelt wurden, und 100µl der jeweiligen Inhibitorenkonzentration und 100µl Medium komplett für die Kontrollen wieder hinzugefügt. Die 100µl ÜS wurden in eine 96-well-Platte (ÜS I) gegeben, in der zuvor überall pro well 100µl Lysepuffer vorgelegt worden waren (Gesamtvolumen pro well: 200µl). Anschließend wurde eine komplette Kopie von ÜS I

gemacht, indem 100µl wiederum auf eine 96 well-Platte pipettiert wurden (ÜS II). Danach wurden die Platten mit dem lysierten Überstand bei -70°C eingefroren.

Tag 8, 11, 15:

Idem zu Tag 4.

Tag 18:

Idem zu Tag 4, aber abschließende Färbung mit Trypanblau auf Vitalität.

3.2 Versuchsaufbau von RT-Inhibitoren bei frisch infizierten HUT 78-Zellen

Eine 96-well Platte wurde verwendet. 2ml Zellsuspension aus einer Dauerkulturflasche der HUT 78-Zellen wurden nach Aufschütteln in ein 15ml Falcontube gegeben, schonend abzentrifugiert (5 min. bei 1200 U) und in 5ml frisches Medium aufgenommen. Je 100µl Zelldichte wurden pro well vorgegeben. Die Belegung bzw. Einteilung der Platten wurde folgendermaßen vorgenommen:

Plattenbelegung bei RT-Inhibitoren

HIV-1/M

AZT[c1]	AZT[c1]	AZT[c1]	AZT[c1]	K	K	DDI[c1]	DDI[c1]	DDI[c1]	DDI[c1]
AZT[c2]	AZT[c2]	AZT[c2]	AZT[c2]	K	K	DDI[c2]	DDI[c2]	DDI[c2]	DDI[c2]
AZT[c3]	AZT[c3]	AZT[c3]	AZT[c3]	K	K	DDI[c3]	DDI[c3]	DDI[c3]	DDI[c3]
NVP[c1]	NVP[c1]	NVP[c1]	NVP[c1]	K	K	HUT 78	HUT 78	HUT 78	HUT 78
NVP[c2]	NVP[c2]	NVP[c2]	NVP[c2]	K	K	HUT 78	HUT 78	HUT 78	HUT 78
NVP[c3]	NVP[c3]	NVP[c3]	NVP[c3]	K	K	HUT 78	HUT 78	HUT 78	HUT 78

Abbildung 3.5: HIV-1/M. Plattenbelegung: RT-Inhibitoren bei frisch infizierten Zellen.

3.2.1 Versuchsablauf (Versuch II)

Tag 0:

Pro well wurden 100µl der HUT 78-Zellen mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml vorgelegt. Anschließend wurden die Inhibitoren (100µl) in den oben angegebenen Konzentrationen dazugegeben. Zusätzlich zu den Vertiefungen mit den Inhibitoren und der Kontrolle (ohne Inhibitoren), wurden 12 Vertiefungen mit HUT 78-Zellen ohne Virus und Inhibitor als reine Wachstumskontrolle angelegt. Die gesamte Inkubationszeit vor Infizierung mit HIV-1/M betrug 24 Stunden.

Tag 1:

Infizierung pro well mit 10µl ÜS aus Dauerkulturflasche von HIV-1/M (HUT 78-Zellen). Die Infektionsdosis/Zelle oder auch MOI (multiplicity of infection) betrug ca. 0,02.

Tag 4:

Erste Überstandsabnahme, Mediumwechsel und Begutachtung der Zellbeschaffenheit, 100µl ÜS wurden vorsichtig abgenommen, ohne dass die Zellen in den 96 Vertiefungen aufgeschüttelt wurden, und 100µl der jeweiligen Inhibitorenkonzentration und 100µl Medium komplett für die Kontrollen wieder hinzugefügt. Die 100µl ÜS wurden in eine 96 well-Platte (ÜS I) gegeben, in der zuvor überall pro well 100µl Lysepuffer vorgelegt worden waren (Gesamtvolumen pro well: 200µl). Anschließend wurde eine komplette Kopie von ÜS I gemacht, indem 100µl wiederum auf eine 96 well-Platte pipettiert wurden (ÜS II).

Tag 8:

Idem zu Tag 4.

Tag 11:

Idem zu Tag 4, aber abschließende Färbung mit Trypanblau auf Vitalität.

3.3 RT-Messung von Versuch I und II (3.1.1 und 3.2.1)

- 1) Je 2 x 2µl Virusüberstand aus der Abnahmeplatte (insgesamt: 4µl) wurden pro well in 100µl Lyse Puffer (LP) bei Raumtemperatur (RTE) inkubiert (gesamt: 1: 50-Verdünnung).
- 2) 20µl des reaction mix (Template/Primer Hybrid und Nukleotide) wurden zu 40 µl aus der Verdünnungsplatte hinzugegeben (Volumen gesamt: 60µl) und für 1-15 h bei 37°C inkubiert.
- 3) Die 60µl wurden dann auf MTP wells transferiert und blieben dort für 1h bei 37°C.
- 4) Anschließend wurden die MTP wells 5 x mit Waschpuffer gewaschen.
- 5) 100µl Anti-DIG-POD (Konjugat) wurden auf MTP wells für 1h bei 37°C gegeben.
- 6) Anschließend wurde wieder 5 x mit Waschpuffer gewaschen.
- 7) Chemilumineszenzsubstrat wurde hinzugegeben (100:1) und die Messung mit dem Chemilumineszenz-Leser erfolgte nach ca. 3 min.

4 Ergebnisse

Zusätzlich zu den Ergebnissen wird auch die Dokumentation über die zum jeweiligen Abnahmezeitpunkt vorherrschende Zelldichte und -beschaffenheit präsentiert.

Die Daten zur vorherigen Toxizitätsprüfung mittels Trypanblau bei den neuen Replikationsinhibitoren sind unter 2.6 dargestellt.

4.1 Neue Replikationsinhibitoren bei chronisch infizierten Zellen

4.1.1 Uvaol (Substanz #1, PI) bei HIV-1/M

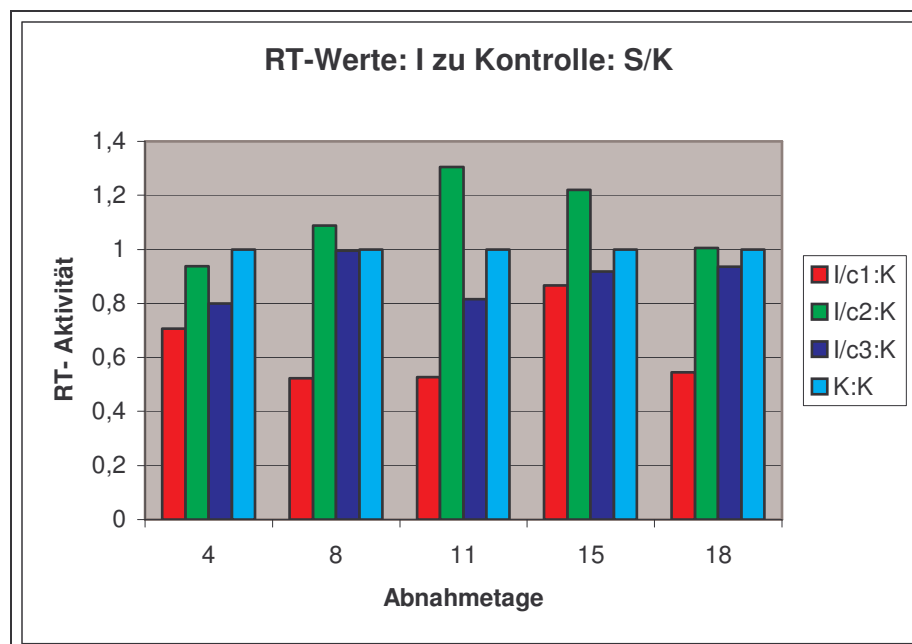


Abbildung 4.1: Ergebnis: Uvaol (Substanz #1, PI) bei HIV-1/M.

Zellbeschaffenheit:

An allen Abnahmetagen zeigte sich keine Toxizität bei [c1]-[c3]. Bei [c1] zeigte sich im Gegensatz zu [c2] und [c3] eine minimale Zellreduktion, ferner Riesenzellhaufenbildung in [c2] < [c3]. Am Tag 15 zeigte sich in [c1] eine minimale Riesenzellhaufenbildung, die am Tag 18 nicht mehr zu verifizieren war.

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung über die Gesamtdauer von 18 Tagen zeigte sich bei keiner Konzentration. Die RT-Aktivität sank bei [c1] um 36,6% (p-Wert: 0,0817), bei [c3] um 10,7% (p-Wert: 0,6416). Bei [c2] kam es anstatt einer Senkung zu einer Steigerung der RT-Aktivität.

4.1.2 Uvaol (Substanz #1, PI) bei HIV-1/O

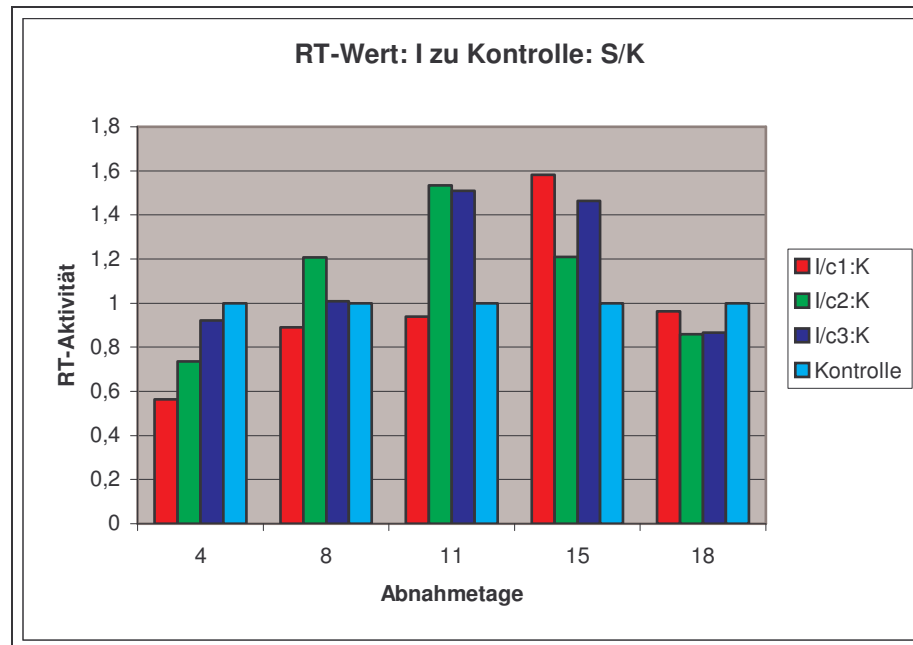


Abbildung 4.2: Ergebnis: Uvaol (Substanz #1, PI) bei HIV-1/O.

Zellbeschaffenheit:

Zu keinem Abnahmezeitpunkt war Toxizität in [c1]-[c3] nachweisbar. Ähnlich wie bei HIV-1/M zeigte sich in [c1] eine minimale Zellreduktion und keine Riesenzellhaufenbildung bis zum 11.Tag. Von diesem bis zum 18.Tag zeigten sich einige Zellhaufen in [c1]. In [c2] und [c3] herrschte Riesenzellhaufenbildung an allen Tagen vor. Sowohl bei HIV-1/M als auch bei HIV-1/O zeigten sich etwas mehr Riesenzellhaufen, aber auch eine minimal reduzierte Zellzahl.

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung fand sich bei keiner Konzentration. [c1] mit 1,3% (p-Wert: 0,8655). Bei [c2] und [c3] kam es zu keiner Senkung, sondern zu einer Boosterung der RT-Aktivität durch Uvaol bei HIV-0. RT-Steigerung bei [c2] um 10,9% (p-Wert: 0,6624) und bei [c3] um 15,4% (p-Wert: 0,5143).

4.1.3 Nandrolon (Substanz #3, PI) bei HIV-1/M

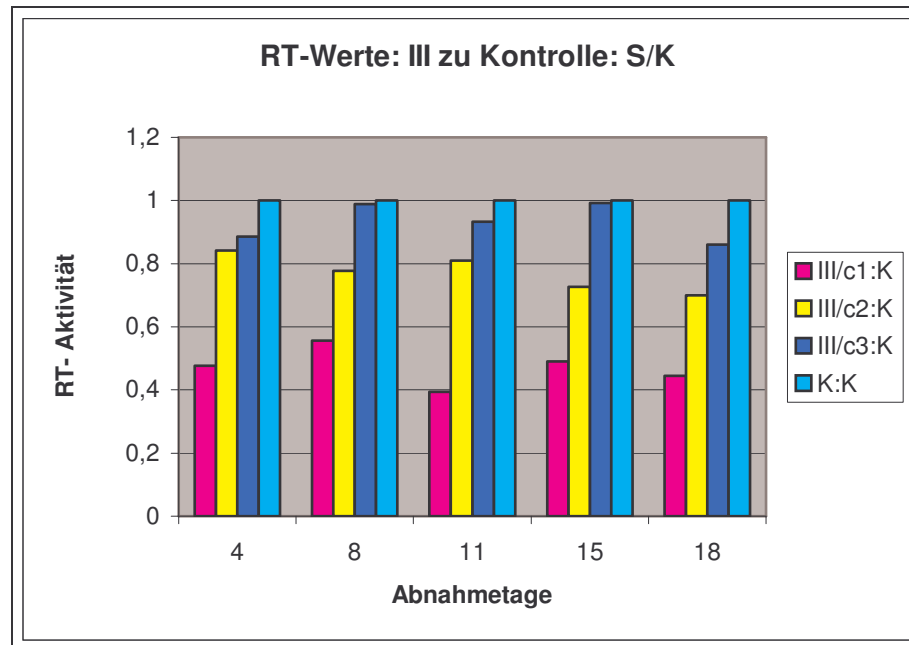


Abbildung 4.3: Ergebnis: Nandrolon (Substanz #3, PI) bei HIV-1/M.

Zellbeschaffenheit:

Zu keinem Abnahmezeitpunkt zeigte sich Toxizität. Am 8.Tag fand sich Riesenzellaufbildung in [c1]-[c3] ($[c1] < [c2] < [c3]$), wobei sich eine minimale Zellreduktion in [c1] ab dem 15.Tag zeigte.

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung zeigte sich nur bei [c1] mit 52,8% (p-Wert: 0,0006). Bei [c2] senkte sich die RT-Aktivität um 22,9% (p-Wert: 0,0943) und bei [c3] um 6,9% (p-Wert: 0,6333). Ebenfalls war eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu erkennen; die höchste Konzentration von Nandrolon korrelierte mit der größten RT-Aktivitätsminderung.

4.1.4 Nandrolon (Substanz #3, PI) bei HIV-1/O

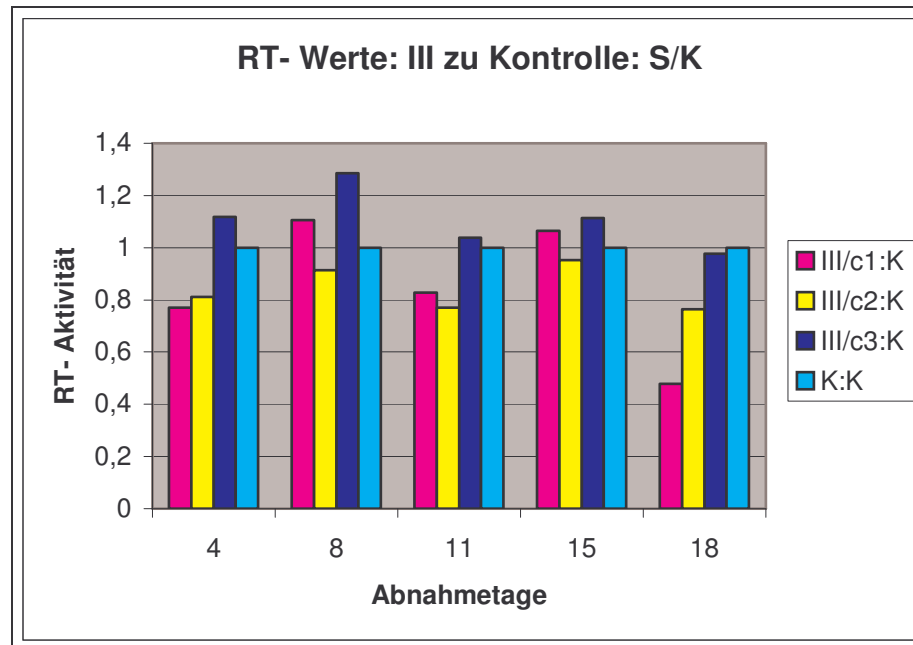


Abbildung 4.4: Ergebnis: Nandrolon (Substanz #3, PI) bei HIV-1/O.

Zellbeschaffenheit:

Zu keinem Zeitpunkt fand sich Toxizität. Riesenzellhaufenbildung zeigte sich in [c1]-[c3] ([c1]< [c2]< [c3]). Eine minimale Zellreduktion war in [c1] erkennbar.

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung über die Gesamtdauer von 18 Tagen zeigte sich bei keiner Konzentration. Nur am letzten Abnahmetag ließ sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen. Die RT-Aktivität sank bei [c1] um 15,1% (p-Wert: 0,3399), bei [c2] um 15,7% (p-Wert: 0,3705) und bei [c3] um 10,6% (p-Wert: 0,5992).

4.1.5 Coumermycin (Substanz #4, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/M

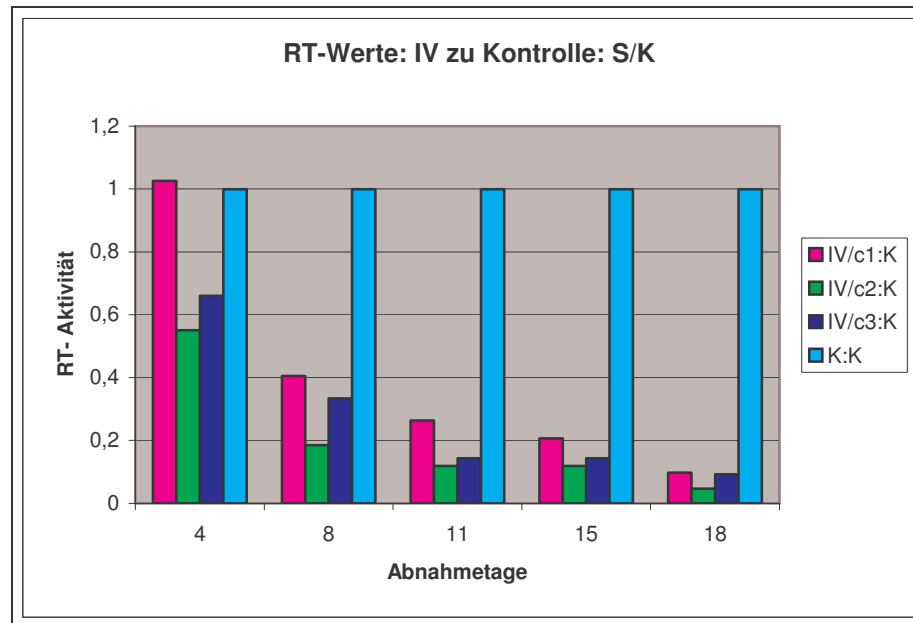


Abbildung 4.5: Ergebnis: Coumermycin (Substanz #4, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/M.

Zellbeschaffenheit:

Schon am Tag 4 zeigte sich Toxizität in [c1] und [c2]. In [c3] zeigte sich leichte Toxizität ab Tag 15. Riesenzellhaufen fanden sich in [c2] und [c3] ([c2] < [c3]).

Statistische Signifikanz:

Es zeigte sich eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung bei [c1]-[c3] mit einem p-Wert von <0,0001 ([c1]: 60%, [c2]: 79,5%, [c3]: 72,5%). Diese beruhte nicht auf Replikationshemmung des HI-Virus, sondern auf Zellsterben bedingt durch Toxizität von Coumermycin. Auch bei [c3] zeigt sich zum Schluss hin Toxizität.

4.1.6 Coumermycin (Substanz #4, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/O

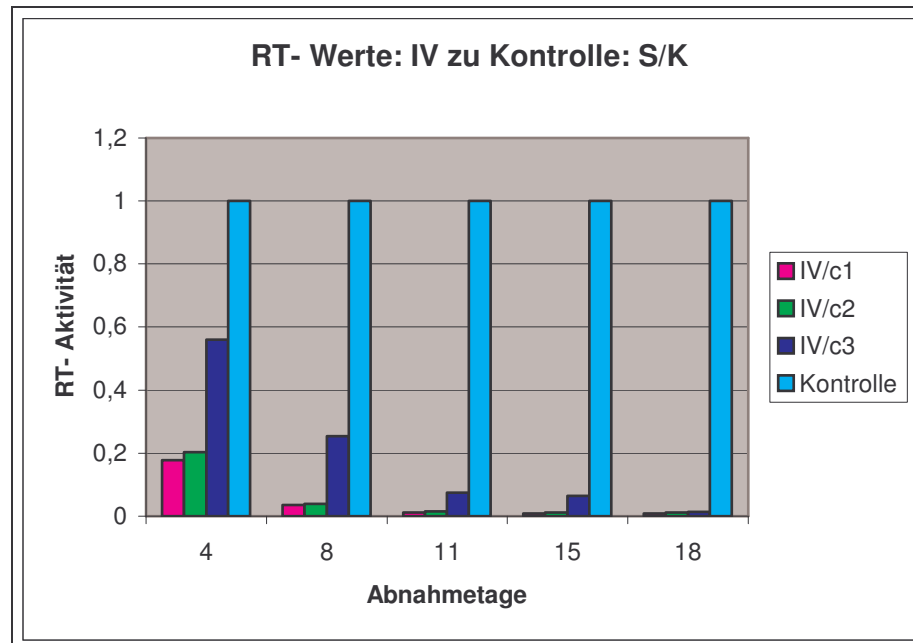


Abbildung 4.6: Ergebnis: Coumermycin (Substanz #4, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/O.

Zellbeschaffenheit:

Ebenfalls wie bei HIV-1/M zeigte sich auch hier schon am 4.Tag in [c1] und [c2] Toxizität. Größere Zellhaufen fanden sich in [c3], auch hier trat leichte Toxizität ab Tag 15 auf.

Statistische Signifikanz:

Die statistisch signifikante Minderung der RT-Aktivität bei [c1]-[c3] mit einem p-Wert von $<0,0001$ ([c1]: 95,1%, [c2]: 94,2%, [c3]: 80,6%) beruhte auf Toxizität und nicht auf Replikationshemmung.

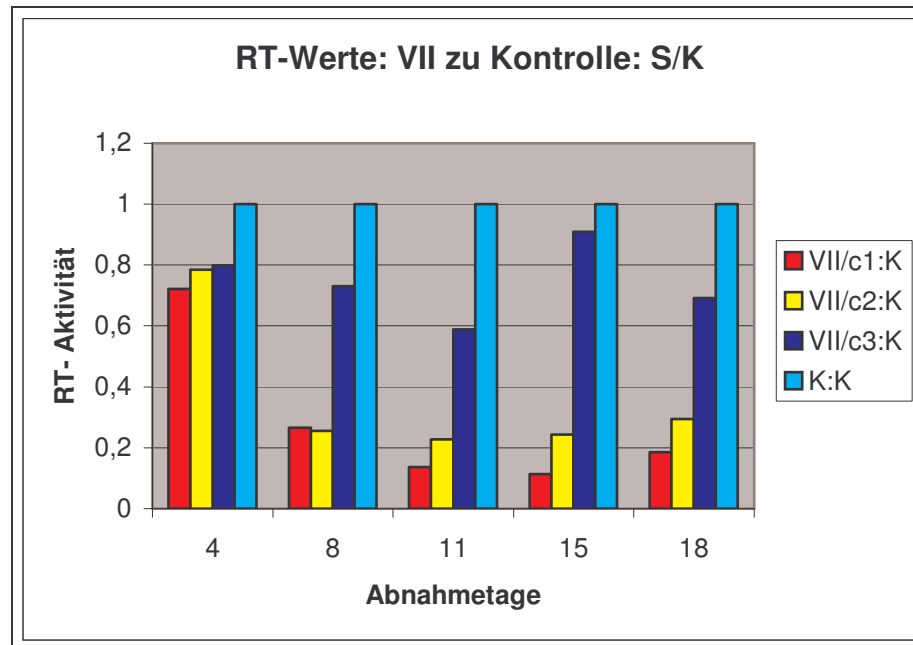
4.1.7 Nr. 1445896 (Substanz #7, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/M

Abbildung 4.7: Ergebnis: Nr. 1445896 (Substanz #7, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/M.

Zellbeschaffenheit:

Schon ab Tag 4 zeigte sich leichte Toxizität bei [c1]. Minimale Toxizität zeigte sich bei [c2] am Tag 15, bei [c3] fand sich keine Toxizität. Riesenzellhaufen fanden sich in [c2] < [c3].

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung fand sich nur bei [c1] mit 71,5% (p-Wert: <0,0001) und bei [c2] mit 63,8% (p-Wert: <0,0001). Bei [c3] kam es zur leichten, aber statistisch nicht signifikanten RT-Senkung um 25,6% (p-Wert: 0,1117). Bei [c1] beruhte die RT-Senkung auf Toxizität, bei [c2] auf Toxizität ab Tag 15, vorher auf Replikationshemmung, und bei [c3] nur auf Virus-Replikationshemmung.

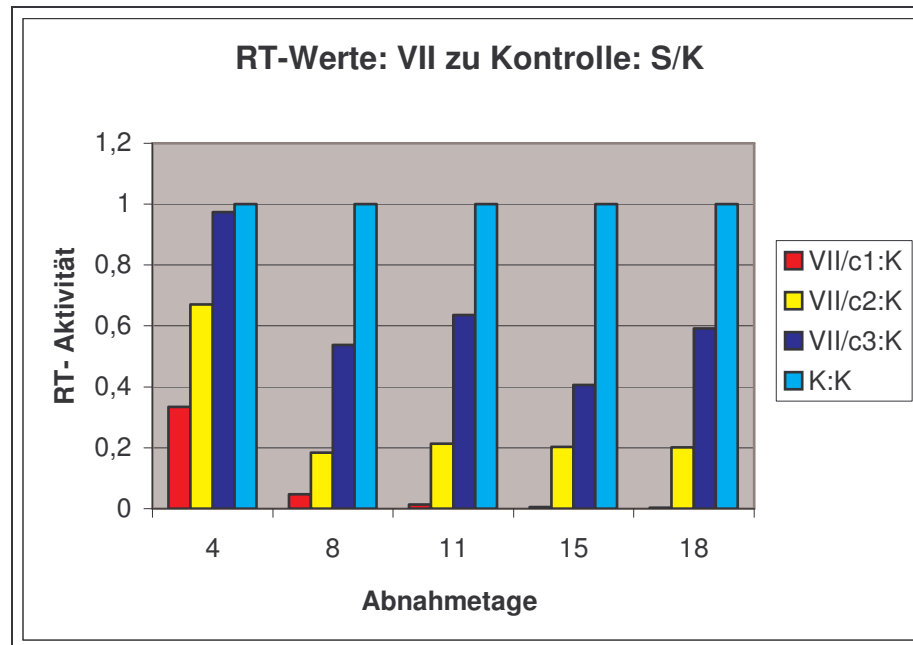
4.1.8 Nr. 1445896 (Substanz #7, Rev- Inhibitor) bei HIV-1/O

Abbildung 4.8: Ergebnis: Nr. 1445896 (Substanz #7, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/O.

Zellbeschaffenheit:

Ähnlich HIV-1/M zeigte sich bei [c1] auch Toxizität aber etwas stärker als bei HIV-1/M. Bei [c2] fand sich minimale Toxizität am Tag 15, bei [c3] keine. Riesenzellhaufen fanden sich in [c2] < [c3].

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Minderung zeigte sich bei [c1]-[c3] mit einem p-Wert von <0,0001 ([c1]: 92%, [c2]: 70,5%, [c3]: 37,1%). Bei [c1] beruhte die RT-Senkung auf Toxizität, bei [c2] auf Toxizität ab Tag 15, vorher auf Replikationshemmung, und bei [c3] nur auf Virus-Replikationshemmung.

4.2 RT-Inhibitoren bei chronisch infizierten Zellen

4.2.1 AZT bei HIV-1/M

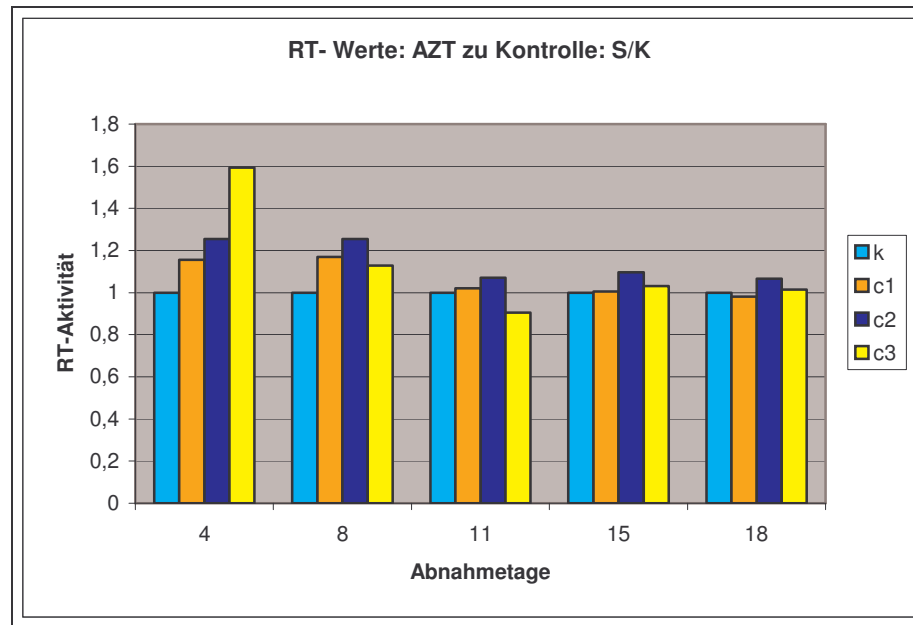


Abbildung 4.9: Ergebnis: AZT: HIV-1/M bei chron. infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

Zu keinem Abnahmezeitpunkt war Toxizität vorhanden. Bei allen Konzentrationen fanden sich Riesenzellhaufen. Bei den Kontrollen (HIV-1/M und HIV-1/O) zeigten sich mehr Riesenzellen als bei allen anderen Vertiefungen mit Inhibitoren, die Zellzahl war ab dem 4.Tag minimal reduziert.

Statistische Signifikanz :

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung über die Gesamtdauer von 18 Tagen zeigte sich bei keiner Konzentration. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung ließ sich nicht nachweisen. Steigerung der RT-Aktivität bei [c1] um 6,6% (p-Wert: 0,7581), bei [c2] um 14,8% (p-Wert: 0,3904) und bei [c3] um 13,4% (p-Wert: 0,6613).

4.2.2 AZT bei HIV-1/O

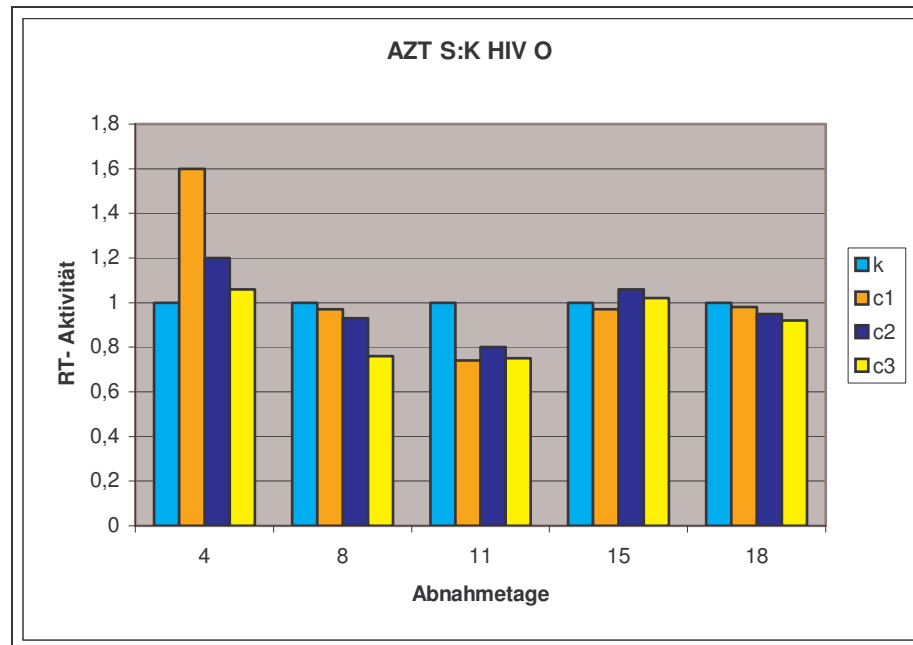


Abbildung 4.10: Ergebnis: AZT: HIV-1/O bei chron. infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

Keine Toxizität ließ sich an allen Abnahmezeitpunkten feststellen. [c1] bis [c3] hatten relativ gleiche Zellzahl und auch Riesenzellhaufen.

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung über die Gesamtdauer von 18 Tagen zeigte sich bei keiner Konzentration. Zunahme der RT-Aktivität, [c1]: 5,2% (p-Wert: 0,8752), [c2]: 1,2% (p-Wert: 0,8787) und [c3] 9,8% (p-Wert:0,64). Eine Dosis-Wirkungsbeziehung ließ sich nicht nachweisen.

4.2.3 DDC bei HIV-1/M

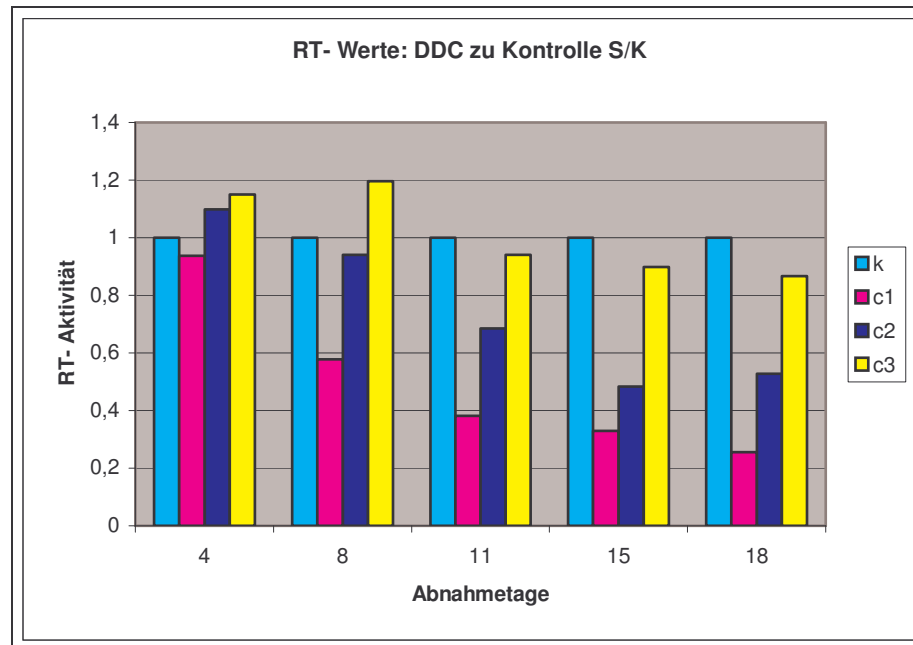


Abbildung 4.11: Ergebnis: DDC: HIV-1/M bei chron. infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

Toxizität war zu keinem Zeitpunkt vorhanden. [c1] zeigte im Gegensatz zu [c2] und [c3] kleinere Riesenzellhaufen und eine minimale Zellreduktion.

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung über die Gesamtdauer von 18 Tagen zeigte sich bei [c1] mit einem p-Wert von $<0,0001$ (50,4%) und bei [c2] mit einem p-Wert von 0,0041 (25,3%). Bei [c3] kam es zu einer minimalen RT-Steigerung von 1% (p-Wert: 0,8087). Eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung ließ sich erkennen.

4.2.4 DDC bei HIV-1/O

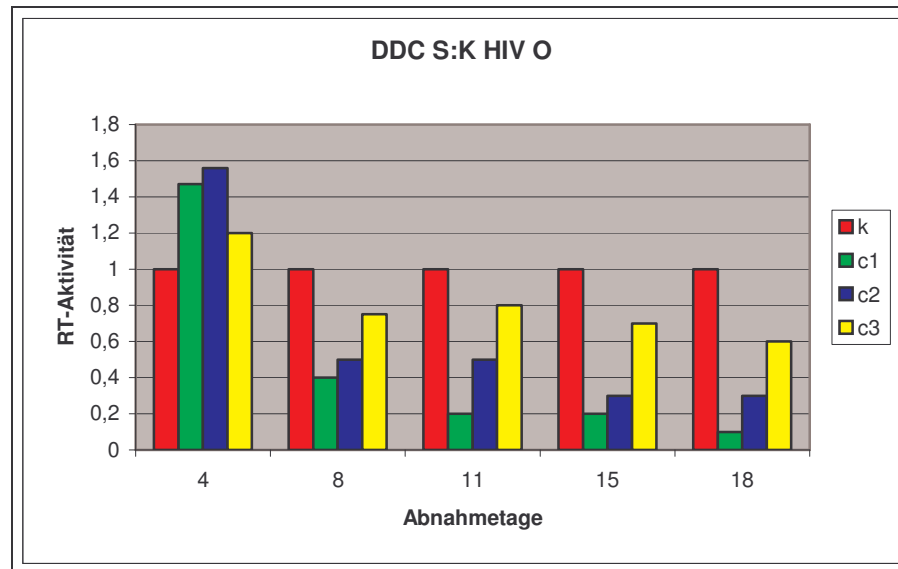


Abbildung 4.12: Ergebnis: DDC: HIV-1/O bei chron. infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

Bei DDC fanden sich im Gegensatz zu AZT weniger Riesenzellhaufen. Bei [c1]-[c3] fanden sich gleiche Zellzahl und -haufen.

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung über die Gesamtdauer von 18 Tagen zeigte sich bei [c1] (52,6%) und [c2] (36,8%) mit einem p-Wert von $<0,0001$. Die RT-Senkung bei [c3] betrug 19% (p-Wert: 0,0483). Eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung ließ sich ab Tag 8 erkennen.

4.2.5 DDI bei HIV-1/M

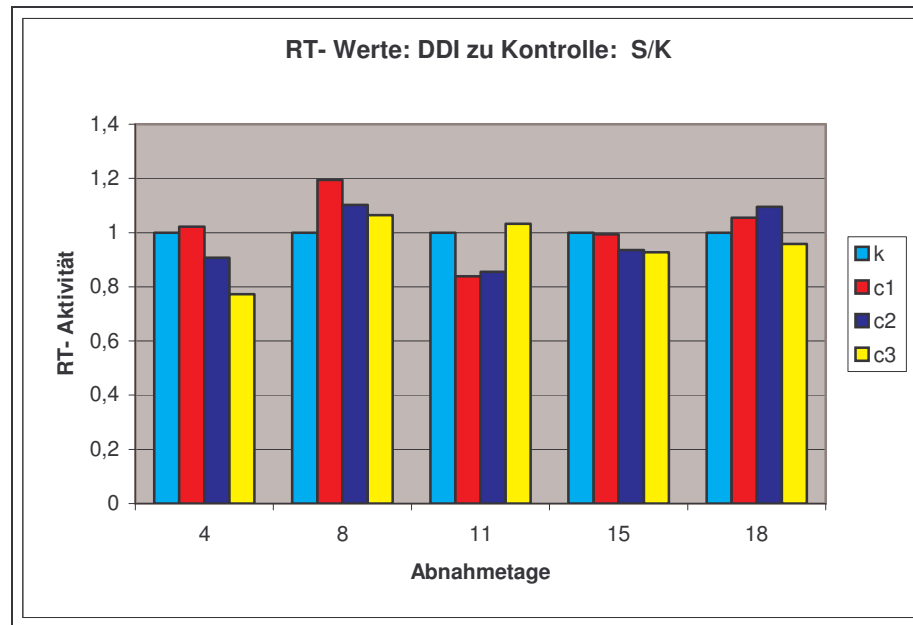


Abbildung 4.13: Ergebnis: DDI: HIV-1/M bei chron. infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

An allen Abnahmetagen ließ sich keine Toxizität feststellen, Zellzahl und Riesenzellhaufen fanden sich in [c1] bis [c3] in gleichem Maße.

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung über die Gesamtdauer von 18 Tagen zeigte sich bei keiner Konzentration. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung ließ sich nicht nachweisen. Leichte RT-Steigerung bei [c1] mit 2% (p-Wert: 0,9296), minimale RT-Senkung bei [c2] mit 2% (p-Wert: 0,9441) und bei [c3] mit 4,9% (p-Wert: 0,8565).

4.2.6 DDI bei HIV-1/O

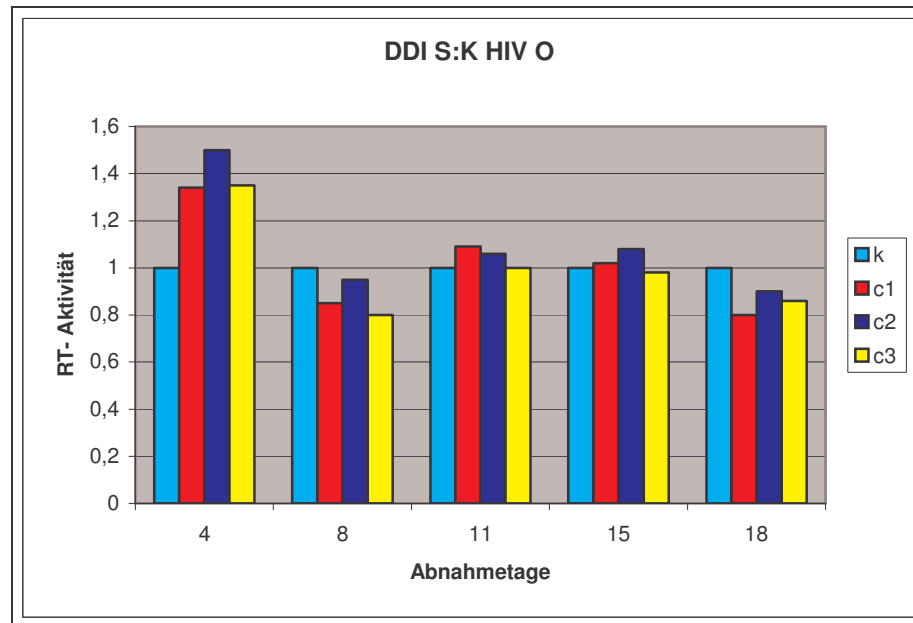


Abbildung 4.14: Ergebnis: DDI: HIV-1/O bei chron. infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

Zu allen Abnahmezeitpunkten fand sich keine Toxizität; [c1]-[c3] zeigten gleiche Zellzahl und Riesenzellhaufen.

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung über die Gesamtdauer von 18 Tagen zeigte sich bei keiner Konzentration. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung ließ sich nicht nachweisen. RT-Steigerung bei [c1] mit 2% (p-Wert: 0,7325) und bei [c2] mit 9,8% (p-Wert: 0,9030). Minimale RT-Senkung bei [c3] mit 0,2% (p-Wert: 0,6995).

4.2.7 NVP bei HIV-1/M

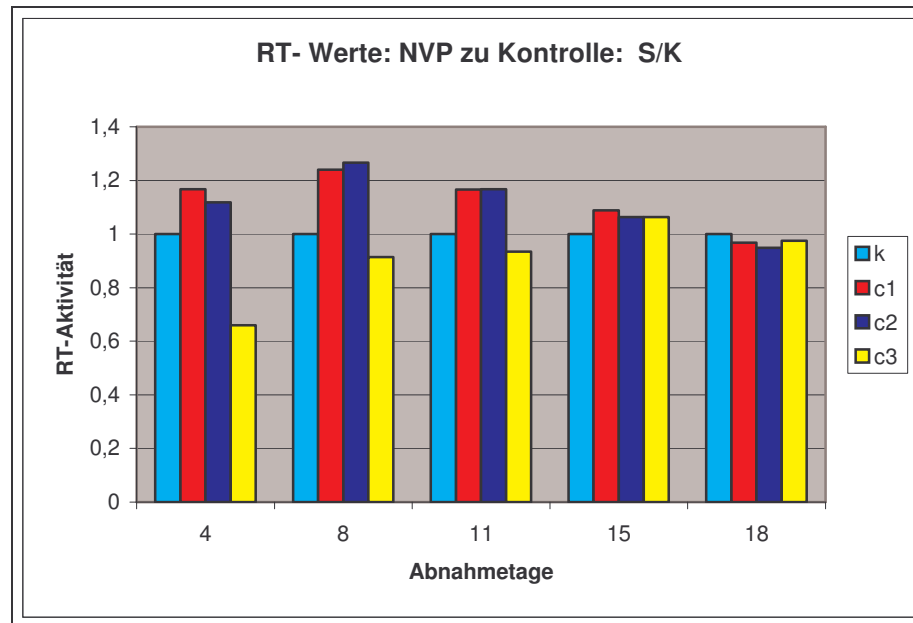


Abbildung 4.15: Ergebnis: NVP: HIV-1/M bei chron. infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

Es bestand zu keinem Abnahmezeitpunkt Toxizität; Zellzahl und Riesenzellhaufen waren in [c1]-[c3] in gleichem Maße vorhanden.

Statistische Signifikanz:

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung über die Gesamtdauer von 18 Tagen zeigte sich bei keiner Konzentration. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung ließ sich nicht erkennen. RT-Senkung bei [c3] mit 9% (p-Wert: 0,7716), RT-Steigerung bei [c1] mit 12,5% (p-Wert: 0,5241) und bei [c2] mit 11,3% (p-Wert: 0,5646).

4.2.8 NVP bei HIV-1/O

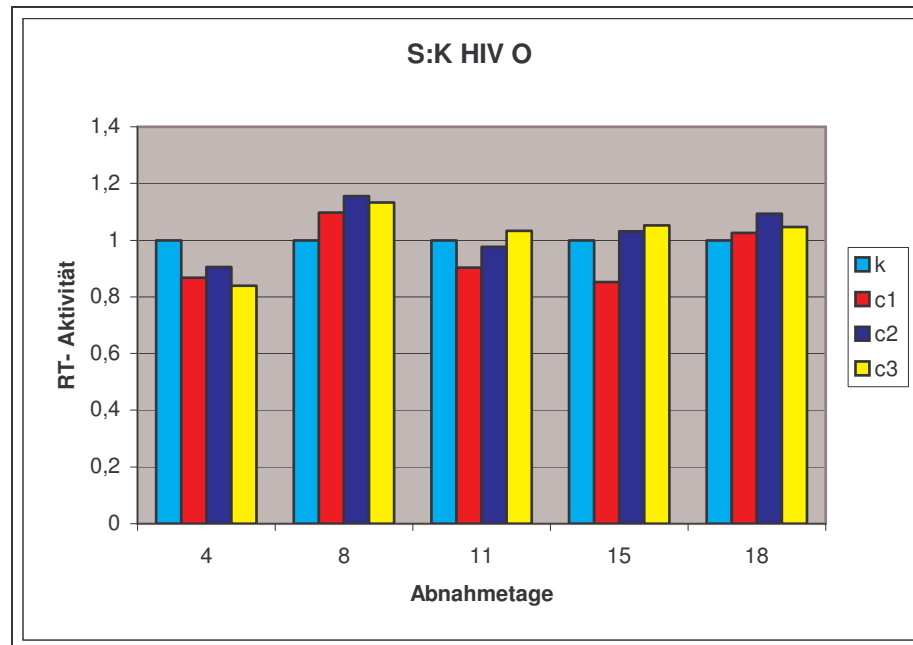


Abbildung 4.16: Ergebnis: NVP: HIV-1/O bei chron. infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

An keinem Abnahmezeitpunkt ließ sich Toxizität erkennen; Zellzahl und Riesenzellhaufen waren in allen drei Konzentrationen gleich vorhanden.

Statistische Signifikanz

Eine statistisch signifikante RT-Aktivitätsminderung über die Gesamtdauer von 18 Tagen zeigte sich bei keiner Konzentration. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung ließ sich nicht nachweisen. RT-Senkung bei [c1] mit 5,1% (p-Wert: 0,3120), RT-Steigerung bei [c2] mit 3,2% (p-Wert: 0,5393) und bei [c3] mit 2% (p-Wert: 0,6639).

4.3 RT-Inhibitoren bei frisch infizierten HUT 78-Zellen

4.3.1 AZT bei HIV-1/M

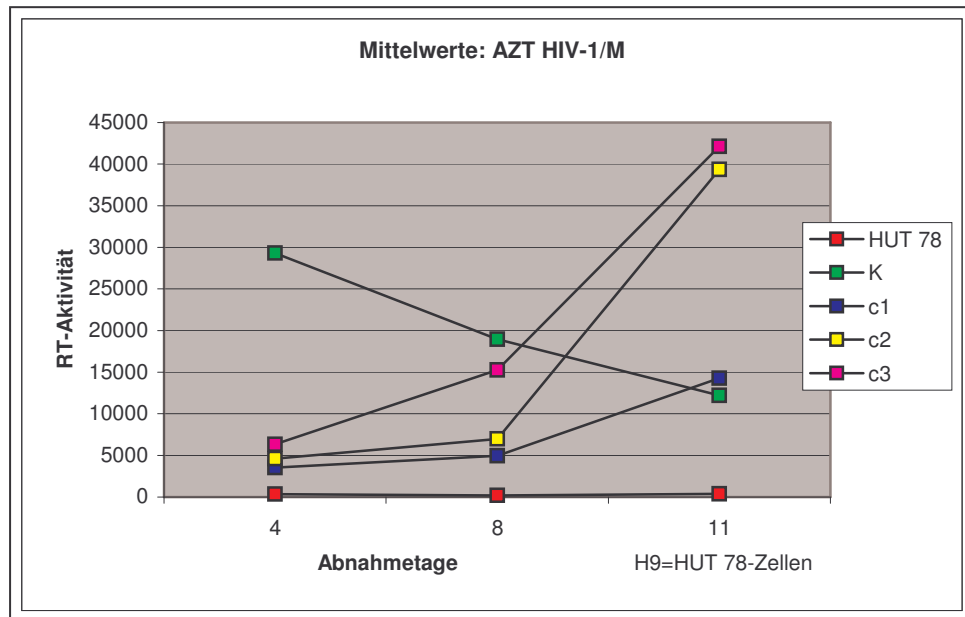


Abbildung 4.17: Ergebnis: AZT: HIV-1/M bei frisch infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

An allen Abnahmetagen war keine Toxizität erkennbar. Ab Tag 8 waren Riesenzellen vorhanden ($[c1] < [c2] < [c3]$), die am Tag 11 nur noch in $[c2]$ und $[c3]$ ($[c2] < [c3]$) nachweisbar waren. Die Kontrollen zeigten ab Tag 8 Riesenzellen, die an Tag 11 kaum noch vorhanden waren und eine minimal reduzierte Zellzahl im Gegensatz zu AZT, DDI und NVP.

Statistische Signifikanz:

An den Tagen 4, 8 und 11 kam es zu einem protrahierten Anstieg der RT-Aktivität mit einer Dosis-Wirkungsbeziehung ($[c1]$ = höchste AZT-Konzentration korrelierte mit langsamsten

RT-Anstieg). Die RT-Aktivitätssenkung an Tag 4 von [c1] betrug 88%, von [c2] 84% und die von [c3] 78% (alle Konzentrationen mit einem p-Wert von 0,0002). An Tag 8 betrug die RT-Aktivitätssenkung von [c1] nur noch 73% (p-Wert: 0,3855), von [c2] 63,1% (p-Wert: 0.5219) und die von [c3] 19,3% (p-Wert: 0,6299). An Tag 11 kam es zu einer RT-Aktivitätssteigerung bei [c1] von 16%, bei [c2] von 225,5% und bei [c3] von 245.2%.

4.3.2 DDI bei HIV-1/M

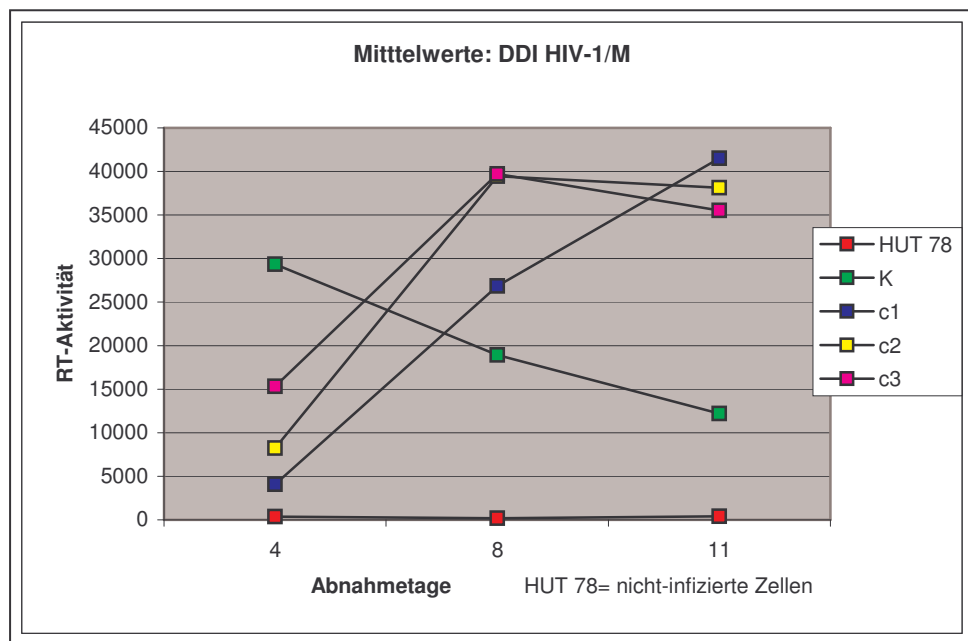


Abbildung 4.18: Ergebnis: DDI: HIV-1/M bei frisch infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

Keine Toxizität war nachweisbar. Ab Tag 8 waren Riesenzellen vorhanden, wobei $[c1] < [c3] < [c2]$. Am Tag 11 ließen sich Riesenzellen in [c1] und [c3] erkennen, in [c2] waren nur sehr wenige vorhanden. Die Zellzahl verhielt sich bei [c1]-[c3] gleich.

Statistische Signifikanz :

Es zeigte sich ein RT-Anstieg mit Dosis-Wirkungsbeziehung ($[c1] < [c2] < [c3]$) bis Tag 8. An Tag 11 hatte $[c1]$ den größten RT-Anstieg, während die RT-Aktivität in $[c2]$ und $[c3]$ wieder rückläufig war. An Tag 4 zeigte sich eine RT-Aktivitätssenkung gegenüber der Kontrolle bei $[c1]$ mit 86% (p-Wert: 0,007), bei $[c2]$ mit 71,9% (p-Wert:0,0014) und bei $[c3]$ mit 47,6% (p-Wert: 0,0066). An Tag 8 ließ sich eine RT-Steigerung bei $[c1]$ um 41.6%, bei $[c2]$ um 108% und bei $[c3]$ um 109% erkennen. An Tag 11 zeigte sich eine RT-Steigerung bei $[c1]$ von 240%, bei $[c2]$ von 212% und bei $[c3]$ von 190%.

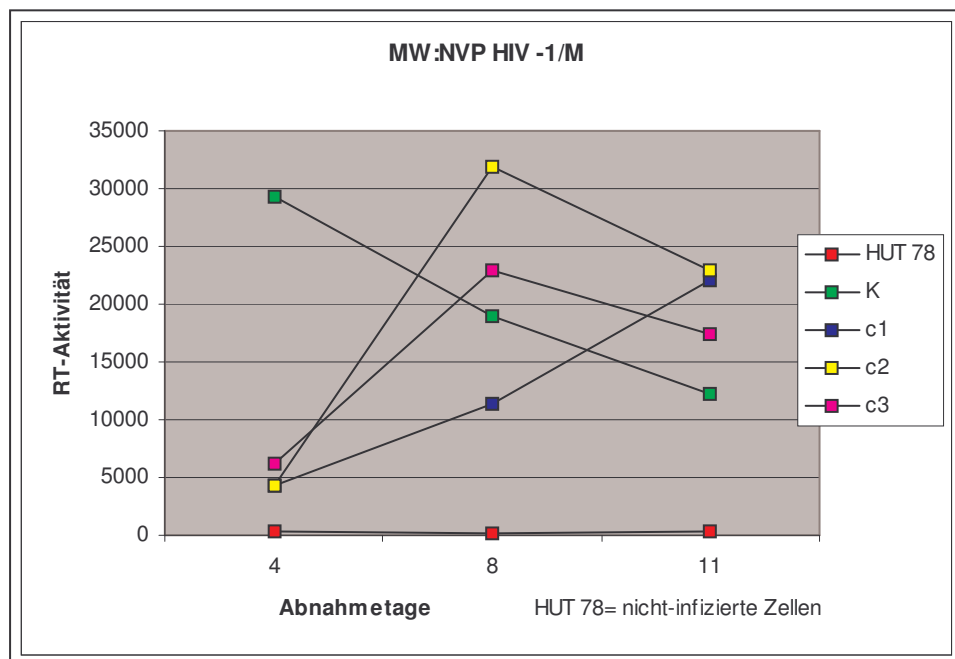
4.3.3 NVP bei HIV-1/M

Abbildung 4.19: Ergebnis: NVP: HIV-1/M bei frisch infizierten Zellen.

Zellbeschaffenheit:

Keine Toxizität ließ sich erkennen. Riesenzellen waren ab Tag 8 erkennbar vor allem in [c3]. An Tag 11 waren in [c1] kaum noch welche zu erkennen und in [c3] waren sie im Gegensatz zu Tag 8 sehr reduziert.

Statistische Signifikanz:

Ab Tag 8 zeigte sich eine deutliche RT-Steigung, wobei sich keine Dosis-Wirkungsbeziehung feststellen ließ, da [c2]> [c3]> [c1]. An Tag 11 kam es zum Absinken der RT-Aktivität bei [c2]> [c3]. [c1] zeigte den langsamsten RT-Anstieg bis Tag 11. An Tag 4 ließ sich eine RT-Senkung gegenüber der Kontrolle erkennen bei [c1] mit 85,1 % (p-Wert: 0,0002), bei [c2] mit 85,3% (p-Wert: 0,0002) und bei [c3] mit 79% (p-Wert: 0,0003). An Tag 8 zeigte [c1] gegenüber der Kontrolle immer noch eine leichte RT-Senkung mit 40,3%, während es bei [c2] mit 68,5% und bei [c3] mit 21% zu einer Steigerung kam. An Tag 11 betrug die RT-Steigerung bei [c1] 80,8%, bei [c2] 88,4% und bei [c3] 43,3%.

5 Diskussion

Als 1987 AZT als erstes antiretrovirales Medikament die Zulassung zur Behandlung von HIV-Infektionen in Deutschland erlangte, war dies ein erster, wenn auch bescheidener Erfolg (Volberding *et al.* 1990, Fischl *et al.* 1990 und 1987). Monotherapien führten jedoch nach einiger Zeit zur Resistenzentwicklung und damit verbundenem Therapieversagen (Marx 1989, Larder *et al.* 1989, Van Vaerenbergh *et al.* 2002). Inzwischen stehen in Deutschland wesentlich mehr Wirkstoffe zu Verfügung, die seit der Zulassung der Proteaseinhibitoren 1996 in Kombinationstherapien (HAART) eingesetzt werden (Deeks *et al.* 1997, Eberle *et al.* 1995, Eron *et al.* 2000, Somadossi 1999).

Trotz der durch HAART erreichten länger andauernden Senkung der Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze kommerzieller Testsysteme (Viruslast < 50 Kopien/ml), kommt es zur Selektion resistenter Virusvarianten. Diese kommen durch Mutationen in den Zielenzymen Reverse Transkriptase und Protease gegenüber den Wildtypvarianten zustande. Die Übertragung solcher resistenter Viren ist aus epidemiologischer Sicht sehr ungünstig. Allerdings sei kurz bemerkt, dass die Entwicklung der Resistenz zum Teil auf Kosten der viralen Fitness, also der Fähigkeit in einer Umgebung zu replizieren, stattfindet (Nijhuis *et al.* 2001 und 1999). Übertragungsraten primärresistenter Viren wurden auch in anderen europäischen Ländern und den USA beobachtet (Boden *et al.* 1999, Briones *et al.* 2001, Little *et al.* 1999, Wegner *et al.* 2000). Umso wichtiger ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe, da auch bei guter Compliance des Patienten und regelmäßiger Medikamenteneinnahme nach unterschiedlich langer Zeit mit Resistenzen zu rechnen ist. In der Zwischenzeit wird nicht nur an neuen Reverse Transkriptase- und Proteaseinhibitoren, die auf die zwei "klassischen Zielenzyme" abzielen, geforscht. Es wird nach anderen Wirkstoffklassen und Angriffspunkten (1.12.4) gesucht wie zum Beispiel den in dieser Arbeit verwendeten REV-Inhibitor, der durch das SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) -Verfahren hergestellt wurde, und sogenannten "small molecules", die ebenfalls in der Lage sind, die HIV-Replikation zu blockieren.

5.1 Vergleich neuer Replikationsinhibitoren bei chronisch infizierten HUT 78-Zellen

In den letzten Jahren haben Aptamere und sogenannte “small molecules“ zunehmend an Bedeutung gewonnen. Durch das SELEX-Verfahren hergestellte Inhibitoren konnten teilweise zum Beispiel im Bereich der viralen Expression (Held *et al.* 2006) und der Reversen Transkriptase (Joshi *et al.* 2002 und 2005) auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Allerdings wurden bei Joshi *et al.* Jurkat T-Zellen verwendet, die verschiedene RT-Inhibitoren exprimierten und anschließend mit HIV-1/M infiziert wurden. Hier kam es zur Blockierung der HI-Viren.

Bei Substanz #1 (Uvaol, PI) konnte bei HIV-1/M weder eine signifikante RT-Minderung, noch eine Dosis-Wirkungsbeziehung eindeutig festgestellt werden. Die RT-Aktivität bei der höchsten Konzentration [c1] von Uvaol mit 35 μM sank zwar um 36,6%, aber nicht genug, um eine statistische Signifikanz zu verifizieren. Während der gesamten Abnahmezeit war jedoch keinerlei Toxizität zu verzeichnen, so dass mit einer höheren Konzentration eventuell eine stärkere RT-Senkung bei erhaltener Zellvitalität zu erreichen wäre. Ebenso verhielt es sich mit Uvoal bei HIV-1/O. Auch hier fand keine eindeutige RT-Senkung oder eine Dosis-Wirkungsbeziehung während der gesamten 18 Tage statt. Bei der höchsten Konzentration [c1] im Versuch mit HIV-1/M zeigte sich im Vergleich zu HIV-1/O eine deutlich größere Senkung der Viruslast. Bei der mittleren Konzentration [c2] bei HIV-1/M und HIV-0 und bei der niedrigsten Konzentration [c3] bei HIV-1/O zeigte sich sogar eine Boosterung der RT-Aktivität. Die Konzentration [c3] bei HIV-1/M hingegen zeigte eine nicht signifikante Senkung der Viruslast. Zusammenfassend zeigte Uvaol eine bessere Wirkung auf HIV-1/M als auf HIV-1/O. Auch bei der Forschungsgruppe von Min konnte eine Wirksamkeit von Uvaol in infizierten Zellen gezeigt werden (Min *et al.* 1999).

Bei Substanz #3 (Nandrolon, PI) konnte eine statistisch signifikante Viruslastsenkung und eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung verifiziert werden.

Die höchste Konzentration [c1] von Nandrolon mit 10 μM bei HIV-1/M erreichte eine Viruslastsenkung von 52,8%. Die beobachtete Replikationshemmung war somit statistisch signifikant. Ebenfalls kam es zu einer RT-Minderung bei der mittleren [c2] und der geringsten [c3] Konzentration, jedoch nicht statistisch signifikant. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung ließ sich bei HIV-1/O nicht beobachten. Ebenfalls konnte keine statistisch signifikante RT-

Senkung gezeigt werden. Zusammenfassend zeigte Nandrolon bei HIV-1/M im Vergleich zu HIV-1/O eine deutlich bessere Wirkung. Bei einer Suche in „PubMed“ mit den Stichworten "Nandrolon - HIV - Viruslastsenkung" in unterschiedlichen Kombinationen, konnten keine Veröffentlichungen gefunden werden, die Nandrolon mit einer Viruslastsenkung in Kausalzusammenhang bringen. Nandrolon wird bisher nur im Zusammenhang mit der Behandlung des Wasting Syndroms erwähnt, bei dem Nandrolon zum Muskelaufbau bzw. zur Gewichtszunahme eingesetzt wird.

Bei Substanz #4 (Coumermycin, Rev-Inhibitor) ließ sich bei HIV-1/M und HIV-1/O eine signifikante Viruslastsenkung feststellen. Diese beruhte jedoch bei den beiden höheren Konzentrationen, [c1] und [c2], auf Zellsterben bedingt durch die Toxizität des Inhibitors.

Bei der niedrigsten Konzentration [c3] mit $2,3\mu\text{M}$ bei HIV-1/M ließ sich erst ab dem 15.Tag ein Zellsterben verzeichnen. Somit ist eine Viruslastsenkung hier vermutlich auf die Wirksamkeit der Substanz zurückzuführen. Ähnlich verhielt es sich bei HIV-1/O. Zusammenfassend zeigte sich eine stärkere RT-Minderung bei HIV-1/O im Gegensatz zu HIV-1/M, insbesondere bei [c3]. Eine Wirksamkeit von Coumermycin konnte schon von der Gruppe um Famulok (Famulok und Mayer 1999) gezeigt werden. Hier traten Zeichen für Toxizität ab einem Konzentrationsbereich von $7\mu\text{M}$ bei frisch infizierten Zellen auf. In unseren Versuchen konnten Toxizitäten für Coumermycin schon unter $7\mu\text{M}$ gezeigt werden. Zusammenfassend ist eine Wirkung von Coumermycin auf die HIV-Replikation generell sowohl bei frisch als auch bei chronisch infizierten Zellen zu beobachten, bei allerdings eingeschränkter Beurteilbarkeit wegen der Toxizität (Hartig *et al.* 2002, Jardin *et al.* 1993).

Bei Substanz #7 (Nr.1445896, Rev-Inhibitor) ließ sich ähnlich zu Substanz #4 bei HIV-1/M und HIV-1/O eine signifikante Viruslastsenkung feststellen. Hierbei handelte es sich aber um Zellsterben bedingt durch die Toxizität des Inhibitors, außer bei der niedrigsten Konzentration [c3]. Allerdings war die durch [c3] erreichte RT-Minderung nicht statistisch signifikant. Auch bei diesem Rev-Inhibitor konnte zusammenfassend eine bessere Wirksamkeit bei HIV-1/O im Gegensatz zu HIV-1/M beobachtet werden. Weitere Messungen mit feinerer Abstufung des Konzentrationsbereichs von $5-7\mu\text{M}$, um den Wirkungs- und Toxizitätsbereich genauer einzugrenzen, könnten mehr Aufschluss geben.

5.2 Vergleich RT-Inhibitoren bei chronisch infizierten HUT 78-Zellen

Von RT-Inhibitoren kann im Allgemeinen angenommen werden, dass sie vermutlich im frühen Teil des Replikationsablaufs des HI-Virus wirken, nämlich nach der Fusion des Virions mit der Zellmembran. Danach muss die virale RNA durch die Reverse Transkriptase in die doppelsträngige, provirale DNA übersetzt werden. RT-Inhibitoren sollten also bei chronisch infizierten Zellen wenn überhaupt, dann nur verzögert eine Wirksamkeit zeigen. Im Unterschied dazu können REV- und Protease-Inhibitoren erst nach der Integration des Provirus wirksam werden. Daher kann ihre Wirkung an der Reduktion der Virusneuproduktion gemessen werden. Zur Bestätigung dieser Annahme und als Kontrolle für das prinzipielle Funktionsprinzip des gewählten Versuchsansatzes wurde dieser Teil der Arbeit durchgeführt.

Die Wirkung von AZT (Azidothymidin) auf HIV wurde 1985 bewiesen (Mitsuya *et al.* 1985). Die orale Verfügbarkeit lag bei ca. 66% (Klecker *et al.* 1987). In der aktuellen Fachinformation wird der Plasmaspitzen Spiegel mit 4,5µM und der Talspiegel mit 0,4µM angegeben. In dieser Arbeit ließ sich mit AZT-Konzentrationen von 1µM bis maximal 10µM bei chronisch infizierten Zellen sowohl bei HIV-1/M als auch bei HIV-1/O keine statistisch signifikante Viruslastsenkung zeigen. Ebenfalls konnte keine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung gezeigt werden. Bei frisch infizierten Zellen hingegen konnte die Wirksamkeit von AZT, DDC und DDI schon 1995 belegt werden (Iversen *et al.* 1995).

DDC (Dideoxycytidin) bei HIV-1/M bewirkte zu keinem Abnahmezeitpunkt eine Toxizität, ebenso bei HIV-1/O. Im Gegensatz zu AZT war eine statistisch signifikante Viruslastsenkung zu verzeichnen. Diese stärkere Potenz von DDC gegenüber AZT konnte 1986 gezeigt werden (Broder *et al.* 1986). Die orale Bioverfügbarkeit von DDC lag bei 86% (Yarchoan *et al.* 1988). Die durchschnittliche Plasmaspitzenkonzentration wird in der aktuellen Fachinformation mit 252 ng/ml, also mit 0,12µM angegeben. Allerdings wurde DDC wegen der starken Nebenwirkungen wie Polyneuropathien kaum noch eingesetzt und wurde Ende 2006 vom Markt genommen. In dieser Arbeit zeigte sich bei HIV-1/M sowohl bei der höchsten Konzentration [c1], also 10µM, eine RT-Senkung von 50,4% und bei [c2] mit 3µM eine RT-Senkung um 25,3%. Ebenfalls war über die gesamte Zeit eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung zu verzeichnen. Bei HIV-1/O kam es sogar zu einer stärkeren Viruslastsenkung bei [c1] mit 52,6% und [c2] mit 36,8% als bei HIV-1/M. Bei der niedrigsten

Konzentration [c3] von 1µM zeigte sich bei HIV-1/M eine minimale RT-Steigerung über den gesamten Abnahmeverlauf, bei [c3] bei HIV-1/O kam es aber zu einer RT-Senkung von 19%. Auch bei HIV-1/O war eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu verzeichnen.

Als unerwartet muss der Wirkungszeitpunkt von DDC auf chronisch infizierte Zellen gewertet werden. Der dieser Beobachtung zugrunde liegende Wirkmechanismus von DDC ist bisher nicht bekannt. Die NRTI-Triphosphate sind nicht nur in der Lage, die HIV-Reverse Transkriptase zu inhibieren, sondern auch gamma- und beta-DNA-Polymerasen (Cherrington *et al.* 1994). Die höchste Affinität zu diesen Reparaturenzymen weist DDCTP-Triphosphat mit K_i -Werten von 0,031µM bis 1,32µM für die gamma- und beta-DNA-Polymerasen auf. Demzufolge kann spekuliert werden, dass DDC entweder im Zellkern (beta-Polymerase) oder in den Mitochondrien (gamma-Polymerase) wirkt und ohne schon nach kurzer Zeit sichtbare Zytotoxizität hervor zu rufen, die Virusfreisetzung hemmt. Die Interaktion von DDC mit der gamma-DNA-Polymerase in den Mitochondrien spiegelt sich im Nebenwirkungsspektrum dieser Substanz wieder, z.B. in Laktatazidosen (Walker *et al.* 2002).

Bei DDI (Dideoxyinosin) war über die gesamte Abnahmedauer bei HIV-1/M und HIV-1/O keine Toxizität zu verzeichnen. Es zeigte sich aber keine statistisch signifikante Viruslastsenkung sowie eine Dosis-Wirkungsbeziehung. Es kam teilweise zu einem Anstieg der Viruslast. Eine minimale RT-Senkung war bei [c3] mit 1µM bei HIV-1/O und bei [c2] mit 3µM und [c3] bei HIV-1/M zu verzeichnen. Die durchschnittliche Plasmaspitzenkonzentration wird in der aktuellen Fachinformation mit 933 ng/ml, also mit ca. 4µM angegeben.

NVP (Nevirapin) ließ wie AZT und DDI bei HIV-1/M und HIV-1/O keine eindeutige Viruslastsenkung oder eine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen. Eine minimal stärkere RT-Senkung war bei HIV-1/M zu verifizieren. Nevirapin wurde erstmals von Merluzzi beschrieben (Merluzzi *et al.* 1990). Die durchschnittliche Plasmaspitzenkonzentration wird in der aktuellen Fachinformation mit 7,5µM angegeben.

Zusammenfassend entsprechen die Ergebnisse von AZT, DDI und NVP dem angenommenen Wirkprinzip auf die Reverse Transkription. Sind die Zellen schon infiziert, so werden sie auch unter RT-Inhibition weiterhin Virus produzieren können, da die virale DNA-Polymerase nicht gehemmt wird. Nur die Neuinfektion von Zellen beim Ersatz abgestorbener Zellen dürfte

durch nukleosidische (NRTI) und nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren (NNRTI) behindert werden. Um das zu Bestätigen müsste aber der Virusausstoß über eine wesentlich längere Zeit verfolgt werden.

Etwas überraschend war die DDC-Wirkung bei chronisch infizierten Zellen. Es konnte eine statistisch belegbare Wirkung gezeigt werden, die für beide getesteten Virusisolate eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung aufwies.

5.3 Vergleich RT-Inhibitoren bei frisch infizierten HUT 78-Zellen

RT-Inhibitoren wirken im frühen Anteil des Infektionszyklus des HI-Virus. Aus diesem Grunde wurde der Versuchsaufbau wie in Kapitel 3 beschrieben gewählt. Es wurde somit der langsame, prothrahierte Anstieg der Viruslast beobachtet.

AZT verzögerte die Infektion mit HIV-1/M dosisabhängig bis zu Tag 11. Toxizität war während des gesamten Abnahmezeitraumes nicht zu verzeichnen. Bei der höchsten Konzentration [c1] kam es zum langsameren Anstieg der RT-Aktivität als bei [c2] Die niedrigste Konzentration [c3] zeigte den schnellsten Viruslastanstieg. Bei den Kontrollen sank die RT-Aktivität auf Grund des durch HIV verursachten Zellsterbens bzw. Reduzierung der Zellzahl. Ein Wendepunkt bzw. eine Senkung der RT-Aktivität nach einem langsamen Anstieg bis zu Tag 11 war nicht zu beobachten. Bei den Kontrollen sank die Viruslast kontinuierlich durch Zellsterben bedingt durch das HI-Virus.

Bei DDI ließ sich ein langsam zunehmender Anstieg der Viruslast zeigen, jedoch schneller als bei AZT. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung zeigte sich bis zu Tag 8. Der schnellste RT-Anstieg zeigte sich bei der niedrigsten Konzentration [c3], gefolgt von der mittleren Konzentration [c2] und der höchsten [c1], also [c3]> [c2]> [c1]. Zwischen Tag 8 und 11 sank die Viruslast wieder bei [c2] und [c3]. Bei [c1] hingegen stieg sie prothrahiert, kontinuierlich an bis zu Tag 11 ohne Wendepunkt. Dies war vermutlich dadurch bedingt, dass es nicht zu so großer Zellreduzierung bzw. Zellsterben durch das HI-Virus bei der größten DDI-Dosis kam wie bei der mittleren und geringsten Konzentration [c2] und [c3].

NVP zeigte ähnlich DDI einen schnelleren RT-Anstieg als AZT. Allerdings ließ sich im Gegensatz zu DDI schon vor Tag 8 keine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung mehr

erkennen. Bei [c2] kam es zu einem schnelleren Viruslast-Anstieg als bei [c3]. Während sich bei [c2] und [c3] ähnlich DDI ein Wendepunkt mit RT-Senkung ab Tag 8 zeigte, stieg bei [c1] die Viruslast langsam, aber kontinuierlich an.

Zusammenfassend zeigte AZT den langsamsten RT-Anstieg. Bei NVP hingegen war bis zu Tag 11 keine höhere Viruslast als 32.000 zu verzeichnen im Gegensatz zu DDI und AZT mit ca. 43.000.

Zusammenfassend entsprechen die Ergebnisse von AZT, DDI und NVP bei frisch infizierten Zellen dem primär angenommenen Wirkprinzip auf die Reverse Transkription. Sind die Zellen noch nicht infiziert, können die RT-Inhibitoren die virale DNA-Polymerase hemmen und somit die Virusreplikation deutlich vermindern. Somit ist die Hemmwirkung der Wirkstoffe am besten mit einem wie hier gewählten Versuchsaufbau zu demonstrieren.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue HIV-Replikationsinhibitoren in vitro auf Virusreplikationshemmung und eventuell vorhandene Toxizität zu testen.

Die hier untersuchten Protease- und REV-Inhibitoren sind eine neue Generation von HIV-Replikationsinhibitoren. Sie sind teilweise durch das SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) -Verfahren hergestellte Moleküle, die vorher selektierte Aptamere von den definierten Bindungsstellen verdrängen konnten. Der Rest der neuen Inhibitoren sind anderweitig ins Visier geratene Verbindungen wie Nandrolon und Uvaol, bei denen ebenfalls sogenannte "small molecules" eine Rolle spielen. Diese beiden Inhibitoren fungieren hier als Nicht-Substratanaloge Protease-Inhibitoren.

Eine eindeutige Wirksamkeit auf die Senkung der Viruslast unter den neuen HIV-Replikationsinhibitoren zeigte Nandrolon, ein Protease-Inhibitor, bei HIV-1/O und minimal besser bei HIV-1/M. Bei den REV-Inhibitoren ließ sich fast bei allen Konzentrationen Toxizität nachweisen und somit auch keine eindeutig belegbare Wirkung auf die Senkung der RT-Aktivität.

Von den bekannten Nukleosidischen und Nicht-Nukleosidischen RT-Inhibitoren wirkten AZT (Azidothymidin), DDI (Dideoxyinosin) und NVP (Nevirapin) eher im frühen Anteil des HIV-Replikationszyklus. Obwohl der Versuchsaufbau bei chronisch infizierten Zellen den fortgeschrittenen Teil des Replikationszyklus darstellte, zeigte sich bei DDC eine statistisch eindeutige Viruslastsenkung und eine Dosis-Wirkungsbeziehung. Bei den anderen bekannten RT-Inhibitoren zeigte sich wie erwartet keine Wirkung auf die Viruslast bei chronisch infizierten HUT-78 Zellen.

Bei frisch infizierten Zellen, die den frühen Anteil des HIV-Replikationszyklus darstellen, zeigten alle in diesem Ansatz untersuchten RT-Inhibitoren (AZT, DDI und NVP) eine Wirkung. Den langsamsten Viruslastanstieg und somit die beste Wirksamkeit zeigte AZT im Gegensatz zu DDI und NVP.

Zusammenfassend konnte die Wirksamkeit eines neuen Protease-Inhibitors (Nandrolon) sowohl bei HIV-1/M als auch bei HIV-1/O und ein unerwarteter Wirkungszeitpunkt von DDC

bei chronisch infizierten Zellen gezeigt werden. Problematisch stellte sich die Toxizität der Rev-Inhibitoren bei höheren Konzentrationen dar. Allerdings könnten feinere Abstufungen der Konzentrationen einer besseren und exakteren Eingrenzung der Toxizität dienen.

Weitere Untersuchungen für Nandrolon oder die entsprechenden, neuen Inhibitorenklassen konnten infolge einer Neuausrichtung des Forschungsschwerpunktes der Firma NASCACELL im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden.

Auch in Zukunft ist die Erforschung neuer Substanzen und Substanzklassen wichtig, da mit Resistenzen der HI-Viren nach absehbarer Zeit und somit konsekutivem Therapieversagen gerechnet werden muss.

Literatur- und Quellenverzeichnis

Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. Mar 11;76(5): 853-64.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. May 20; 220(4599): 868-71.

Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM (2001). Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat Rev Immunol*. Dec;1(3): 209-19.

Broder S, Gallo RC (1984). A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N Engl J Med*. 311: 1292-7.

Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E, Tsay J, Ip J, Farthing C, Limoli K, Parkin N, Markowitz M (1999). HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA*. Sep 22-29;282(12):1 135-41.

Briones C Perez-Olmeda M, Rodriguez C, del Romero J, Hertogs K, Soriano V (2001). Primary genotypic and phenotypic HIV-1 resistance in recent seroconverters in Madrid. *J Acquired Immune Defic Syndr*. 26:145-150.

Broder S, Mitsuya H (1986). Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar;83(6): 1911-5.

Camarasa MJ, Velazquez S, San-Felix A, Perez-Perez MJ, Gago F. Dimerization inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase, protease and integrase: a single mode of inhibition for the three HIV enzymes? (2006). *Antiviral Res*. Sep;71(2-3): 260-7. Epub. Jun 28.

Centers for Disease Control (1985). Provisional Public Health Service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing acquired immunodeficiency syndrome. *Morb Mortal Wkly Rep*. 34: 1-5. [Http://hiv.net/link.php?id=157](http://hiv.net/link.php?id=157).

Centers for Disease Control (1993b). 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1992, 41 (RR-17). [Http://hiv.net/link.php?id=184](http://hiv.net/link.php?id=184).

Cherrington JM, Allen SJ, McKee BH, Chen MS Kinetic analysis of the interaction between the diphosphate of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine, ddCTP, AZTTP, and FIAUTP with human DNA polymerases beta and gamma (1994). *Biochem Pharmacol*. Nov 16;48(10): 1986-8.

- Collins KL**, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. Jan 22;391(6665): 397-401.
- Coffin JM (1990)**. Retroviridae and their replication. In: *Fundamental Virology*, ed.: Fields BN, Knipe DM et al. Raven Press, Ltd., New York 1990.
- Crawford S**, Goff SP (1985). A deletion mutation in the 5' part of the pol gene of Moloney murine leukemia virus blocks proteolytic processing of the gag and pol polyproteins. *J Virol*. Mar;53(3): 899-907.
- Cullen BR (1991)**. Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB Journal* 5(10), 2361-8.
- Deeks SG**, Smith M, Holodniy M, Kahn JO.(1997). HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. *JAMA*. Jan 8;277(2): 145-53.
- Ding J**, Das K, Moereels H, Koymans L, Andries K, Janssen PA, Hughes SH, Arnold E (1995). Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol*. May;2(5): 407-15.
- Eberle J**, Seibl R (1992). A new method for measuring reverse transcriptase activity by ELISA. *J Virol Methods*. Dec 1;40(3): 347-56.
- Eberle J**, Knopf CW (1996). Nonisotopic assays of viral polymerases and related proteins. *Methods Enzymol*.;275: 257-76.
- Eberle J**, Bechowsky B, Rose D, Hauser U, von der Helm K, Gurtler L, Nitschko H. (1995). Resistance of HIV type 1 to proteinase inhibitor Ro 31-8959. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Jun;11(6): 671-6.
- Eron JJ Jr**, Murphy RL, Peterson D, Pottage J, Parenti DM, Jemsek J, Swindells S, Sepulveda G, Bellos N, Rashbaum BC, Esinhart J, Schoellkopf N, Grosso R, Stevens M. (2000) A comparison of stavudine, didanosine and indinavir with zidovudine, lamivudine and indinavir for the initial treatment of HIV-1 infected individuals: selection of thymidine analog regimen therapy (START II). *AIDS*. Jul 28;14(11): 1601-10.
- Esnouf R**, Ren J, Ross C, Jones Y, Stammers D, Stuart D (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol*. Apr;2(4): 303-8.
- Famulok M**, Mayer G. Aptamers as tools in molecular biology and immunology (1999). *Curr Top Microbiol Immunol*. 243:123-36.
- Fischl MA**, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Schooley RT, et al (1987). The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. Jul 23;317(4):185-91.

- Fischl MA**, Richman DD, Hansen N, Collier AC, Carey JT, Para MF, Hardy WD, Dolin R, Powderly WG, Allan JD, et al (1990). The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. The AIDS Clinical Trials Group. *Ann Intern Med.* May 15;112(10):727-37.
- Ford D.K** an Yerganian G (1958). *J Nat Cancer Inst.* 21:393-425.
- Gallo RC**, Salahuddin SZ, Popovic M *et al.* (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 224: 500-3.
- Gao F**, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature.* Feb 4. 397(6718): 436-41.
- Getchell JP**, Hicks DR, Svinivasan A, Heath JL, York DA, Malonga M, Forthal DN, Mann JM, McCormick JB (1987). Human immunodeficiency virus isolated from a serum sample collected in 1976 in Central Africa. *J Infect Dis.* Nov;156(5): 833-7.
- Gold J**, Batterham MJ, Rekers H, Harms MK, Geurts TB, Helmyr PM, Silva de Mendonca J, Falleiros Carvalho LH, Panos G, Pinchera A, Aiuti F, Lee C, Horban A, Gatell J, Phanuphak P, Prasithsirikul W, Gazzard B, Bloch M, Danner SA; E-1696 Study Investigators (2006). Effects of nandrolone decanoate compared with placebo or testosterone on HIV-associated wasting. *HIV Med.* Apr;7(3): 146-55.
- Gootenberg JE**, Ruscetti FW, Mier JW, Gazdar A, Gallo RC (1981). Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor. *J Exp Med.* Nov 1;154(5): 1403-18.
- Gürtler L**, Mühlbacher A, Michl U *et al.* (1998). Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. *J Virol Methods.* 75: 27-38.
- Gürtler LG**, Zekeng L, Tsague JM, van Brunn A, Afane Ze E, Eberle J, Kaptue L (1996). HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Arch Virol Suppl.*11: 195-202. Review.
- Gürtler LG**, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol.* Mar;68(3): 1581-5.
- Hahn BH**, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science.* 287(5453): 607-14.
- Harris M** (1999). HIV: a new role for Nef in the spread of HIV. *Curr Biol.* Jun 17;9(12): R459-61. Review.
- Hartig JS**, Najafi-Shoushtari SH, Grune I, Yan A, Ellington AD, Famulok M. Protein-dependent ribozymes report molecular interactions in real time (2002). *Nat Biotechnol.* Jul;20(7): 717-22.

Held DM, Kissel JD, Patterson JT, Nickens DG, Burke DH (2006). HIV-1 inactivation by nucleic acid aptamers. *Front Biosci.* Jan 1;11: 89-112.

Henderson LE, Bowers MA, Sowder RC 2nd, Serabyn SA, Johnson DG, Bess JW Jr, Arthur LO, Bryant DK, Fenselau C (1992). Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J Virol.* Apr;66(4): 1856-65.

Heuverswyn F, Yingying Li, Cecile Neel, Elizabeth Bailes' Brandon F. Keele, Weimin Liu, Severin Loul, Christelle Butel, Florian Liegeois, Yanga Bienvenue, Eitel Mpoudi Ngolle, Paul M. Sharp, George M. Shaw, Eric Delaporte, Beatrice H. Hahn and Martine Peeters (2006). Human immunodeficiency viruses:SIV infection in wild gorillas. *Nature* 444, 164 (9 November).

Hoffman AD, Banapour B, Levy JA. (1985). Characterization of the AIDS-associated retrovirus reverse transcriptase and optimal conditions for its detection in virions. *Virology.* Dec;147(2):326-35.

Hsiou Y, Ding J, Das K, Clark AD Jr, Hughes SH, Arnold E (1996). Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure.* Jul 15;4(7): 853-60.

Iversen Astrid K. N., 2* Robert W. Shafer, 1 Kathy Wehrly ,3 Mark A. Winters, 1 James I. Mullins,2† Bruce Chesebro,3 and Thomas C. Merigan1 (1996). Multidrug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains Resulting from Combination Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, Feb., p. 1086–1090 Vol. 70, No. 2.

Janssen RS, Satten GA, Stramer SL *et al.* (1998). New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA.* 280: 42-48.

Jardine D, Locarnini S, Tachedjian G, Birch C (1993). Mechanism of action of Coumestrol A1. *Annu Conf Australas Soc HIV Med.* Oct 28-30; 5: 102 (poster no.54).

Joshi P, North Th, Prasad V. (2005). Aptamers directed to HIV-1 Reverse Transcriptase display greater efficacy over small hairpin RNAs targeted to viral RNA in blocking HIV-1 replication. *Molecular Therapy* 11:5.

Joshi P, Prasad V (2002). Potent inhibition of immunodeficiency virus type 1 replication by template analog reverse transcriptase inhibitors derived by SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment). *J. Virol.* 76: 6545-6557.

Klecker RW Jr, Collins JM, Yarchoan R, Thomas R, Jenkins JF, Broder S, Myers (1987). CE Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine: a novel pyrimidine analog with potential application for the treatment of patients with AIDS and related diseases *Clin Pharmacol Ther.* Apr;41(4): 407-12.

Klug SJ, Famulok M. All you wanted to know about SELEX (1994). *Mol Biol Rep.* 20(2):97-107.

- Kohlstaedt LA**, Wang J, Rice PA, Friedman JM, Steitz TA (1992a). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256: 1783-90.
- Kohlstaedt LA**, Steitz TA (1992b). Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus can use either human tRNA(3Lys) or Escherichia coli tRNA(2Gln) as a primer in an in vitro primer-utilization assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 15;89(20): 9652-6.
- Kwong PD**, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. Jun 18;393(6686) :648-59.
- Lapatto R**, Blundell T, Hemmings A, Overington J, Wilderspin A, Wood S, Merson JR, Whittle PJ, Danley DE, Geoghegan KF (1989). X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes. *Nature*. Nov 16; 342(6247): 299-302.
- Larder BA**, Darby G, Richman DD (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*. Mar 31;243(4899):1731-4.
- Little SJ**, Daar ES, D'Aquila RT et al. (1999). Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. *JAMA* 282: 1142-9.
- Marx JL** (1989). Drug-resistant strains of AIDS virus found. *Science*. Mar 24;243(4898):1551-2.
- Merluzzi VJ**, Hargrave KD, Labadia M, Grozinger K, Skoog M, Wu JC, Shih CK, Eckner K, Hattox S, Adams J (1990). Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor *Science*. Dec 7;250(4986): 1411-3.
- Min BS**, Jung HJ, Lee JS, Kim YH, Bok SH, Ma CM, Nakamura N, Hattori M, Bae K (1999). Inhibitory effect of triterpenes from *Crataegus pinatifida* on HIV-I protease. *Planta Med*. May;65(4):374-5.
- Mitsuya H**, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, Broder S 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro (1985). *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct;82(20): 7096-100.
- Navia MA**, Fitzgerald PM, McKeever BM, Leu CT, Heimbach JC, Herber WK, Sigal IS, Darke PL, Springer JP (1989). Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature*. Feb 16;337(6208): 615-20.
- Nijhuis M**, Deeks S, Boucher C (2001). Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. *Curr Opin Infect Dis*. Feb;14(1): 23-8.
- Nijhuis M**, Schuurman R, de Jong D, Erickson J, Gustchina E, Albert J, Schipper P, Gulnik S, Boucher CA (1999). Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS*. Dec 3;13(17): 2349-59.

Pauwels R, Andries K, Desmyter J, Schols D, Kukla MJ, Breslin HJ, Raeymaeckers A, Van Gelder J, Woestenborghs R, Heykants J, et al. (1990). Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives. *Nature*. Feb 1;343(6257):470-4.

Quere L, Wenger T, Schramm HJ. Triterpenes as potential dimerization inhibitors of HIV-1 protease (1996). *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 14;227(2): 484-8.

Reil H, Kollmus H, Weidle UH, Hauser H (1993). A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells. *J Virol*. Sep;67(9): 5579-84.

Ren J, Esnouf R, Hopkins A, Ross C, Jones Y, Stammers D, Stuart D (1995). The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with 9-chloro-TIBO: lessons for inhibitor design. *Structure*. Sep 15;3(9): 915-26.

Rentmeister A, Bill A, Wahle T, Walter J, Famulok M. RNA aptamers selectively modulate protein recruitment to the cytoplasmic domain of beta-secretase BACE1 in vitro (2006). *RNA*. Sep;12(9):1650-60. Epub Aug 3.

RKI: www.rki.de.

Robbins KE, Lemey P, Pybus OG, Jaffe HW, Youngpairoj AS, Brown TM, Salemi M, Vandamme AM, Kalish ML (2003). U.S. Human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains. *J Virol*. Jun;77(11):6359-66.

Rodgers DW, Gamblin SJ, Harris BA, Ray S, Culp JS, Hellmig B, Woolf DJ, Debouck C, Harrison SC (1995). The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 14;92(4): 1222-6.

Rosen CA, Sodroski JG, Haseltine WA (1985). Location of cis-acting regulatory sequences in the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6502-6.

Schramm HJ, de Rosny E, Reboud-Ravaux M, Buttner J, Dick A, Schramm W. Lipopeptides as dimerization inhibitors of HIV-1 protease (1999). *Biol Chem*. May;380(5): 593-6.

Smerdon SJ, Jager J, Wang J, Kohlstaedt LA, Chirino AJ, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA (1994). Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 26;91(9): 3911-5.

Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*. Aug 8;418(6898): 646-50.

Sommadossi JP (1999). HIV protease inhibitors: pharmacologic and metabolic distinctions. *AIDS*. Sep;13 Suppl 1: S29-40.

Toh H, Kikuno R, Hayashida H, Miyata T, Kugimiya W, Inouye S, Yuki S, Saigo K (1985). Close structural resemblance between putative polymerase of a Drosophila transposable genetic element 17.6 and pol gene product of Moloney murine leukaemia virus. *EMBO J*. May;4(5): 1267-72.

Trkola A, Pomales AB, Yuan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, Katinger H, Barbas CF 3rd, Burton DR, Ho DD (1995). Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol.* Nov;69(11): 6609-17.

UNAIDS report for 2003: most deaths and new infections ever.

Van Vaerenbergh K, Harrer T, Schmit JC, Carbonez A, Fontaine E, Kurowski M, Grunke M, Low P, Rascu A, Schmidt B, Schmitt M, Thoelen I, Walter H, Van Laethem K, Van Ranst M, Desmyter J, De Clercq E, Vandamme AM (2002). Initiation of HAART in drug-naive. HIV type 1 patients prevents viral breakthrough for a median period of 35.5 months in 60% of the patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Apr 10;18(6): 419-26.

Volberding PA, Lagakos SW, Koch MA, Pettinelli C, Myers MW, Booth DK, Balfour HH Jr, Reichman RC, Bartlett JA, Hirsch MS, et al (1990). Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. The AIDS Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *N Engl J Med.* Apr 5;322(14): 941-9.

von der Helm K (1996). Retroviral proteases: structure, function and inhibition from a non-anticipated viral enzyme to the target of a most promising HIV therapy. *Biol Chem.* Dec;377(12): 765-74. Review.

Walker UA, Setzer B, Venhoff N. (2002). Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors. *AIDS.* 16: 2165-73.

Wegner SA, Brodine SK, Mascola JR, Tasker SA, Shaffer RA, Starkey MJ, Barile A, Martin GJ, Aronson N, Emmons WW, Stephan K, Bloor S, Vingerhoets J, Hertogs K, Larder B (2000). Prevalence of genotypic and phenotypic resistance to anti-retroviral drugs in a cohort of therapy-naive HIV-1 infected US military personnel. *AIDS.* May 26;14(8): 1009-15.

Wlodawer A, Miller M, Jaskolski M, Sathyanarayana BK, Baldwin E, Weber IT, Selk LM, Clawson L, Schneider J, Kent SB (1989). Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science.* Aug 11;245(4918): 616-21.

Wong-Staal F (1991). Human immunodeficiency viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*, ed.: Fields BN, Knipe DM et al. Raven Press, Ltd., New York 1991.

Yamaguchi J, Vallari AS, Swanson P, Bodelle P, Kaptue L, Ngansop C, Zekeng L, Gurtler LG, Devare SG, Brennan CA (2002). Evaluation of HIV type 1 group O isolates: identification of five phylogenetic clusters. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Mar 1;18(4): 269-82.

Yarchoan RC., Klecker RW Jr, Collins JM, , Thomas R, McAtee N, Broder S, Myers CE (1988). Pharmacokinetics of 2',3'-dideoxycytidine in patients with AIDS and related disorders. *J Clin Pharmacol.* Sep;28(9): 837-42.

Yoshinaga T, Sato A, Fujishita T, Fujiwara T. S-1360 (2002): in vitro activity of a new HIV-1 integrase inhibitor in clinical development. Abstract 8, 9th CROI 2002, Seattle, USA.

Zekeng L, Gürtler L, Afane Ze E, Sam-Abbenyi A, Mbouni-Essomba G, Mpoudi-Ngolle E, Monny-Lobe M, Tapka JB, Kaptue L (1994). Prevalence of HIV-1 subtype O infection in Cameroon: preliminary results. *AIDS*. Nov;8(11): 1626-8.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: HIV-Prävalenz bei Erwachsenen.
- Abb. 1.2: Aufbau des HIV-Partikels.
- Abb. 1.3: Schematische Darstellung des HIV-1 Genom.
- Abb. 1.4: Replikationszyklus eines Virus innerhalb einer CD4-Zielzelle.
- Abb. 1.5: Reverse Transkriptase.
- Abb. 1.6: Protease.
-
- Abb. 2.1: Chemilumineszens-Testprinzip.
- Abb. 2.2: AZT: Strukturformel.
- Abb. 2.3: DDC: Strukturformel.
- Abb. 2.4: DDI: Strukturformel.
- Abb. 2.5: NVP: Strukturformel.
- Abb. 2.6: Toxizitätsergebnis Uvaol.
- Abb. 2.7: Toxizitätsergebnis Nandrolon.
- Abb. 2.8: Toxizitätsergebnis Coumermycin.
- Abb. 2.9: Toxizitätsergebnis Nr.1445896.
-
- Abb. 3.1: HIV-1/M. Plattenbelegung: Potentielle Protease- und Rev- Inhibitoren.
- Abb. 3.2: HIV-1/O. Plattenbelegung: Potentielle Protease- und Rev- Inhibitoren.
- Abb. 3.3: HIV-1/M. Plattenbelegung: RT-Inhibitoren.
- Abb. 3.4: HIV-1/O. Plattenbelegung: RT-Inhibitoren.
- Abb. 3.5: HIV-1/M. Plattenbelegung: RT-Inhibitoren bei frisch infizierten Zellen.
-
- Abb. 4.1: Ergebnis: Uvaol (Substanz #1, PI) bei HIV-1/M.
- Abb. 4.2: Ergebnis: Uvaol (Substanz #1, PI) bei HIV-1/O.
- Abb. 4.3: Ergebnis: Nandrolon (Substanz #3, PI) bei HIV-1/M.
- Abb. 4.4: Ergebnis: Nandrolon (Substanz #3, PI) bei HIV-1/O.
- Abb. 4.5: Ergebnis: Coumermycin (Substanz #4, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/M.
- Abb. 4.6: Ergebnis: Coumermycin (Substanz #4, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/O.

- Abb. 4.7: Ergebnis: Nr. 1445896 (Substanz #7, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/M.
- Abb. 4.8: Ergebnis: Nr. 1445896 (Substanz #7, Rev-Inhibitor) bei HIV-1/O.
- Abb. 4.9: Ergebnis: AZT: HIV-1/M bei chron. infizierten Zellen.
- Abb. 4.10: Ergebnis: AZT: HIV-1/O bei chron. infizierten Zellen.
- Abb. 4.11: Ergebnis: DDC: HIV-1/M bei chron. infizierten Zellen.
- Abb. 4.12: Ergebnis: DDC: HIV-1/O bei chron. infizierten Zellen.
- Abb. 4.13: Ergebnis: DDI: HIV-1/M bei chron. infizierten Zellen.
- Abb. 4.14: Ergebnis: DDI: HIV-1/O bei chron. infizierten Zellen.
- Abb. 4.15: Ergebnis: NVP: HIV-1/M bei chron. infizierten Zellen.
- Abb. 4.16: Ergebnis: NVP: HIV-1/O bei chron. infizierten Zellen.
- Abb. 4.17: Ergebnis: AZT: HIV-1/M bei frisch infizierten Zellen.
- Abb. 4.18: Ergebnis: DDI: HIV-1/M bei frisch infizierten Zellen.
- Abb. 4.19: Ergebnis: NVP: HIV-1/M bei frisch infizierten Zellen.

Curriculum Vitae

Name: Christine Huber
Geburtsdatum: 10.11.1976 in München
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 – 1987 Gebele-Grundschule, München
1987 – 1994 Oskar-von-Miller-Gymnasium, München
1994 – 1996 Gymnasium Wald, Wald (Baden-Württemberg), Abitur

Praktika

09/1996 – 11/1996 Pflegepraktikum HNO, Klinikum Rechts der Isar (TU, München)
12/1996 – 04/1997 Auslandsaufenthalt: Südamerika, USA, England
05/1997 – 09/1997 Praktikum in der väterlichen Praxis: Dr. med. H. Huber, Facharzt für Allgemeinmedizin (München)

Hochschule

11/1997 – 06/2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München
03/2000 Physikum
03/2001 1. Staatsexamen
09/2003 2. Staatsexamen
06/2005 3. Staatsexamen

Promotion

In-vitro Testung neuer HIV-Replikationsinhibitoren im Vergleich mit etablierten Substanzen.
Experimentelle Doktorarbeit im HIV- Forschungsbereich, LMU.
Prof. Dr. med. J. Eberle, Max von Pettenkofer-Institut, München.

Klinische Erfahrung

Famulaturen

08/2000	Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum Villingen – Schwenningen
08/2001	Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Achim Schmidt, München
08/2002	Kardiologie, Klinikum Villingen – Schwenningen
09/2002	Neurologie, Krankenhaus Bogenhausen, München
10/2002	Infektionsambulanz, Medizinische Poliklinik der LMU

Praktisches Jahr

03/2004 – 07/2004	1. Terial, Chirurgie Neurochirurgie, Klinikum Großhadern, LMU Allgemeinchirurgie, Chirurgische Poliklinik der LMU
07/2004 – 10/2004	2. Terial, Innere Medizin Medizinische Poliklinik der LMU
10/2004 – 02/2005	3. Terial, Neurologie The National Hospital for Neurology and Neurosurgery, University College London, Queen Square

Assistenzarztstellen

11/2005 – vorerst 10/2009	BKH Augsburg, Forschungsstation E2, Akademisches Lehrkrankenhaus der LMU für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik. Ab 2007 Forschungskoordination und Durchführung M.A.R.S.-Projekt für Max-Planck-Institut für Psychiatrie München.
---------------------------	---

Zusatzqualifikationen/ Scheine im Rahmen des Medizinstudiums

Palliativmedizin, Antivirale Therapie, Infektiologie, Sportmedizin I und II, Tropenmedizin I, II und tropenmedizinischer Diagnostikkurs.

Sprachkenntnisse

Englisch fließend in Wort und Schrift, Französisch (Grundkenntnisse), Großes Latein.

Außeruniversitäre Zusatzqualifikationen/ Hobbies

Ski- u. Snowboardlehrerin (SportScheck), Tennis, Basketball, Musikinstrument: Hackbrett

 Publikationen

- 1) INFECTION, Supplement 1, Vol. 31, 2003, March
 Hillebrand S¹, Huber Ch², Postea O¹, Weiss N¹, Bogner J¹, Goebel F.-D¹., Banas B¹
Drug induced alterations in monocyte – endothelial cell interaction via a NF- κ B independent mechanisms
¹ Department of Infectious Diseases, Medical Policlinic; ² Department of Virology, Max von Pettenkofer-Institut, University of Munich, Germany

- 2) ANGIOGENESIS, Vol.5, Nr.4, 2003
 Hillebrand S¹., Huber Ch²., Goebel F.-D¹., Banas B.¹
Enhanced Monocyte- Endothelial– Cell Adhesion By Antiretroviral Drug Treatment
¹ Department of Infectious Diseases, Medical Policlinic; ² Department of Virology, Max von Pettenkofer-Institut, University of Munich, Germany

- 3) ANTIVIRAL THERAPY, 2003; 8: L 31
 J. Roeling¹, K.Wendlandt¹, Ch. Huber², S. Hillebrand¹, F.-D. Goebel¹, B. Banas¹
Measurement of CD 36 Expression on Monocytes of Long- Term Highly Active Antiretroviral Therapy- Treated HIV Patients
¹ Department of Infectious Diseases, Medical Policlinic; ² Department of Virology, Max von Pettenkofer-Institut, University of Munich, Germany

 Kongresse

- | | |
|-----------|---|
| 02/2002 | 9. Münchner Aidstage 2002 |
| 11/2002 | 6 th Intern. Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Glasgow |
| 02/2003 | 7. Kongress für Infektionskrankheiten u. Tropenmedizin, Berlin
Vortrag: Hillebrand S, Huber Ch, Postea O, Weiss N, Bogner J, Goebel F.-D., Banas B
Drug induced alterations in monocyte – endothelial cell interaction via a NF- κ B independent mechanisms |
| 05/2003 | 9. Deutscher und 14. österreichischer AIDS- Kongress, Hamburg |
| 07/2003 | 5 th International Workshop on Adverse Drug Reactions and Lipodystrophy in HIV, Paris
Poster: * keine Teilnahme, nur Posterpräsentation
J. Roeling, Ch. Huber, S. Hillebrand, F.-D. Goebel, B. Banas
CD 36 Expression on Human Monocytes of HIV-Patients: PI or Cholesterol Dependent? |
| 07/2003 | 4 th Symposium on The Biology of Endothelia Cells, GSF, München
Poster: Hillebrand S. , Huber Ch., Goebel F.-D., Banas B.
Enhanced Monocyte- Endothelial– Cell Adhesion By Antiretroviral Drug Treatment |
| 2005-dato | diverse psychiatrische und neurologische Fortbildungen/Kongresse |