

Identifizierung von Peptidliganden für funktionelle RNA-Strukturen über Screening von Phage-Display-Banken

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Anette Pustowka
aus Cieszyn/Polen

Frankfurt in 2004
DF1

vom Fachbereich 14 (chemische und pharmazeutische Wissenschaften) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

Zusammenfassung

Im Laufe der letzten Jahre hat sich die Aufmerksamkeit auf die Entwicklung von neuen RNA-bindenden Molekülen gerichtet. Grund dafür waren neue Erkenntnisse über die strukturelle und funktionelle Komplexität der RNA. So spielen spezifische RNA-Protein-Wechselwirkungen eine essentielle Rolle bei regulatorischen Prozessen. Die Spezifität dieser Interaktionen wird durch die dreidimensionale RNA-Struktur bestimmt. Somit bieten diese Wechselwirkungen ein attraktives Angriffsziel für die Suche nach niedermolekularen Substanzen, die in die regulatorischen Prozesse pathogener Organismen eingreifen. So gibt es im Replikationszyklus des HI-Virus mehrere essentielle Schritte, die der Interaktion zwischen charakteristischen, viralen RNA-Strukturen und der viralen Proteine bedürfen. Ein prominentes Beispiel ist die Verpackung der viralen RNA. Es handelt sich um einen hochspezifischen Prozess, bei dem aus einer Vielzahl von zellulären, viralen, gespleißten und ungespleißten RNA-Fragmenten, spezifisch die virale genomische RNA in die neu entstehende Partikel verpackt wird. Die Spezifität der Verpackung basiert auf der Erkennung der dreidimensionalen Ψ -Verpackungsstruktur am 5'-Ende der ungespleißten, viralen RNA durch die NCp7-Domäne des p55^{Gag}-Vorläuferproteins. Die NCp7-Domäne ist durch zwei Zinkfinger motive, die in allen Onko- und Lentiviren mit Ausnahme der Spumaviren konserviert sind, gekennzeichnet. Durch die zentrale Rolle im HIV-1 Replikationszyklus bietet die Ψ -NCp7-Interaktion ein potentiell Angriffziel für antivirale Interventionen. Das langfristige Ziel des Projektes war die Identifizierung von Peptidliganden für das HIV-1 Ψ -Signal mittels der Phage-Display-Methode, welche die Basis für die Entwicklung antiviraler Moleküle liefern sollen. Die Methode des Phage-Display basiert auf der Affinitätsselektion von Peptiden, die als Fusionsproteine mit dem Hüllprotein an der Oberfläche eines Bakteriophagen exprimiert werden. Sie wurde sehr erfolgreich für die Selektion von Peptidliganden für Antikörper oder andere Proteindomänen eingesetzt. Für RNA-Targets gibt es nur gelegentliche Hinweise. Im Vordergrund des Projektes standen strukturelle Erkennungsmerkmale der Ligand-RNA-Wechselwirkung. Zur Identifizierung von Peptidliganden für das Ψ -Verpackungssignal sowie deren Teilelement SL3, das ebenfalls Verpackungsaktivitäten aufweist, wurden kommerzielle Phagen-Banken mit zufälliger Aminosäuresequenz eingesetzt.

Im Rahmen des ersten Teilabschnitts konnten Phagen selektiert werden, die spezifisch an die Targetstrukturen gebunden haben und die Grundlage für die

Ableitung von Peptidmotiven bildeten. Insgesamt konnten neun Motive abgeleitet werden, darunter das tryptophanreiche HXWPWW-Motiv, das Aminosäurehomologien zum nativen Liganden, dem NCp7-Protein, zeigte. Die Spezifität zur Ziel-RNA wurde mittels ELISA, CD-Spektroskopie und Peptidfilter-Bindungsstudien analysiert. Für die tryptophanreichen Peptide wurde die Affinität zur Ψ - und SL3-RNA ermittelt. Sie lag für das HWWPWW-Peptid bei ca. $25 \pm 2 \mu\text{M}$ zur Ψ -RNA und bei ca. $34 \pm 2 \mu\text{M}$ zur SL3, also deutlich unter der Affinität des NCp7 (ca. 30nM). Entsprechend ließ sich das HWWPWW-Peptid in einem Kompetitions-ELISA mit Ψ -RNA als Target durch das native p55^{Gag}- und NCp7-Protein, jedoch nicht durch ein unrelevantes RNA-bindendes Protein, verdrängen. Anschließend wurden mittels der CD-spektroskopischen Mutationsanalyse die Bindungseigenschaften der Peptide optimiert, so dass zwei weitere Liganden, das HWWAWW- und HAWPWW-Peptid, als potentielle Ψ -Liganden ermittelt werden konnten.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die funktionelle Analyse der identifizierten Peptide hinsichtlich ihrer inhibitorischen Eigenschaften. Dazu wurden in HR^{YFP}-Zellen Pseudoviren, die das verpackbare Konstrukt Ψ -Yfp, sowie HIV-1 Gag-Pol und das Env des VSV-G enthielten, in Gegenwart des Ψ -bindenden Peptides, das als Rfp-Vpr-Fusionprotein vorlag, generiert. Eine Hemmung der Peptide auf die Verpackung der viralen RNA sollte dadurch messbar sein, dass die produzierten Pseudoviren weniger von der verpackbaren Ψ -Yfp-RNA enthielten als die Kontrollviren, die in Gegenwart eines Kontrollpeptids generiert wurden. Die Menge der Virus-RNA in den Partikeln wurde mittels einer quantitativen PCR-Methode, der Real-time-PCR, bestimmt. Einen hemmenden Einfluss auf die Verpackung der Ψ -Yfp-RNA und somit eine Inhibition der Ψ -NCp7-Interaktion hatte das HWWAWW-Peptid. Durch den Einsatz von 3 μg der HWWAWW-Rfp-Vpr-Vektors konnte die RNA-Menge um das fast 4000-fache im Vergleich zum Kontrollansatz reduziert werden.

1	EINLEITUNG	1
1.1	HIV und AIDS.....	1
1.1.1	Retroviren	2
1.1.2	Struktureller Aufbau von HIV-1	2
1.1.2.1	Transaktivatoren und akzessorische Proteine	4
1.1.3	Das HIV-1 Genom	5
1.1.4	Der Replikationszyklus von HIV-1	6
1.2	Möglichkeiten der antiviralen Intervention	8
1.3	RNA-Strukturen	9
1.3.1	RNA-Liganden als therapeutische Moleküle.....	10
1.4	Die Verpackung viraler RNA-Genome in Viruspartikel	11
1.4.1	NMR-Auflösung der SL3-NCp7-Interaktion.....	15
1.4.2	Modell für den initialen Komplex zwischen Ψ und NCp7	17
1.4.3	Knospung viraler Partikel	18
1.4.4	Ψ -NCp7-Interaktion als antivirales Ziel	19
1.4.4.1	Antisense-RNA	19
1.4.4.2	Aptamere.....	20
1.4.4.3	Zinkfinger-Inhibitoren	20
1.4.4.4	Aminoglykoside	20
1.5	Phage Display	21
1.6	Zielsetzung.....	23
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Material.....	24
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	24
2.1.2	Kits	24
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	25
2.1.4	Oligonukleotide.....	27
2.1.5	RNA	28
2.1.6	Plasmide und Vektorkarten.....	30
2.1.6.1	Generierte Konstrukte	32
2.1.7	Phage Display Banken	33
2.1.8	Peptide.....	34

2.1.9	Proteine	34
2.1.10	Enzyme	34
2.1.11	Antikörper	35
2.1.12	Bakterien und Anzuchtbedingungen.....	35
2.1.13	Zelllinien und Medien.....	36
2.2	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	36
2.2.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose- Gelelektrophorese.	37
2.2.3	Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden für Linker-Klonierung	37
2.2.4	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	38
2.2.6	Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	39
2.2.7	Kultivierung von <i>E.coli</i>	39
2.2.8	Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	39
2.2.8.1	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)	39
2.2.8.2	Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Maxi- Präparation).....	39
2.2.9	Photometrische Bestimmung der RNA/DNA-Konzentration.....	40
2.2.10	Sequenzierung der Konstrukte.....	40
2.3	RNA-Synthese und Analytik.....	40
2.3.1	<i>In vitro</i> Transkription der RNA	41
2.3.2	Elektrophoretische Auftrennung von RNA	42
2.3.3	Gelretentionsanalyse (EMSA) im nativen PAA-Gel zur Kontrolle der RNA-Funktionalität	42
2.3.4	Stabilitätsnachweis der Transkripte unter Versuchsbedingungen	43
2.3.5	Herstellung der RNA-DNA-Heteroduplices zur Biotinylierung der transkribierten RNA.....	43
2.3.6	Nachweis der RNA-DNA-Heteroduplices.....	44
2.3.6.1	Gelretentionsanalyse zum Nachweis der RNA-DNA- Heteroduplices	44
2.3.6.2	Blotten der MOPS-Gele zum Nachweis des biotinylierten Oligonukleotide	44
2.3.6.3	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zum Nachweis der Ψ -RNA über Bindung von Gag / RNA-Immobilisierung	45
2.4	Phage-Display	46
2.4.1	Ψ -Biopanning	46
2.4.1.1	Positive Selektion.....	46

2.4.1.2	Negativ-kompetitive Selektion	47
2.4.2	SL3-Biopanning	48
2.4.3	Amplifikation	48
2.4.4	Titern	49
2.4.5	Amplifikation einzelner Phagenklone.....	49
2.4.6	ELISA	50
2.4.6.1	Bestimmung der Spezifität der selektierten Phagen mittels ELISA	50
2.4.6.1.1	Einfach-Bestimmung mittels ELISA	51
2.4.6.1.2	Dreifach-Bestimmung mittels ELISA.....	51
2.4.7	Präparation einzelstängiger Phagen-DNA	52
2.4.8	Peptid-ELISA.....	52
2.4.9	Peptid-Kompetitions ELISA	52
2.4.10	Bestimmung der Spezifität der selektierten Phagen mittels EMSA	53
2.5	Zellbiologische Methoden.....	53
2.5.1	Auftauen und Einfrieren von Säugerzellen.....	53
2.5.2	Kultivierung von adhärennten Säugerzellen.....	54
2.5.3	Lentivirale Vektoren	54
2.5.4	Transiente Kalzium-Phosphat Transfektion von HR ⁺ YFP-Zellen zur Produktion von Lentiviren	56
2.5.5	Zellfärbung zur Lokalisation des Peptid-Rfp-Fusionproteins.....	58
2.5.6	ELISA zur Bestimmung der p24-Konzentration in Zellkulturüberständen	59
2.5.7	Präparation viraler RNA aus Kulturüberständen	59
2.6	Real-time-PCR	60
2.6.1	Primer-Design für die Real-time-PCR.....	61
2.6.2	Umschreiben der RNA in cDNA	61
2.6.3	Durchführung der Real-time-Experimente	62
2.6.4	Auswertung der Real-time-PCR	63
3	ERGEBNISSE	65
3.1	Auswahl einer geeigneten Kontroll-RNA	65
3.2	Strategie zur Klonierung und Immobilisierung der RNA	66
3.3	<i>In vitro</i> Transkription von Ψ- und CCR5-Kontroll-RNA	67
3.4	Funktionalitätsnachweis der Transkripte mittels EMSA	67

3.5	Stabilitätsnachweis unter Versuchsbedingungen.....	68
3.6	Nachweis von DNA-RNA-Heteroduplices	69
3.6.1	Nachweis der RNA-DNA-Heteroduplices durch das Blotting der MOPS-Gele	69
3.6.2	Gelretentionsanalyse zum Nachweis der RNA-DNA-Heteroduplices.	70
3.6.3	Nachweis der Funktionalität der Transkripte mittels ELISA / RNA-Immobilisierung	71
3.7	Ψ-RNA-Biopanning	73
3.7.1	ELISA zur Bestimmung der Phagenspezifität	74
3.7.2	Statistische Verteilung positiver Phagenklone.....	76
3.8	SL3-Biopanning.....	78
3.8.1	ELISA zur Bestimmung der Phagenspezifität	79
3.8.2	Statistische Verteilung positiver Phagenklone.....	81
3.9	Aminosäuresequenzen der Peptidinserts spezifischer Phagen	82
3.10	Statistische Auswertung der Sequenzen	85
3.10.1	Sequenzhomologien der Phagenklone	86
3.11	Homologien zu HIV-1 Proteinen	88
3.12	Aminosäuremotive spezifischer Phagenklone	90
3.13	Kreuzreaktionen identifizierter Phagen mit Ψ/SL1/SL2 und SL3-RNA	91
3.14	Peptid-ELISA	92
3.15	Kompetitions-ELISA	94
3.15.1	Kompetition-ELISA mit Ψ -RNA und p55 ^{Gag} /NCp7	95
3.15.2	Kompetition-ELISA mit Ψ -RNA und Tat	97
3.16	Bestimmung der Spezifität der selektierten Phagen mittels EMSA....	98
3.17	Ala-Scan und CD-Spektroskopie.....	99
3.18	Design eines funktionellen Assays zur Testung der inhibitorischen Eigenschaften der Ψ-RNA Liganden	101
3.19	Lokalisation des Peptid-Rfp-Fusionproteins in HR YFP-Zellen	103

3.19.1	TO-PRO®3-Zellkernfärbung.....	104
3.19.2	AlexaFluor488-Zellmembranfärbung.....	105
3.20	Transiente Kalzium-Phosphat Transfektion von HR⁺YFP-Zellen zur Produktion von Lentiviren.....	106
3.21	Bestimmung der p24-Konzentration in den Zell-überständen.....	108
3.21.1	Real-time-PCR zur Ermittlung der Ψ -RNA-Menge in den generierten Pseudoviren.....	112
3.21.1.1	Einfluss des HWWPWW-Peptids auf die Verpackung der Ψ -RNA	117
3.21.1.2	Einfluss des HAWPWW-Peptids auf die Verpackung der Ψ -RNA	117
3.21.1.3	Einfluss des HWWAWW-Peptids auf die Verpackung der Ψ -RNA.....	118
4	DISKUSSION	120
4.1	Funktionalitätsnachweis der Transkripte	120
4.2	Identifizierung von Peptidliganden durch Screening von Phagen- Banken	122
4.3	Testung spezifischer Peptidliganden auf antivirale Aktivität in der Zellkultur	133
4.4	Neue Therapiemöglichkeiten durch Komplementierung der HAART	138
5	LITERATURVERZEICHNIS	141
5.1	Eigene Veröffentlichungen.....	155
5.1.1	Publikationen	155
5.1.2	Poster.....	155
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	157
7	ANHANG	160

1 Einleitung

1.1 HIV und AIDS

Die Immunschwäche AIDS (**A**cquired **I**mmundeficiency **S**yndrome) wurde erstmals im Jahr 1981 bei homosexuellen Männern und Drogenabhängigen mit oportunistischen Krankheiten beschrieben^{1,2}. Als Auslöser für die neuartige Krankheit wurden 1983/84 von zwei Arbeitsgruppen Retroviren identifiziert und isoliert. Zunächst wurde der Erreger von Luc Montagnier vom Institut Pasteur in Paris (Frankreich) als LAV (lymphadenopathy-associated virus) bezeichnet, weil es zum ersten Mal aus den Lymphknoten eines Patienten mit Lymphadenopathie-Syndrom isoliert wurde^{3,4}. Unabhängig davon wurde in den USA das HTL-Virus II (**h**uman **t**-cell **l**eukemia **v**irus) von Robert Gallo vom National Cancer Institute in Bethesda (USA) beschrieben⁴. Nachdem feststand, dass es sich um das gleiche Virus handelt, wurde es ab 1985 als HIV (**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus) bezeichnet¹.

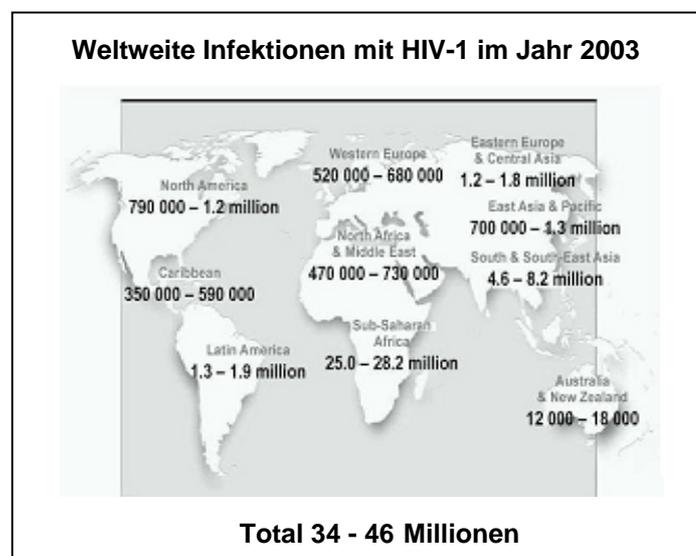


Abbildung 1-1: Zahl der weltweiten Infektionen mit HIV-1 im Jahr 2003. Über 28 Millionen der Infizierten leben in Afrika (Daten UNAIDS 2003; www.unaids.org).

Die HIV-Epidemie begann Anfang der achtziger Jahre gleichzeitig in den Städten der USA und Zentralafrikas. Seitdem hat sich die Infektion weltweit, vor allem aber in den Ländern der Dritten Welt (Indien, Afrika und Südostasien) verbreitet. Im Jahr 2003 waren weltweit über 46 Millionen Menschen mit HIV infiziert und die Zahl der Neuinfektionen wächst ständig

(Abbildung 1-1). Ende 2003 gab es 5 Millionen Neuinfektionen, fast 15 Millionen Menschen starben an den Folgen einer HIV-Infektion (www.unaids.org)^{1,2}.

1.1.1 Retroviren

Der Familienname *Retroviridae* (Retrovirus) leitet sich von dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) ab. Retroviren sind durch ein diploides 5 - 10kb großes Genom, das in Form von zwei einzelsträngigen (+)RNA-Molekülen und doppelsträngiger DNA als Zwischenprodukt vorliegt, gekennzeichnet. Charakteristisch für die RT ist die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität, wodurch die Umschreibung des RNA-Genoms in DNA ermöglicht wird. Die Familie der Retroviren wird in drei Unterfamilien unterteilt: Onkoviren, Lentiviren und Spumaviren. HIV gehört zu den Lentiviren, die sehr effizient nicht-teilende Zellen infizieren können^{1,6,7,8}.

1.1.2 Struktureller Aufbau von HIV-1

Die Partikel des HI-Virus (Abbildung 1-2) haben einen Durchmesser von 100 nm^{4,9}. Die äußere Hülle des Virus besteht aus einem Phospholipidbilayer, der von der Wirtsmembran abstammt¹⁰. Mit dieser sind die viralen Glykoproteinkomplexe gp41 und gp120, die als Trimere vorliegen, assoziiert. Während das gp41 (TM: transmembrane) in der Membran verankert ist und den Transmembranteil bildet, ist das gp120 (SU: surface) nichtkovalent mit dem externen Teil des gp41 (TM) assoziiert^{10,10a}. Die Hüllglykoproteine werden von dem env-Gen codiert und zunächst als gp160-Vorläuferprotein an Ribosomen des endoplasmatischen Reticulums (ER) translatiert¹²⁵. Im ER findet anschließend die Modifikation der Aminosäuren mit Zuckerresten statt, die Spaltung in die Transmembrandomäne und die externe Domäne erfolgt im Golgi-Apparat^{10,15,26,142-144}.

Die Innenseite des Virus ist mit Matrixproteinen (MA, p17) ausgekleidet, die über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Virusmembran assoziiert sind und das konische Nukleokapsid umschließen. Das NCp7-Protein ist über das p6-Linkerprotein mit der Hüllmembran ligiert^{11,12}. Das Kapsid besteht aus dem Kapsidprotein (CA, p24) und enthält zwei identische einzelsträngige (+)RNA-Moleküle, die durch eine Kissing-Loop-Struktur miteinander verbunden sind^{8,9}. Die RNA ist mit dem Nukleokapsidprotein (NC, p7) komplexiert¹³. Diese gruppenspezifische Antigene (MA, CA, p6 und NC

Protein) werden von dem gag-Gen kodiert und als p55^{Gag}-Vorläuferprotein an freien Ribosomen synthetisiert^{8,10,11,14,27}.

Als weitere Komponenten befinden sich im Virus die Reverse Transkriptase (RT, p51), Integrase (IN, p32) und Protease (PR, p10). Sie werden von dem pol-Gen, das mit dem 3'-Ende des gag-Gens überlappt, kodiert und als gp160^{Gag-Pol}-Vorläuferproteine exprimiert. Während des Reifungsprozesses der viralen Partikel werden die Vorläuferproteine von der viralen Protease in die einzelnen Komponenten prozessiert^{13,28}. Der Transport der Vorläuferproteine zur Zellmembran erfolgt über Interaktionen mit zellulären Proteinen^{8,10,11,27,27a}. Die Mg²⁺-abhängige Reverse Transkriptase, die für die reverse Transkription der RNA in cDNA verantwortlich ist, ist ein Heterodimer aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten p51 und p66 und kann als RNA- sowie DNA-Polymerase fungieren. Zusätzlich verfügt sie über eine RnaseH-Aktivität, die C-terminal in der großen Einheit lokalisiert ist^{8,123,135,136}. Die Integrase vereint die Funktion der Endonuklease und Ligase und ist für die Integration des Provirus ins Zellgenom verantwortlich^{8,133}. Die Protease ist ein Homodimer, das als Aspartatprotease fungiert und durch Autokatalyse vom Gag-Pol freigesetzt wird. Die Protease ist für die Prozessierung der p55^{Gag}- und p160^{Gag-Pol}-Vorläuferproteine in ihre einzelnen funktionellen Bestandteile verantwortlich^{7,8,10,14,15,134}.

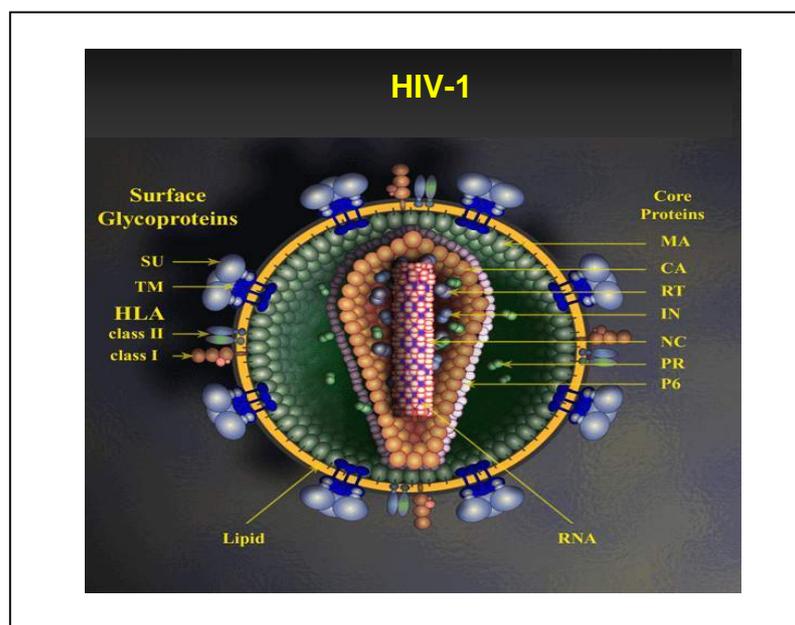


Abbildung 1-2: Schematischer Aufbau von HIV-1 mit Lokalisation der viralen Proteine: gp41 Glykoprotein (TM), gp120 Glykoprotein (SU), p17 Matrixprotein (MA), p24 Kapsidprotein (CA), p7 Nukleokapsid (NC), p10 Protease (PR), p32 Integrase (IN), p51 Reverse Transkriptase (RT), p6 Linkerprotein (P6). In die Virushülle können Wirtszellproteine wie MHC (major histocompatibility complex) Klasse I und II integriert sein (verändert nach www.bjdh.com/hzzj/images/Hiv.gif).

1.1.2.1 Transaktivatoren und akzessorische Proteine

Neben den strukturellen Genen kodiert das HIV1-Genom durch überlappende Leseraster weitere Gene. Dazu gehören der Transaktivator Tat (transactivator of transcription), der an die TAR-Struktur der 5'-R-Region bindet und so die Prozessivität der RNA-Polymerase II während der Elongation der wachsenden mRNA-Kette erhöht^{129,130}. Das Rev-Protein (regulator of expression of viral proteins) bindet an die RRE-Struktur (rev responsive element) im env-Gen an einfach bzw. ungespleißte virale RNA und begünstigt deren Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma^{7,29,30, 131,132}.

Zu den akzessorischen Proteinen gehören Nef (**n**egativ **e**ffector), das die Internalisation und Degradation der CD4-Rezeptoren in den Lysosomen vermittelt und somit die CD4-Konzentration an der Zelloberfläche senkt^{31,125, 126,127}, Vpu (**v**iral **p**rotein **U**), welches die Degradation der CD4-Proteine im ER initiiert³², sowie das Vpr-Protein (**v**iral **p**rotein **R**), das den Transport des PIC (**p**rä **i**ntegrations**c**omplexe) in den Zellkern vermittelt^{8, 128}. Das Vif-Protein (**v**iral **i**nfectivity **f**actor) ist für die Infektiosität des Partikels verantwortlich. Durch die Interaktion mit dem zellulären APOBEC3G-Protein wird die Deaminierung der (-)RNA während der reversen Transkription verhindert^{33,148, 149, 152}.

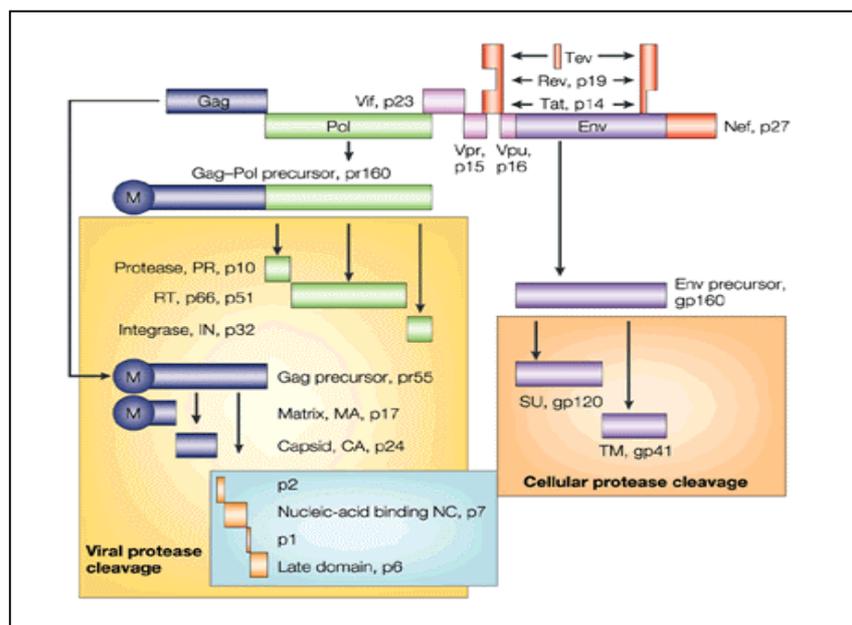


Abbildung 1-3: HIV-1 Proteine. Das 9,7kb Genom codiert für 16 Proteine: Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol (enzymatische Proteine), Env (Glykoproteine), zwei regulatorische (Tat und Rev), sowie vier akzessorische Proteine Vpr, Vpu, Vif, Nef (verändert nach Peterlin et al. 2003)¹⁵.

1.1.3 Das HIV-1 Genom

Das HIV-1 Genom besteht aus zwei einzelsträngigen (+)RNA-Molekülen, die mit der 5'Cap-Struktur sowie einer 3' Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryontischen mRNA besitzen und hat eine Größe von 9,7kb¹⁶. Die kodierenden Regionen sind am 5'- und 3'- Ende von regulatorischen, nicht translatierten U (unique, U5 bzw. U3) und repetitiven (R) Kontrollsequenzen flankiert, welche für die reverse Transkription, Integration des Provirus ins Wirtsgenom und Genexpression essentiell sind. Diese Sequenzen werden während der reversen Transkription des RNA-Genoms in der provirale DNA gebildet und als LTR (Long terminal repeats) bezeichnet^{15,16,26}.

Am 5'-Ende beginnt die HIV-1 RNA mit der R-Region, welche sich der Cap-Struktur anschließt und sich am 3'-Ende des Transkripts mit identischer Basenfolge und Orientierung wiederholt^{15,17,18}. Diese Region enthält die TAR- und poly(A)-Strukturen in Form von Stammschleifen¹³⁸. Durch die Bindung des viralen Tat-Proteins an die TAR-Stammschleife (trans activation response) wird die virale Transkriptionsrate um mehr als das Hundertfache verstärkt^{19,20}. Die poly(A)-Schleife enthält das Polyadenylierungssignal (AAUAAA) und reguliert die Polyadenylierung des viralen Transkriptes am 3'-Ende wodurch die Stabilität der viralen RNA erhöht wird^{16,21-23}. In der U5-Region, die sich stromabwärts an die R-Region anschließt, befindet sich die PBS-Stammschleife (**P**rim**B**inding **S**ite). Diese Stammschleife ist komplementär zu dem 3'-Ende der zellulären tRNA^{Lys}, welche als natürlicher Primer für die reverse Transkription dient¹¹⁷. Das Primeraktivierungssignal (PAS) befindet sich stromabwärts von der PBS-Struktur und ist essentiell für die erfolgreiche Initiation und Elongation der reversen Transkription^{24,25,123}. Die Sequenzfolge zwischen der PBS-Region und dem Beginn des Gag-ORF (**o**pen **r**eading **f**rame) wird als Leaderregion bezeichnet. Diese enthält die Spleißdonorstelle, die für die Produktion aller gespleißten mRNA verwendet wird. Weiterhin befindet sich in dieser Region die Ψ-Sequenz (Kap.1.4), die bei der Morphogenese der viralen Partikel eine wichtige Rolle spielt^{18,23}. Stromabwärts der Leaderregion folgen die für Proteine kodierende Gene, an die sich der PP-Trakt (**P**oly**P**urin) anschließt. Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation und Synthese des DNA-Doppelstranges während der reversen Transkription. Es folgen die U3-Region, die analog zum U5-Bereich ist und ein weiterer R-Bereich¹³.

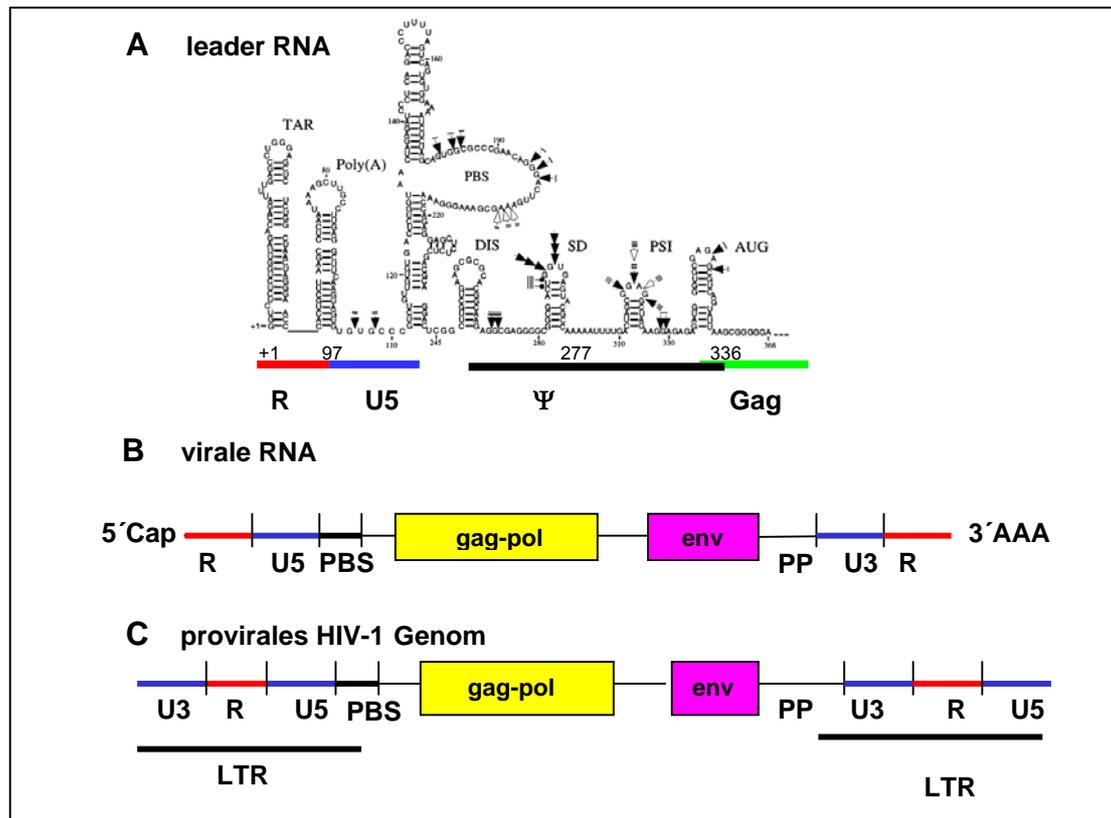


Abbildung 1-4: Genomorganisation des HIV-1. A: Stammschleifenstrukturen der Leader-Region. B: Das virale Genom. Anordnung von Sequenzelementen und offener Leserrahmen des viralen RNA-Genoms. Mit einer 5'Cap-Struktur sowie der 3'Polyadenylierung besitzt die virale RNA alle Merkmale einer mRNA. **C: Das provirale HIV-1 Genom.** Anordnung von Sequenzelementen und offenen Leserrahmen im Genom des Provirus nach der Integration ins Zellgenom. LTR kennzeichnet die Anordnung der Sequenzen, die während der reversen Transkription gebildet werden (verändert nach Damgaard et al. 1998)²⁴.

1.1.4 Der Replikationszyklus von HIV-1

Der Replikationszyklus des HIV-1 ist ein mehrstufiger Prozess, der mit der Erkennung und dem Eintritt in die Zielzelle beginnt und in die frühe und späte Phase eingeteilt wird¹⁵. Die Adsorption des Virus erfolgt zunächst über das Hüllglykoprotein gp120, das an den zellulären CD4-Rezeptor, der an der Oberfläche von Makrophagen, T-Helferzellen und Monozyten zu finden ist, bindet. Die Bindung führt zur Konformationsänderung des gp120-Hüllglykoproteins, wodurch Bereiche exponiert werden, die mit den Korezeptoren CCR5 bzw. CXCR4 interagieren. Daraus resultiert eine Konformationsänderung des Transmembranproteins gp41, wodurch schließlich das Virus mit der Zellmembran fusioniert^{13,15,26,139-141}. Im weiteren Verlauf wird das Kapsid ins Zellinnere freigesetzt und aufgelöst. Im Zytoplasma wird das Virusgenom, das in Form der ss(+)RNA vorliegt, mit Hilfe der Reversen Transkriptase in dsDNA transkribiert. Während des

Vorgangs werden die 5'- und 3'-LTR, die aus der U3, R, U5-Bereichen bestehen und die ORF (open reading frame) flankieren, generiert. Die provirale DNA wird anschließend als PIC (preintegration complex), das aus den Kapsidkomponenten IN, NCp7 und Vpr sowie RT und dem Vpr-Protein besteht, in den Zellkern transportiert^{34,124}. Die Integration der viralen Erbinformation ins Wirtszellgenom durch die virale Integrase ist Voraussetzung für die Expression der Gene. Die Transkription erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II^{13,15}.

Bei dem Export der viralen RNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma spielt die Interaktion des Rev-Proteins mit dem RRE (rev responsive element), einer 240nt langen Haarnadelstruktur, eine sehr wichtige Rolle^{7,29,29a}.

Die $p55^{\text{Gag}}$ und $p160^{\text{Gag-Pol}}$ -Vorläuferproteine werden zur Zellmembran transportiert, wo sie zusammen mit den Env-Glykoproteinen gp120 und gp41 akkumulieren^{7,13,15}. Das $p55^{\text{Gag}}$ -Protein interagiert mit dem Ψ -Verpackungssignal, das die Leader-Region der ungespleißten, viralen RNA enthält (assembly)^{23,35}. Bei der Knospung (budding) stülpen sich betroffene Membranbereiche an der Zelloberfläche aus und bilden Vesikel, die sich abschnüren^{11,26}. Während der Reifung (maturation) zu infektiösen Viren wird zunächst die Protease autokatalytisch von den $p55^{\text{Gag}}$ -Protein gespalten und aktiviert. Anschließend werden die Gag und Gag-Pol-Proteine in die einzelnen Komponenten gespalten^{36,37,145}.

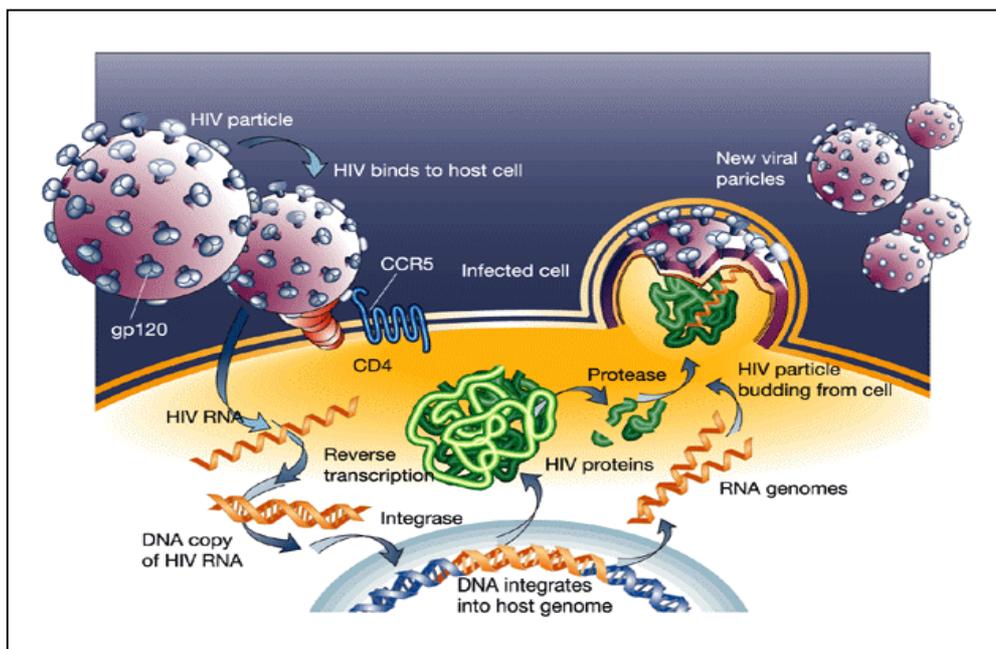


Abbildung 1-5: Der Replikationszyklus von HIV-1. Darstellung der einzelnen Schritte während der HIV-1 Infektion sowie der Knospung von HI-Virionen (verändert nach Weiss et al. 2001)⁵.

1.2 Möglichkeiten der antiviralen Intervention

Der Lebenszyklus von HIV bietet mehrere Stellen, die der antiviralen Intervention dienen können, z.B. die Adsorption des Virus an die Zielzelle, Prozessierung der Vorläuferproteine durch die Protease oder die reverse Transkription^{26,38,39}.

Für die antivirale Therapie sind eine Reihe von Hemmsubstanzen entwickelt worden, deren Ziele eine effiziente und langfristige Senkung der Viruslast im Blut und die Rekonstitution des Immunsystems sind⁴⁰. Bei der Behandlung der HIV-1 Infektion stehen derzeit Medikamente aus vier Wirkstoffklassen zur Verfügung: die Nukleosid- und Nukleotidanaloga, die nichtnukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren, Proteaseinhibitoren und seit 2003 ein Fusionshemmer mit dem Prototypnamen T-20^{41,42}. Einige der derzeit bereits verfügbaren Substanzen werden weiter entwickelt. Wichtigstes Ziel ist die Erleichterung der Einnahme, Reduktion der Nebenwirkungen und der Pillenmenge sowie eine geringere Resistenzbildung^{1,42}. Monotherapien zeigten nur kurzfristig eine Wirkung, weil sich hier sehr schnell Resistenzen von HIV gegen die Therapeutika bildeten. Seit 1995 werden Kombinationen von mindestens drei verschiedenen antiretroviralen Substanzen eingesetzt, so dass mehrere, voneinander unabhängige Funktionen der Virusreplikation gleichzeitig angegriffen werden^{153,154}. Mit Hilfe der so genannten „hochaktiven antiretroviralen Therapie“ (HAART) kann die Viruslast im peripheren Blut unter die Nachweisgrenze abgesenkt werden^{155,156}. Die eingesetzten Medikamente wirken zudem synergetisch, wodurch eine Reduktion der Dosis und somit auch der Nebenwirkungen erreicht wird (<http://hiv.net/2010/haart.htm>). Durch die Behandlung mit HAART wurde die Lebenserwartung erhöht, dennoch können Resistenzen bei HIV auftreten, die durch Mutationen in der Protease oder Reversen Transkriptase entstehen¹⁵⁷. Es ist daher notwendig, neue Therapieansätze zu entwickeln und pharmazeutische Wirkstoffe zu identifizieren, die sich gegen konservierte Strukturen von HIV wie z.B. Bereiche der genomischen RNA richten, welche nicht für Proteine kodieren, aber für die Replikation essentiell sind. Dazu zählen z.B. die RNA-Protein-Interaktionen von Tat-TAR, Rev-RRE und Ψ-NCp7 (Kap.1.1.4). Diese RNA-Protein Wechselwirkungen bieten somit einen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer, antiviraler Substanzen⁴²⁻⁴⁴.

1.3 RNA-Strukturen

RNA besitzt die Fähigkeit, komplexe dreidimensionale Strukturen auszubilden, die bei der Bindung von Effektorproteinen eine entscheidende Rolle spielen⁴³.

Die RNA ist durch eine Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur charakterisiert. Die Primärstruktur ist durch die Nukleotidsequenz des RNA-Stranges vorgegeben. Die Sekundärstruktur einer RNA wird durch ihr Faltungsmuster bestimmt. Dieses entsteht durch Ausbildung von Stammschleifen- (stem-loop) und Haarnadelstrukturen, die durch Basenpaarungen zwischen räumlich entfernt liegenden, komplementären, palindromischen Abschnitten gebildet werden. Eine Stammschleifenstruktur besteht aus einer kurzen Doppelhelix, welche durch komplementäre Basenpaarung entsteht sowie aus einer freien Schleife. Haarnadelstrukturen ähneln den Stammschleifen, besitzen jedoch eine sehr viel kleinere Schleife. Die Basen einer doppelsträngigen-RNA nehmen eine A-helikale Form an. Diese ist durch eine tiefe aber enge Rinne gekennzeichnet. Durch spezifische Interaktion zwischen den flexiblen Schleifen kann es zur Ausbildung von Tertiärstrukturen wie z.B. einem Pseudoknoten, kommen^{43,45,46}.

Durch die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen werden spezifische Bereiche für die Interaktion mit einem Liganden generiert. Diese Interaktionen spielen nicht nur bei zellulären Prozessen wie z.B. der Gentranskription oder Proteinbiosynthese eine essentielle Rolle, sondern auch im viralen Replikationszyklus, z.B. bei der Initiierung der Transkription (Tat-TAR-Interaktion), Transport der einfach oder ungespleißten RNA aus dem Zellkern (Rev-RRE-Interaktion) oder der Verpackung der viralen RNA in neue Partikel (NCp7-Ψ-Interaktion)⁴⁴⁻⁴⁶.

Viele biochemische Wege werden über die Stabilität von mRNA reguliert. Diese wird durch die Wechselwirkung mit Proteinen bestimmt. Ein Beispiel hierfür ist der Eisenstoffwechsel in Säugetierzellen. Über den Transferrin-Rezeptor (TR) nimmt die Zelle Transferrin, welches Eisen transportiert, auf. Bei Eisenmangel ist die TR-mRNA stabil, wird aber bei Eisenüberschuß rasch abgebaut. Diese Regulation wird über fünf Stammschleifenstrukturen in der 3'-Nicht-Kodierungsregion der TR-mRNA vermittelt. An diese als IRE (iron response element) bezeichnete Struktur bindet bei Eisenmangel das IRE-Bindeprotein, stabilisiert diese und verhindert so den Abbau der TR-mRNA⁴⁷. Gefaltete RNA-Domänen können ebenfalls als Katalysatoren fungieren. Solche RNAs, die über katalytische Aktivitäten verfügen bezeichnet man als

Ribozyme. Eine große Gruppe bilden die Spleißosome, die in der Lage sind, RNA-Stränge zu spalten. So wird der Prozeß des mRNA-Spleißens von snRNPs (**s**mall **n**uclear **r**ibonucleoproteins) katalysiert, welche sich zu dem Spleißosom zusammensetzen und neben RNA-Komponenten mit ausgeprägter Sekundärstrukturfaltung mehrere kleine Proteine enthalten⁴⁸.

1.3.1 RNA-Liganden als therapeutische Moleküle

Die Entwicklung von pharmazeutisch wirksamen Substanzen setzt die Kenntniss der molekularen Struktur des Zielmoleküls voraus. In der Vergangenheit zielten pharmazeutische Wirkstoffe hauptsächlich auf Proteine wie Enzyme, Rezeptoren sowie auf Proteine mit Signalfunktion ab. Heute sind ca. 14000 Proteinstrukturen, jedoch nur 400 RNA-Strukturen bekannt^{49,50}. Lange Zeit wurde angenommen, dass RNA nur eine Vermittlerrolle zwischen DNA und Protein spielt, über keine strukturelle sowie funktionelle Komplexität verfügt und somit nicht als Angriffsort für Interventionen dienen kann. Weitere Untersuchungen der RNA und deren Wechselwirkungen mit natürlichen und synthetischen Liganden brachten neue Erkenntnisse über die strukturelle Komplexität, die der der Proteine ähnelt⁴⁹⁻⁵¹. So spielt die RNA eine Rolle bei einer Vielzahl von biochemischen Wegen, die auf der Liganden (Peptide, Proteine)-RNA-Wechselwirkung beruhen, wie z.B. beim Spleißvorgang als Teil des Spleißosoms oder der Kontrolle der Genexpression^{47,48}. Daher sind die Bindestellen für Proteine auch potentielle Zielstrukturen für die Bindung von pharmazeutischen Wirkstoffen^{52,53}. Die strukturelle und funktionelle Diversität sowie die Komplexität der RNA-Protein-Komplexe erschwerte jedoch das Design von Molekülen, die auf der RNA-Struktur basieren⁴⁹. Der technische Fortschritt in der Strukturbestimmung, der Synthese der RNA, sowie die Entwicklung von neuen kombinatorischen Verfahren wie Phagen-Banken und SELEX (**s**ystematic **e**volution of **l**igands by **e**xponential **e**nrichment) haben das Design von neuen Substanzen ermöglicht^{54,55}. Die Methode des Phage-Display basiert auf der Durchmusterung von Phagen-Banken nach funktionalen, spezifischen Liganden (Antikörper, Peptide, Kap.1.5), die an die RNA binden und somit die Protein-RNA-Interaktion unterbinden⁵⁸. Mit der SELEX-Technik werden aus einer Bibliothek von RNA-Sequenzen RNA-Aptamere selektiert, die als Liganden hochspezifisch an Proteine und andere Moleküle binden und diese inhibieren können^{56,57}. Vorteil dieser Methoden ist die Identifikation von spezifischen Molekülen in einem überschaubaren Rahmen^{44,46,59}.

Viele RNA-bindenden Proteine sind in hohem Masse basisch geladen und zeichnen sich durch einen hohen Anteil der Aminosäure Arginin (ARM - Arginine rich motifs) aus. Die hohe Affinität basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen mit Nucleinsäuren, die durch die Ausbildung einer Bindungstasche, durch die dreidimensionale Struktur der RNA, stabilisiert werden^{46,59}. Ein prominentes Beispiel ist das argininreiche Tat-Protein, das an die Buldge-Region der TAR-Stammsschleife über Wasserstoffbrücken bindet⁴⁴. Diese Interaktion kann durch den Einsatz eines Tripeptids mit der Sequenz [(L)Lys-(D)Lys-(L)Asn] inhibiert werden^{60,137}.

Eine weitere Gruppe von Wirkstoffen bilden die Aminoglykoside. Aminoglykoside sind niedermolekulare Substanzen, die aus glykosidisch miteinander verbundenen Aminozuckern bestehen und selektiv an RNA binden^{59,61}. Durch die negative Ladung der Peptid/Proteinbindungstaschen innerhalb der RNA, bilden diese ein optimales Milieu für die positiv geladenen Aminoglykoside wie Streptomycin, Neomycin⁶². Diese Antibiotika sind seit Jahren bekannt und werden oft im Kampf gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien eingesetzt⁶³. Diese Substanzen sind hochspezifisch für die eubakterielle 16S rRNA, welche sich lediglich durch einen Basenaustausch von eukaryontischer rRNA unterscheidet. Durch Bindung der Aminoglykoside an die 16S rRNA in bakteriellen Ribosomen kommt es zum Abbruch der Proteinsynthese⁶⁴. Neueste Erkenntnisse zeigten, dass Aminoglykoside ebenfalls an virale RNA-Strukturen binden. So wird die Bindung des HIV-1 Tat-Proteins an die TAR-Stammsschleife durch den Einsatz von Neomycin inhibiert⁶⁵.

Eine dritte Klasse von RNA-bindenden Molekülen bilden die Zn-Finger-motive, die aus einer α -Helix und β -Faltblatt bestehen und durch ein Zn^{2+} -Ion stabilisiert werden^{44,46,66}. Dazu gehört das HIV-1 NCp7-Protein, das an der Verpackung der viralen RNA in neue Partikel beteiligt ist⁴⁴. Auf die Interaktion zwischen der Ψ -RNA und dem p55^{Gag}-Protein wird im folgenden Kapitel eingegangen.

1.4 Die Verpackung viraler RNA-Genome in Viruspartikel

Eine zentrale Rolle in der späten Phase des HIV-1-Replikationszyklus spielt die Verpackung des viralen Genoms in neue virale Partikel. Dieser Prozess, bei dem aus einer Vielzahl von zellulären und viralen, gespleißten und ungespleißten m-RNA's, selektiv die virale genomische RNA in die neu

entstehenden Partikel eingeschleust wird, ist hochspezifisch und beruht auf dem Zusammenspiel aus cis- und trans-aktiven Elementen. Bei dem als Assembly bezeichnetem Vorgang, der an der Zellmembran stattfindet, spielen RNA-Protein-Interaktionen eine essentielle Rolle. Die Spezifität dieser Wechselwirkungen basiert auf der Erkennung einer als Ψ -Region (Abbildung 1-7A) bezeichneten RNA Struktur durch die NCp7-Domäne des viralen Gag-Proteins (Abbildung 1-6B)^{17,37,38,67-69}.

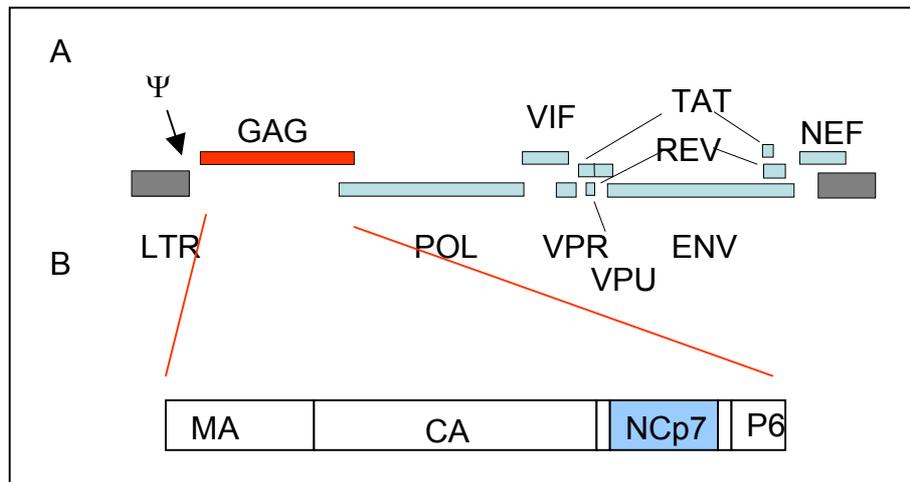


Abbildung 1-6: A: Lokalisation des Ψ -Elementes im HIV-1-Genom. B: Lokalisation der NCp7-Domäne im p55^{Gag}-Polyprotein. Blau hervorgehoben ist die NCp7-Domäne, die an der RNA-Verpackung beteiligt ist (U. Dietrich).

Zwischen der PBS und dem AUG-Startcodon (Abbildung 1-4A und 1-6A) des p55^{Gag}-Polyproteins befindet sich eine 120nt lange, purinreiche Sequenzfolge, die als Ψ -Region bezeichnet wird und eine essentielle Rolle bei der Verpackung der genomischen RNA in neue Viruspartikel spielt¹⁸. Dieses als Verpackungssignal bezeichnete Motiv verfügt über eine ausgeprägte, aus vier Stammschleifen SL1-4 bestehende dreidimensionale Struktur (Abbildung 1-7A). Sie ist neben der Verpackung auch an anderen viralen Prozessen beteiligt. Die Stammschleifen sind durch Linkersequenzen von 4-13nt voneinander getrennt^{16,23,71,72}. Die erste Stammschleife SL1, welche auch als DIS (**d**imerization **i**nitiation **s**ite) bezeichnet wird, ist in die Dimerisierung zweier RNA-Moleküle, durch die Ausbildung einer Kissing-Loop-Struktur, involviert. Dabei interagieren zunächst zwei RNA-Moleküle über antiparallele, palindromische Sequenzen in der SL1-Region miteinander, wodurch eine Dissoziation der Stamm-Struktur initiiert wird. Durch die Verbindung der komplementären Sequenzen der beteiligten Stammschleifen kommt es zur Ausbildung einer RNA-Duplex^{18,73,74}. Dieses RNA-Dimer gewährleistet, dass zwei RNA-Stränge in die knospenden Viruspartikel verpackt werden¹¹. Die

zweite Stammschleife (SL2) wird als SD (splice donor site) bezeichnet, da sie die Spleiß-Donor-Sequenz enthält²³. Da gespleißte RNA-Moleküle nicht über das komplette Verpackungssignal verfügen, wird durch die Überlappung der Spleißdonorstelle mit der Ψ-Region, die Verpackung der vollständigen, ungespleißten vRNA gewährleistet^{18,75}. Obwohl alle Stammschleifen der Ψ-Region für die Verpackung des Virusgenoms wichtig sind, spielt die Stammschleife 3 (SL3, Abbildung 1-7B), die zwischen verschiedenen HIV-Stämmen konserviert ist, eine zentrale Rolle. So konnte SL3 in Verbindung mit heterologen RNA-Fragmenten die Verpackung dieser RNA's in VLP (virus like particles) vermitteln^{24,38,68}. Die Stammschleife 3 hat eine Länge von 14 nt und ist durch ein GGAG-Tetraloop, das in die Bindung an das NCp7 direkt involviert ist, gekennzeichnet (Abbildung 1-7A)^{86,168}. Der Stamm nimmt durch die Interaktion der C⁵ und G¹⁰ Basen eine A-helikale Form (Abbildung 1-7B, 1-9A), die durch eine enge aber tiefe Furche gekennzeichnet ist, an. Durch die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken zwischen den Tetraloopbasen G⁶ und G⁹ werden die G⁷ und A⁸ Basen der Schleifenregion aus dem Komplex nach außen exponiert (Abbildung 1-7B und 1-9D), wodurch die Wechselwirkung mit dem NCp7-Protein erleichtert wird³⁸. Die vierte Stammschleife SL4 enthält das AUG-Startcodon für das p55^{Gag}-Protein⁷⁰.

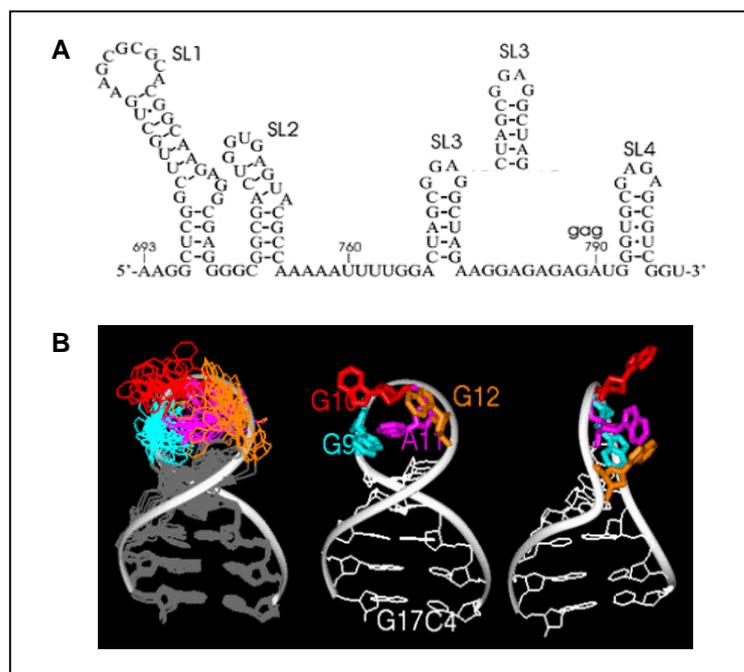


Abbildung 1-7: A: Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur der HIV-1NL₄₋₃ Ψ-Region. SL1 - Dimerisationsschleife, SL2 - Spleißdonorstelle, SL3 - Verpackungsschleife, SL4 - AUG-Startcodon für das Gag-Polypeptid (verändert nach Amarasinghe et al. 2001)⁷⁰. **B: NMR-Struktur der SL3.** Links: rMD (restrained molecular dynamics)-Struktur der SL3 **Mitte:** Hervorgehoben sind die Basen des Tetraloops, die SL3 nimmt eine A-helikale Form an. **Rechts:** durch die Bindung an das NCp7 verändert sich die Struktur der SL3, in dem sich die obere Region etwas etwindet (verändert nach Pappalardo et al.1998)¹⁸.

Obwohl die SL3 bei der Erkennung der viralen RNA durch das NCp7 eine zentrale Rolle spielt, weisen Deletionsstudien auf eine kooperative Beteiligung der anderen Stammschleifen, vor allem aber SL2, hin. Es wird davon ausgegangen, dass SL3 die primäre Determinante der Spezifität darstellt⁶⁸⁻⁷⁵. So konnte die Deletion der SL3 keine vollständige Reduktion der RNA-Verpackung bewirken (Reduktion um ca. 80% verglichen mit WT)⁷³. Wurden die SL1, SL2 und SL4 deletiert, so konnte eine Reduktion um 60%, 20% bzw. 56% erreicht werden^{75,76}. Betrachtet man dagegen die Affinitäten der einzelnen Stammschleifen zum NCp7, so fällt auf, dass sowohl SL3 als auch SL2 vergleichbare K_D -Werte aufweisen. Die Affinität von SL3 liegt bei $28 \pm 3 \text{ nM}$, die der SL2 bei $23 \pm 2 \text{ nM}$. Die Affinitäten von SL1 und SL4 sind deutlich geringer und liegen bei $100 \pm 10 \text{ nM}$ bzw. $320 \pm 30 \text{ nM}$ ^{35,75,77-79}. Aufgrund der geringen Affinität wird angenommen, dass diese Stammschleifen eine stabilisierende Wirkung auf die Tertiärstruktur der RNA haben⁷⁰.

Das NCp7 (Abbildung 1-8), das neben der Ψ -Region in die Verpackung der viralen RNA involviert ist, wird als C-terminale Domäne des p55^{Gag}-Vorläuferproteins an zytoplasmatischen Ribosomen translatiert und zeichnet sich durch eine konservierte Region aus 14 Aminosäuren, die Cys-His-Box, aus. Die Cys-His-Box (CCHC) besitzt eine hohe Homologie zu dem DNA/RNA bindenden Zinkfingermotiv, das in vielen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren vorkommt. Es ist durch eine kanonische Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys (wobei X-eine variable AS darstellt) Aminosäureabfolge und die Fähigkeit, Zinkionen zu komplexieren, gekennzeichnet. Diese Region spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung der RNA und ist für die Spezifität der Bindung verantwortlich. Mit Ausnahme der Spumaviren ist diese Region bei allen Retroviren konserviert und kommt in einfacher oder doppelter Ausführung vor^{14,23,38,44,80}. Mutationen, die diese Struktur zerstören, verhindern die Verpackung der viralen RNA und resultieren in der Knospung von nicht infektiösen bzw. instabilen Viruspartikeln^{75,81-84,164}. Das Nukleokapsid bildet die Hauptbindedomäne und zeigt Affinität die äquivalent zu der des kompletten Gag-Proteins ist⁸⁰.

Das NCp7-Protein des HIV-1 zeichnet sich durch zwei Zinkfinger motive (ZF) und einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren (AS) aus. Sie sind für die optimale „Chaperonaktivität“ bei der Verpackung der viralen RNA verantwortlich⁸⁰. Der erste ZF1 (Val¹³-Ala³⁰) besteht aus vier basischen und einer sauren Aminosäure, wohingegen ZF2 (Gly³⁵-Glu⁵¹) aus drei basischen und drei sauren Aminosäuren besteht³⁸. Die Seitenketten der Aminosäuren

Val¹³, Phe¹⁶, Ile²⁴ und Ala²⁵ des ZF1 bilden eine hydrophobe Rinne, wobei Phe¹⁶ und Ala²⁵ an der Basis lokalisiert sind. Ähnlich ist der ZF2 strukturiert. Hier wird die hydrophobe Rinne durch die Seitenketten von Trp³⁷, Gln⁴⁵ und Met⁴⁶ gebildet^{17,38}. Die Motive sind durch eine basische Linkerregion (Pro³¹-Arg³²-Lys³³-Lys³⁴) getrennt und werden N- und C-terminal durch die Aminosäure Met¹-Thr¹² und Arg⁵²-Asn⁵⁵ flankiert (Abbildung 1-8). Die N-terminalen Reste Lys³ und Arg¹⁰ bilden eine 3₁₀-Helix^{38,89}.

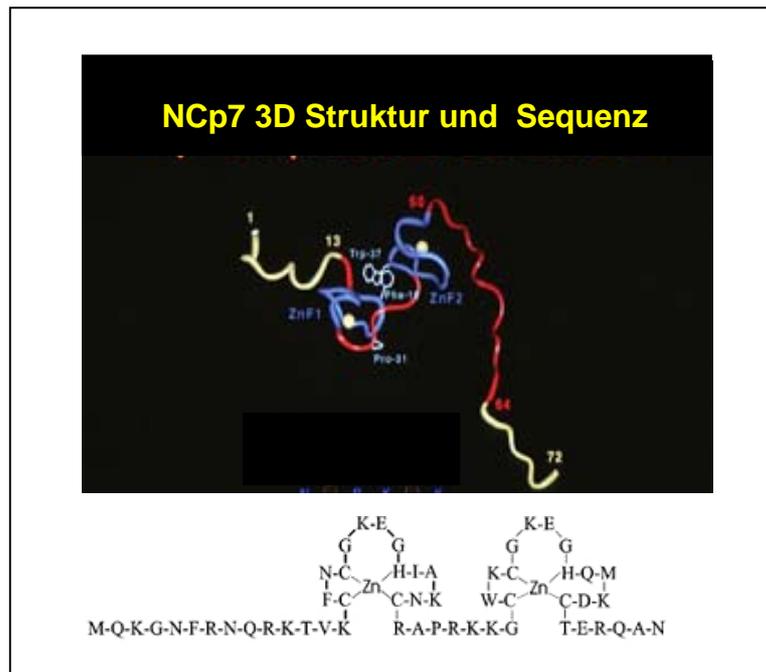


Abbildung 1-8: 3D-Struktur und Aminosäuresequenz des HIV-1NL₄₋₃ NcP7-Proteins mit beiden Zinkfinger-Motiven. Die Zinkfinger-Motive, in blau dargestellt, sind in die Bindung der SL3 involviert (Fourth International Retroviral NC Symposium, 14-17.09.2003 Faculte de Pharmacie, Straßbourg; verändert nach Amarasinghe et al. 2001)⁷⁰.

1.4.1 NMR-Auflösung der SL3-NCp7-Interaktion

Untersuchungen der SL3-NCp7-Interaktion mittels verschiedener *in vitro* Methoden wie EMSA¹⁶⁷, NOE (**N**uclear **O**verhauser **E**nhancement), NMR³⁸, isothermale Kalorimetrie⁷⁰, North-Western Blot¹⁶⁶, Fluoreszenz und Phosphoreszenzspektroskopie^{35, 88}, ESI (**e**lectro **s**pray ionozation) und FTMS (**F**ourier **t**ransform **m**ass spectrometry)⁷⁸ lieferten die Auflösung des SL3-NCp7-Komplexes.

Die Verpackung der viralen RNA beruht auf der spezifischen Interaktion beider Zinkfinger-Motive des NCp7 mit der SL3-Struktur der Ψ-Region. So binden die konservierten basischen Aminosäure der N-terminalen 3₁₀-Helix des NCp7 an die Phosphodiestergruppen der SL3-Stammregion. Dabei

interagieren Lys³-G¹⁰, Arg⁷-C¹, Arg¹⁰-U² und Lys¹¹-G⁴ miteinander (Abbildung 1-9C). Neben der unspezifischen Interaktion bilden die Carbonylseitenketten von Asn⁵ eine Wasserstoff-Brücke zum C¹¹, G⁹ und G¹⁰. Elektrostatische Wechselwirkungen, die die Abstoßungskräfte zwischen den Basen neutralisieren, sind ebenfalls zwischen Lys⁴² und dem 3'- und 5'-Phosphodiester des G⁷ zu finden. Sie dienen der Verankerung des ZF2 an die RNA. Gleiches gilt für das ZF1. Hierbei geht Lys²⁶ elektrostatische Wechselwirkungen mit dem 3'-Phosphodiester des G⁹ ein.

Zusätzlich binden beide Zinkfinger spezifisch an die exponierten Guanosine des SL3-Tetraloops, die normalerweise Watson-Crick-Baserpaarungen in A-Helices eingehen (Abbildung 1-9A)⁸, was der primäre Grund der Sequenzspezifität der Bindung sein könnte. Dabei interagiert zunächst das G⁹ über die Bildung von Wasserstoff-Brücken zu den Aminosäuren Phe¹⁶, Ala²⁵ und Lys¹⁴ der hydrophoben Rinne des ZF1. Das G⁷ bindet auf ähnliche Weise an die hydrophobe Rinne des ZF2 über Wasserstoff-Brücken zum Trp³⁷ und Met⁴⁶ sowie dem Gly³⁵ (Abbildung 1-9B). Die A⁸-Base interagiert über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Phe¹⁶, Asn¹⁷ und Ala²⁵ des ZF1 (Abbildung 1-9C) und bildet zusätzlich eine H-Brücke zum Arg³², welches unter allen HIV-Stämmen stark konserviert ist³⁸. Mutationen des Arginins resultieren in der Knospung von nicht infektiösen Partikeln¹⁶⁵.

Von den 14 basischen AS mit konservierten Argininen und Lysinen partizipieren 10 an der Ausbildung inter- und intramolekularen Wechselwirkungen. Die Salzbrücken zwischen Lys¹⁴ - Glu²¹ und Lys³⁸ - Glu⁵¹ haben einen stabilisierenden Effekt auf die Faltung der beiden Zinkfinger, zusätzlich ist die Salzbrücke zwischen Lys³³ - Glu⁴² für Stabilisierung der ZF2-Linker-Interaktion verantwortlich. Die Seitenketten der Lys²⁰, Arg²⁹ und Lys³⁹ sind nach außen projiziert und bilden keine Salzbrücken mit dem Komplex³⁸.

Zu den Intraprotein-Wechselwirkungen mit stabilisierendem Effekt gehören die hydrophoben Interaktion der AS Phe⁴ der 3₁₀-Helix mit dem Phe¹⁶, Asn¹⁷ und Gly¹⁹ des ZF1 sowie von Phe¹⁶ und Trp²⁷ des ZF2. Die AS Pro³¹-Lys³⁴ der Linkerregion nehmen eine Konformation an, die durch Wasserstoff-Brücken stabilisiert wird³⁸. Mutationen die diese Region betreffen resultieren in nicht infektiösen Partikeln¹⁶⁵. Durch diese Interaktionen wird die Sekundärstruktur der RNA-Region destabilisiert, was die Bindung weiterer NCp7-Proteine an die RNA ermöglicht^{38,80,85,86,87}.

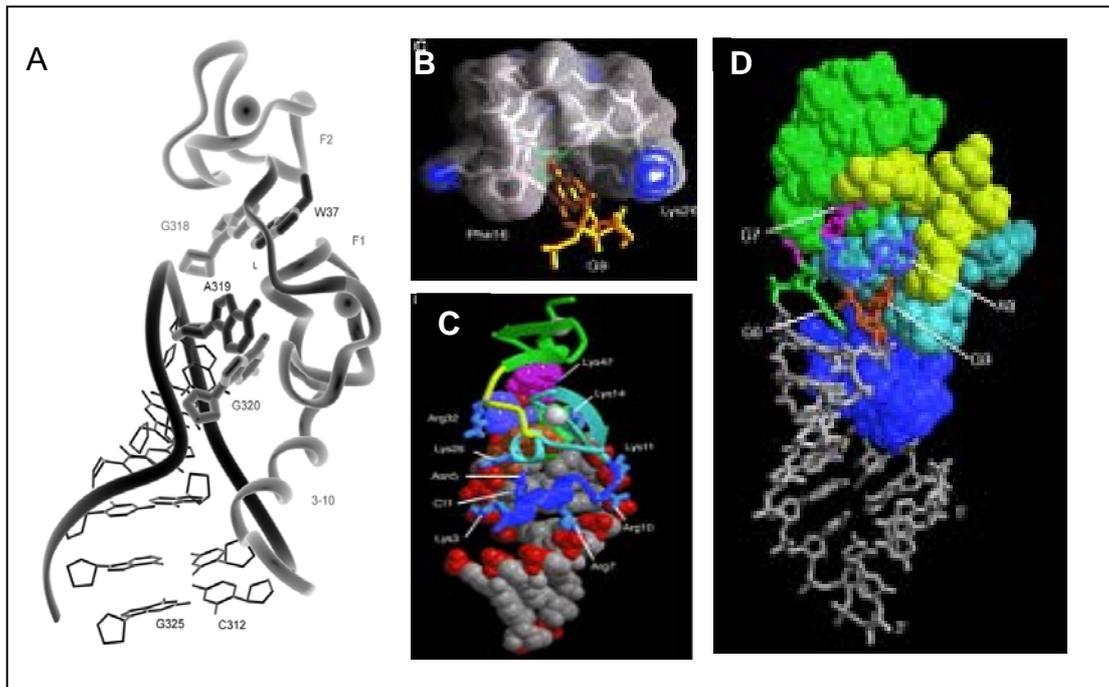


Abbildung 1-9: 3D Abbildung des SL3-NCp7-Komplexes. **A: Graphische Darstellung des SL3-NCp7-Komplexes** (verändert nach Paoletti et al. 2002)⁷⁷ **B: GRASP-Darstellung.** Interaktion zwischen dem G⁹ der GGAG-Tetraloop mit dem Phe¹⁶ des ZF1. Die Bindung des G⁷ an des Trp³⁷ des ZF2 erfolgt analog. **C: Kalottenmodell des SL3-NCp7-Komplexes.** **D: Kalottenmodell des SL3-NCp7-Komplexes.** Hervorgehoben ist die G⁷ – ZF2 und G⁹ - ZF1-Interaktion. (verändert nach DeGuzman et al. 1998)³⁸ (3₁₀-Helix violett, ZF1 - blau, ZF2 - grün, Linkerregion - gelb, Zinkatome - weiße Kugeln, RNA - grau, G⁷ - pink, G⁹ - orange).

Weitere Untersuchungen konnten die Beteiligung der SL2 an der Ψ-NCp7-Interaktion nachweisen. So bindet das NCp7-Protein über das Trp³⁷ an das G⁷ der GGUG-Schleife. Die an dieser Interaktion beteiligten Stapelkräfte sind jedoch schwächer als die von NCp7 und SL3^{75,88}.

1.4.2 Modell für den initialen Komplex zwischen Ψ und NCp7

Basierend auf den Ergebnissen der vorausgegangenen Studien wurde ein Modell für den initialen Komplex der RNA-Verpackung aufgestellt (Abbildung 1-10). Dabei vermitteln die basischen AS die unspezifische Bindung an die Nucleinsäuren, die Spezifität wird durch die Zn-Finger gewährleistet. Danach bildet die SL1 eine Duplex, welche die dimere Form des Genoms stabilisiert. SL4 ist nicht in die NCp7-Bindung involviert. Stattdessen übt sie einen stabilisierenden Effekt auf die tertiäre Struktur des Ψ-Elementes durch RNA-RNA-Interaktionen aus. Die korrekte Faltung führt zur Exposition von SL2 und SL3 aus der Struktur heraus, wodurch diese von der NCp7-Domäne des Gag-Multimers gebunden werden. Die direkte Erkennung der SL2 durch das

NCp7-Protein vermittelt die Selektion von ungespleißten viralen RNA-Molekülen^{67,70,75,85}. In diesem Modell besteht der Erkennungskomplex aus vier Gag-Molekülen, die an die Dimere Ψ -Region gebunden sind. Durch weitere unspezifische und schwächere Wechselwirkungen zwischen Gag-Polyproteinen und der RNA, wobei ein NCp7 7nt bindet, werden ca. 1500-2000 Gag-Proteine während der Knospung mit der Nukleinsäure assoziiert^{79,80}.

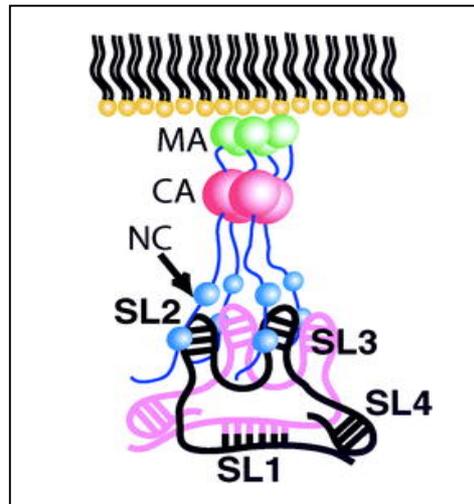


Abbildung 1-10: Modell für den initialen Komplex, der zwischen NCp7-Domäne des Gag-Proteins und der Ψ -Region der viralen RNA gebildet wird (Amarasinghe et al 2001)⁷⁰.

1.4.3 Knospung viraler Partikel

Die Knospung viraler Partikel findet an der zytosolischen Seite der Zellmembran statt und wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Eingeleitet wird der Knospungsprozess durch die Assoziation der Gag-Polyproteine mit der Zellmembran. Dies geschieht über eine N-terminale Myristylgruppe, die cotranslational an die Matrix-Domäne angehängt wurde, und die Affinität des Proteins zur Zellmembran erhöht^{11,37}. Durch kontinuierliche Addition von weiteren Gag-Molekülen wird die Knospung von sphärischen Partikeln gefördert⁹⁰. Eine besonders wichtige Aufgabe in der späten Phase des Replikationszyklus übernimmt das p6-Protein, das zur Unterstützung des Knospungsprozesses zelluläre Faktoren rekrutiert. Über das PTAP-Motiv, das unter den Retroviren konserviert ist, wird das Tsg101-Protein (tumor susceptibility gene 101) gebunden^{69,91,92}. Das Tsg101-Protein ist ein Homolog zu E2-Ubiquitin-Konjugase, die die Ubiquitinierung von Membran-gebundenen Proteinen in Lysosomen übernimmt und somit deren Degradation einleitet^{37,93-95}. Die Bindung stimuliert die Ubiquitinierung der Lysinreste des

Gag-Polyproteins^{37,69,95}, wodurch die Knospung und auch die Abschnürung der neuen Partikel eingeleitet wird^{11,96}.

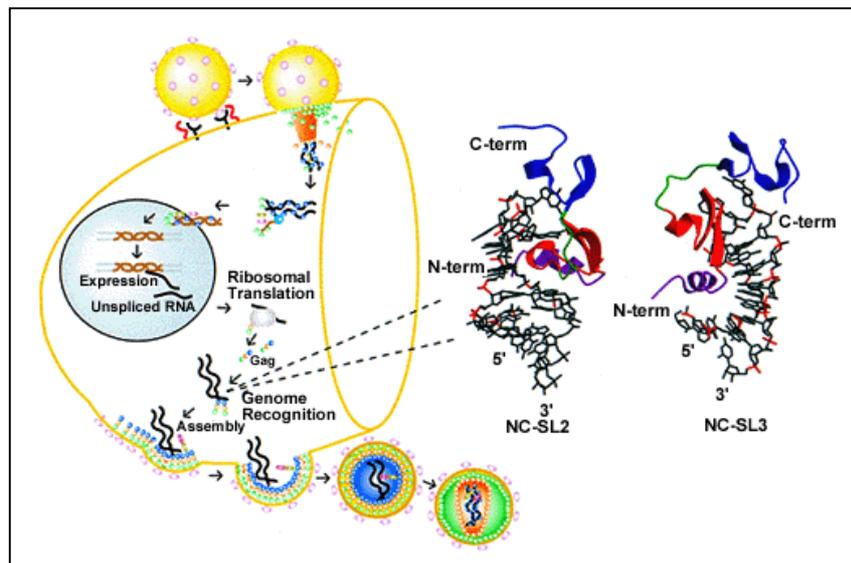


Abbildung 1-11: Prozess der Verpackung der viralen RNA an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Hervorgehoben ist die Ψ -NCp7-Interaktion (Amarasinghe et.al 2000, Titelblatt des Journal of Molecular Biology Vol. 301)⁷⁵.

1.4.4 Ψ -NCp7-Interaktion als antivirales Ziel

Da die Verpackung der viralen RNA einen essentiellen Schritt im HIV-1-Replikationszyklus darstellt, bietet sie sich als interessantes Angriffsziel für antivirale Interventionen an. Dabei eignet sich nicht nur die Ψ -RNA aufgrund ihrer einzigartigen Struktur, sondern auch der Interaktionspartner, das NCp7-Protein, das über konservierte Bindungsdomänen verfügt, für das Design von therapeutisch wirksamen Molekülen. Dass diese Strategie prinzipiell funktioniert zeigten vorangegangene Studien.

1.4.4.1 Antisense-RNA

Durch den Einsatz von Antisense-RNA gegen die Ψ -Region konnte eine signifikante Inhibition der Virusreplikation in der Zellkultur erzielt werden. Dabei wurden zwei verschiedene Fragmente, die die virale Replikation auf verschiedenen Ebenen inhibierten, identifiziert. Während das S3-Fragment (84nt), das sich gegen die SL2/ Ψ -Region (708-764 Position im HIV-1 HXB2) richtete, die Replikation auf der Ebene der Proteinexpression inhibierte, entfaltete das L3-Fragment (425nt), das eine Sequenz (675-1073 Position im

HIV-1 HXB2) zwischen der PBS und dem N-terminalen Teil des des Gag-Proteins umspannte, seine inhibitorische Wirkung bei der Verpackung der RNA⁹⁷.

1.4.4.2 Aptamere

Mit Hilfe der Selex-Methode können aus einer kombinatorischen Oligonukleotid-Bibliothek RNA-Aptamere angereichert und isoliert werden, die hochspezifisch an Zielmoleküle binden. Der Einsatz des Verfahrens lieferte RNA-Aptamere von 50nt, die keinerlei Homologie zur Ψ -RNA aufwiesen und durch Ausbildung einer Stammschleifenstruktur charakterisiert waren. Die Aptamere haben an die NCp7-Domäne des Gag-Proteins im nanomolaren Bereich gebunden¹⁵⁹. Für ein Aptamer, das an die NCp7-Domäne des Gag-Proteins bindet, konnten antivirale Eigenschaften in der Zellkultur bestätigt werden. Es handelte sich hierbei um ein 70nt langes N70-13-Aptamer, das intrazellulär exprimiert (Intramer), die virale Replikation unterdrücken konnte. Ob dieser Effekt der Inhibition der Bindung an die Ψ - oder TAR-Region zuzuschreiben ist muss, noch geklärt werden¹¹⁶.

1.4.4.3 Zinkfinger-Inhibitoren

Auch der Einsatz von Zinkfinger-Inhibitoren, welche die Cysteine in den CCHC-Boxen modifizieren, zeigte antivirale Eigenschaften. Durch den Einsatz von (DIBA - Disulfid substituierte Banzamide) kommt es zur Vernetzung von Zinkfingermotiven. Dies hat einen inhibierenden Effekt auf die Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins in die einzelnen Komponenten und resultiert in der Knospung von nichtinfektiösen Partikeln^{82,83}.

1.4.4.4 Aminoglykoside

Ein weiterer Versuch war der Einsatz von Aminoglykosiden, die sich beim Kampf gegen Gram-positive und -negative Bakterien bewährt haben⁶³. Aufgrund der kationischen Eigenschaften sind sie in der Lage mit dem negativ geladenen Rückgrad der RNA zu interagieren, Metallionen aus den Proteinen zu verdrängen und Strukturveränderung innerhalb der RNA hervorzurufen^{59,61,62}. Diese Strukturänderung führt zur Hemmung der Interaktion mit dem nativen Liganden und der damit verbundenen Prozessen.

Für das Paromycin, NeomycinB und das Neomycinanalog Neo-Guanidino konnte CD-spektroskopisch und durch Footprintinganalyse eine Bindung im mikromolaren Bereich an die SL1- und SL2-Stammsschleifen der Ψ -Region nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden bei NeomycinB und Neo-Guanidino und Neo-Neo (ein weiteres Neomycinanalog) strukturverändernde Eigenschaften festgestellt. Ob diese Verbindungen in der Lage sind die Ψ -NCp7-Interaktion zu unterbinden, sowie über deren antivirale Eigenschaften *in vivo* gibt es noch keine Publikationen^{162,163}.

Bis heute konnten jedoch keine spezifischen Inhibitoren der Verpackung der viralen RNA, die die *in vivo* Interaktion zwischen dem NCp7 und der Ψ -Region hemmen, identifiziert werden. Aus diesem Grund sollte die Phage-Display-Technologie zur Selektion spezifischer Verpackungsinhibitoren eingesetzt werden. Die neuen Substanzen könnten die bekannten Therapieansätze komplementieren.

1.5 Phage Display

Die Phage-Display-Technologie ermöglicht eine schnelle Identifikation von Liganden für eine Vielzahl von Zielmolekülen wie z.B. Antikörper, Rezeptormoleküle, Enzyme, Proteine⁹⁸. Sie konnte ebenfalls erfolgreich bei der Suche nach RNA-Liganden eingesetzt werden. So konnten für die U1 snRNP aus einer Antikörper exprimierenden Phagen-Bank spezifische Liganden isoliert werden⁹⁹. Ebenfalls erfolgreich konnte ein Inhibitor der Tat-TAR-Interaktion aus einer Phagen-Bank selektioniert werden¹⁰⁰. Des Weiteren wurde ein Zinkfinger-haltiges Peptid für das RRE Motiv identifiziert^{66,101}.

Ermöglicht wurde dies durch die Entwicklung eines Expressionsvektors für den M13-Bakteriophage durch die Arbeitsgruppe um Scott¹⁰²⁻¹⁰⁴. Die Methode des Phage-Display basiert auf einer Affinitätsselektion von Peptiden, die als Fusionsprotein mit dem Hüllprotein an der Oberfläche eines Bakteriophagen exprimiert werden. Die peptidcodierende Sequenz ist im Phagen genom an die Sequenz des Hüllproteins pIII oder pVIII des M13 Phagen gekoppelt. Die Kopienzahl eines Peptids an der Phagenoberfläche hängt davon ab, mit welchem Hüllprotein es fusioniert wurde. Ist das Peptid mit dem pVIII fusioniert, so liegt die Kopienzahl/Phage bei mehreren Hundert, ist das Peptid an das pIII-Hüllprotein gekoppelt, so werden drei

Peptidkopien/Phage exprimiert ^{102,104}. Bei den im Versuch eingesetzten Phagen-Banken handelt es sich um an pIII-gekoppelte Peptide. Die verwendeten Phagen-Banken haben eine Diversität von $2-4 \times 10^9$, wobei jeder Phage 70 mal vorkommt. Die Peptidinserts haben gewöhnlich eine Länge von 7-20 AS und können als lineare Sequenz oder flankiert von Cystein-Resten in zyklischer Form vorliegen (Kap.2.1.7).

Für die Suche nach Liganden wird die Zielsequenz (Ψ - bzw. SL3-RNA) mit der Phagenbank inkubiert (Biopanning). Über mehrere positive und negative Selektionsrunden werden RNA-spezifische Phagen, die mit der Zielstruktur interagieren, angereichert. Diese werden anschließend in *E.coli* ER2738 amplifiziert und getitert. Die Spezifität einzelner Phagenklone für das Zielmolekül wird mittels ELISA überprüft. Aus den positiven Phagen wird die einzelsträngige DNA isoliert und die Nukleotidsequenz des Peptidinserts sequenziert. Aus den einzelnen Sequenzen wird anschließend eine Konsensussequenz der RNA-bindenden Peptide erstellt. Die einzelnen Schritte sind in der Abbildung 1-12 graphisch dargestellt.

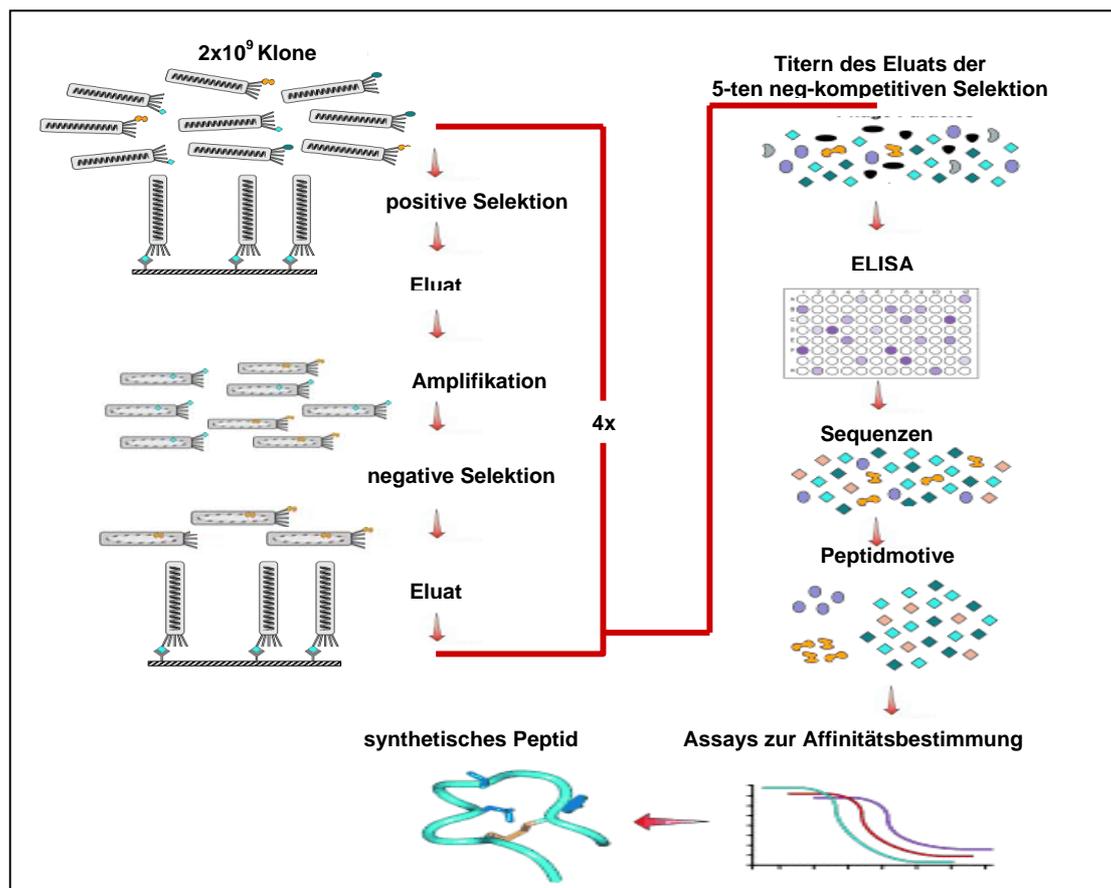


Abbildung 1-12: Graphische Darstellung der positiven und negativen Selektion sowie der weiteren Schritte vom Titern bis zur Herstellung der synthetischen Peptide (verändert nach Sidhu et al. 2003)¹⁵⁸.

1.6 Zielsetzung

Seit Beginn der HIV-Epidemie starben weltweit fast 15 Millionen Menschen an den Folgen einer HIV-Infektion und die Zahl der Neuinfektionen wächst ständig. Zwar wurde durch die medikamentöse Kombinationstherapie (HAART) eine Kontrolle der Virusreplikation und damit auch eine längere Überlebenszeit der Patienten erreicht, aber die Bildung resistenter HIV-Stämme während der Therapie und die hohe Toxizität der Medikamente limitieren die Erfolge von HAART. Dadurch wird die Notwendigkeit von neuen Therapieansätzen deutlich. Somit stand als langfristiges Ziel des Projektes die Entwicklung von neuen antiretroviralen Therapieansätzen gegen das humane Immunodefizienzvirus HIV-1 im Vordergrund.

Da die Verpackung des viralen Genoms ein hochspezifischer und zentraler Prozess im Replikationszyklus des HIV-1 ist, bei dem aus einer Vielzahl von RNA-Fragmenten selektiv die genomische virale RNA selektioniert wird, bietet er sich als Ziel für antivirale Interventionen an. Ausgangspunkt für die Identifizierung von Peptidliganden für die Ψ -Verpackungssequenz, sowie deren Teilelement SL3, bildete der Einsatz der Phage-Display-Methode (Kap.2.4). Weiterhin sollten die identifizierten Peptidliganden in biologischen Assays auf ihre Funktion und antivirale Aktivität getestet werden. Damit soll diese Arbeit Peptidliganden als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Wirkstoffes bereitstellen, die möglicherweise mit der Verpackung der RNA in Viruspartikel interferieren und somit Eingriffe in die späte Phase des Replikationszyklus erlauben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Ambion (Cambridgeshire, UK), AppliChem (Darmstadt), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), MoBiTec (Göttingen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Bestandteile der Nährmedien und Agar zur Anzucht von Bakterien wurden von GibcoBRL (Eggenstein) bezogen. Zur Plasmid-DNA-Isolierung, Virus-RNA-Isolierung und Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurden Kits von Biorad (CA), Qiagen (Hilden) und Peqlab Biotechnologies (Erlangen) verwendet. DNA und RNA-Größenstandards stammten von Ambion (Cambridgeshire, UK), Promega (Madison, USA) und Peqlab Biotech (Erlangen). Medien und Zusätze für die Zellkultur stammten von BioWhittaker (Verviers, Belgien), GibcoBRL (Eggenstein) und MoBiTec (Göttingen). Einwegartikel für die Zellkultur wurden von Costar (Bodenheim) und Greiner (Frickhausen) bezogen.

2.1.2 Kits

Produkt	Hersteller
MegaShort Script™ T7 Kit	Ambion, Inc., Cambridgeshire, UK
Calcium Phosphat Transfektionskit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Innotest™ HIV Antigen mAb	Innogenetics GmbH, Heiden
E.Z.N.A Mini-Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ECL Westernblotting detection reagents	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
IQ SYBR® Green Supermix	BioRad, USA
Quantum Prep™ Freeze´N Squeez	BioRad, USA
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAmp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10g Trypton/Pepton aus Casein 5g Hefeextrakt 10g NaCl ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,0
LB- für Platten	10g Trypton/Pepton aus Casein 5g Hefeextrakt 10g NaCl 15g Agar-Agar ad 1l Aqua dest., pH 7,0
50 x TAE	1220g Tris 285,5g Essigsäure 500ml EDTA (0.5 M) ad 5 l Aqua dest., pH 8,0
2% Natriumazid-Lösung	2g NaN_3 ad 100 ml Aqua dest.
Top-Agar	7g Agarose 5g NaCl 1g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 5g Hefeextrakt 10g Trypton ad 1 l Aqua dest., pH 7,0
5%-iges natives Gel	1,5ml 10 x TBE 1,8ml 40% Acrylamid : Bisacrylamid ad 15ml DEPC-Wasser
10 x TBE	540g Tris 270g Borsäure 200ml EDTA (0.5 M) ad 5 l Aqua dest., pH 8,0

Bezeichnung	Zusammensetzung
8%-iges denaturierendes Gel	7,2g Harnstoff 1,5ml 10 x TBE 3ml 40% Acrylamid:Bisacrylamid ad 15ml DEPC-Wasser
10 x MOPS-Puffer	41,9g MOPS 6,8g Na-Acetat 3,6g EDTA ad 1l DEPC-Wasser, pH7,0
1%-iges MOPS-Gel	1g Agarose 10ml 10 x MOPS 2ml Formaldehyd ad 100ml DEPC-Wasser
10 x SSPE-Puffer	105,4g NaCl 14g NaH ₂ PO ₄ 3,6g EDTA ad 1l Aqua dest., pH 7,7
10 x TBS	79g Tris-HCl 88g NaCl 5ml Tween ad 1l Aqua dest., pH 7,5
0,2M Glycin-HCl	1,12g Glycin – HCl 0,05g BSA ad 50 ml Aqua dest., pH 2,2
1 x PSI /0,05 % Tween	7,4g KCl 1,4g HEPES 500µl Tween20 ad 1l Aqua dest., pH 7,4
20%PEG/2,5M NaCl	100g PEG-6000 73,1g NaCl ad 500ml Aqua dest.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Neutralisationspuffer	7,88g Tris-HCl ad 50 ml Aqua dest., pH 9,1
Phosphat-Citratpuffer	1 Tab Phosphat-Citrat ad 100ml Aqua dest.
DEPC-Wasser	1ml Diethylpyrocarbonat ad 1000ml Aqua dest.
Substratlösung	1 Tab OPD (o-Phenyldiamin Dihydrochlorid) 35ml Phosphat-Citrat-Puffer 25µl H ₂ O ₂
3% Milchpulver/PBS	3g Milchpulver ad 100 ml PBS

2.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen ThermoHybaid Interactiva Biotechnologie GmbH (Ulm) und NEB (Schwalbach) bezogen.

BEZEICHNUNG	SEQUENZ 5' - 3'
RNA-3'bio	CCT TTA GTG AGG GTA ATT CTC G -(5dT)- Biotin
5'bioPSIRNA	Biotin -(5dT)- GCT TAA TAC TGA CGC TCT CGC
Annetsche I	GAG CTC GTT TAG TGA ACC GT
M13 -96 gIII Primer	CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG
T7	GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG
pNL4-3PSId	CCA GAG GAA TTC TCT CGA CGC AGG AC
pNL4-3PSIr	TTC TCC CAA GCT TAA TAC TGA CGC
SL1d	CTC GGC TTG CTG AAG GCG GCA CGG CAA GAG GCG AG
SL4r	ACC GAC GCT CTC GCA CCC AT

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
RFPd-Nhe I	TCG CCG CTA GCG TGC GCT CCT
RFPPr-Nar I	TCT AGA GTC GGC GCC GCT ACA
HWWPWW-Rfp-Vpr d	GGA TGC ATT GGT GGC CTT GGT GGG GTG GAG GTG
HWWPWW-Rfp-Vpr r	CTA GCA CCT CCA CCC CAC CAA GGC CAC CAA TGC ATC CAC
HAWPWW-Rfp-Vpr d	GGA TGC ATG CTT GGC CTT GGT GGG GTG GAG GTG
HAWPWW-Rfp-Vpr r	CTA GCA CCT CCA CCC CAC CAA GGC CAA GCA TGC ATC CGC
HWWAWW-Rfp-Vpr d	GGA TGC ATT GGT GGG CTT GGT GGG GTG GAG GTG
HWWAWW-Rfp-Vpr r	CTA GCA CCT CCA CCC CAC CAA GCC CAC CAA TGC ATC CGC
GSGSGS-Rfp-Vpr d	GGA TGG GTT CTG GAA GTG GTT CGG GTG GAG GTG
GSGSGS-Rfp-Vpr r	CTA GCA CCT CCA CCC GAA CCA CTT CCAGAA CCC ATC CGC

2.1.5 RNA

Die kurzen biotinylierten RNA-Fragmente wurden von der Firma BioSpring (Frankfurt) bezogen. Die CCR5- und Ψ -RNA wurden *in vitro* transkribiert.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Modifikation
SL1 (HIV-1 pNL4-3, Position 697 – 729)	TTT TTC UCG GCU UGC UGA AGC GCG CAC GGC AAG AGG CG	5'- Biotin
SL1mut	TTT TTC UCG GCU UGC UGA AGC GCG CAG UCG UUC AGG CG	5'- Biotin
SL2 (HIV-1 pNL4-3, Position 736 – 753)	TTT TTG GCG ACU GGU GAG UAC GC	5'- Biotin
SL2mut	TTT TTG GCG AUA AAA AGU ACG C	5'- Biotin
SL3 (HIV-1 pNL4-3, Position 764 – 779)	TTT TTG GAC UAG CGG AGG CUA GUC C	5'- Biotin

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Modifikation
SL3mut	TTT TTG GAC UAG CGA AAG CUA GUC C	5'-Biotin/ keine
Ψ (HIV-1 pNL4-3, Position 681-816) AF324493	<u>CGA GAA UUA CCC UCA CUA AAG</u> GGA AUU CUC UCG ACG CAA GGC UCG GCU UGC UGA AGC GCG CAC GGC AAG AGG CGA GGG GCG GCG ACU GGU GAG UAC GCC AAA AAU UUU GAC UAG CGG AGG CUA GAA GGA GAG AGA UGG GUG CGA GAG CGU CAG UAU <u>GCG AGA GCG UCA</u> <u>GUA UUA AGC</u>	keine
CCR5 (Human, Position 735-864) NM_000579	<u>CGA GAA UUA CCC UCA CUA AAG</u> GGA AUU CGA GCU CGG UAC CUG GCU GUC GUC CAU GCU GUG UUU GCU UUA AAA GCC AGG ACG GUC ACC UUU GGG GUG GUG ACA AGU GUG AUC ACU UGG GUG GUG GCU GUG UUU GCG UCU CUC CCA GGA AUC AUC UUU ACC AGA UCU	keine

Fett dargestellt sind die Sequenzen der Ψ-RNA (HIV-1 pNL4-3) und der CCR5-RNA (pcDNACCR5). Rot unterstrichen sind die Bindestellen für das Oligonukleotid RNA-3'bio, die Bindestelle für das Oligonukleotid 5'bio-PsiRNA ist grün unterstrichen. Eingeführte Mutationen sind in blau dargestellt. Fett violett ist die dT-Spacersequenz zwischen dem Biotin und der Nukleotisequenz dargestellt.

2.1.6 Plasmide und Vektorkarten

Bezeichnung	Verwendungszweck	Referenz
pcDNA3-CCR5	Plasmid mit dem CCR5-Gen	Dr. Lijun Wu, LeucoSite Inc., USA
pNL4-3	Plasmid mit dem NL4-3-Genom	Adachi et al. 1986
pF25Gfp-Vpr	Plasmid mit dem Gfp-Vpr-Fusionprotein	AG Stauber, Frankfurt
pF25Rfp-Vpr	Plasmid mit dem Rfp-Vpr-Fusionprotein,	AG Dietrich
pHR'SINcPPT-SRW	Transfervektor mit dem Rfp-Markergen	AG Grez, Frankfurt
PCMV ΔR8.91	Expressionsplasmid den HIV-1 Gag/Pol Proteinen zur lentiviralen Expression	Follenzi et al. 2002
pMD G.2	Expressionsplasmid des VSV-G-Env-Proteins für Virusproduktion	Zufferey et al. 1997
pTriKan18	<i>in vitro</i> Transkriptionsplasmid	Ambion, Cambridgeshire, UK

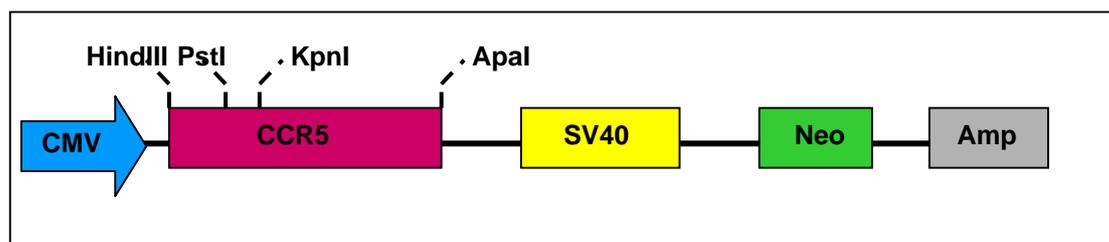


Abbildung 2-1: pcDNACCR5. Humaner CCR5-Rezeptor kloniert zwischen HindIII und Apal unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Die Kontroll-RNA stammt aus dem Abschnitt zwischen PstI - KpnI).

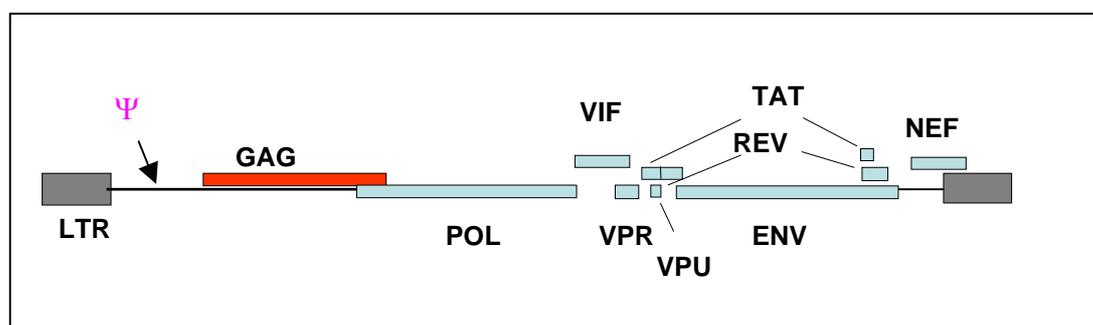


Abbildung 2-2: pNL4-3. Das HIV-1 Genom (pink - Ψ-Verpackungssequenz).

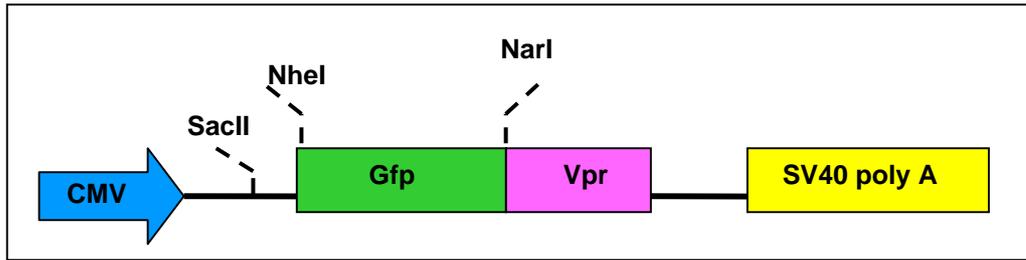


Abbildung 2-3 : pF25 Gfp-Vpr. Vektor mit dem Gfp-Vpr-Fusionprotein, Schnittstellen für die Klonierung von Rfp (NheI/NarI) und der Peptide (SacII/NheI).

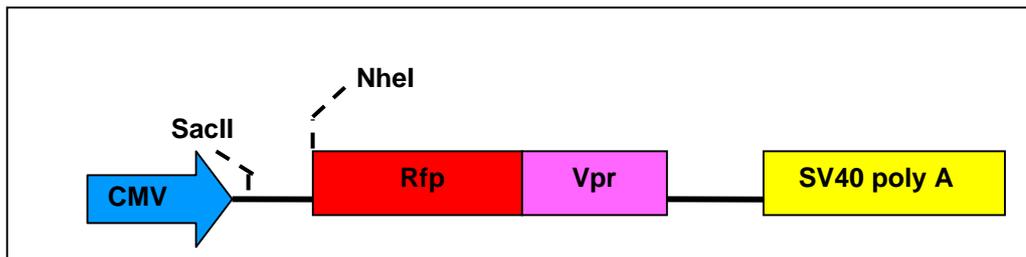


Abbildung 2-4: pF25 Rfp-Vpr. Vektor mit dem Rfp-Vpr-Fusionprotein, Schnittstellen für die Klonierung der Peptide (SacII/NheI).

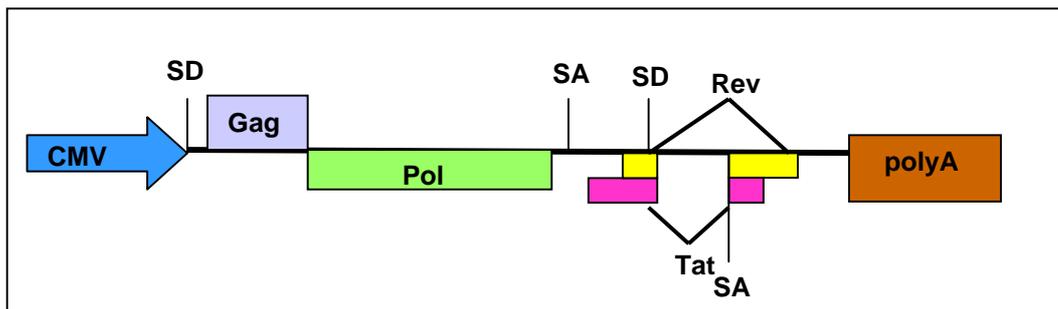


Abbildung 2-5 : pCMV Δ R8.91. Vektor mit den gag-pol-Genen unter CMV-Kontrolle zur Herstellung von replikationsdefekten Lentiviren durch Komplementieren mit dem pMDG.2-Vektor.

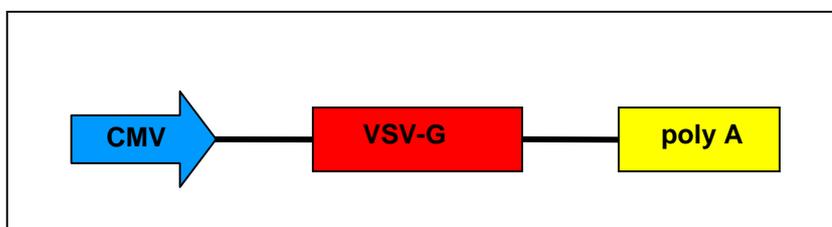


Abbildung 2-6: pMDG.2. pUC18 Vektor mit dem VSV-G Hüllprotein unter CMV-Kontrolle zur Herstellung von Lentiviren durch Komplementieren mit dem dem pCMV Δ R8.91-Vektor.

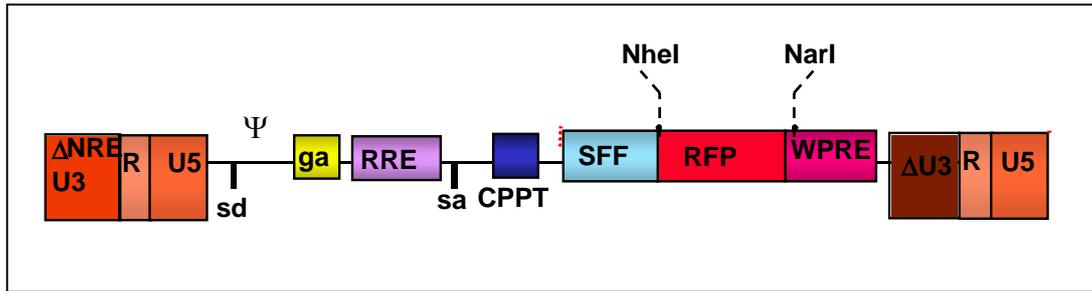


Abbildung 2-7: pHRΨINcPPT-SRW. Vektor mit der Ψ-Sequenz und dem Rfp-Markergen. Das Rfp-Markergen wird mit Hilfe von PCR amplifiziert und für die Klonierung in den pF25 Gfp-Vpr-Vektor eingesetzt.

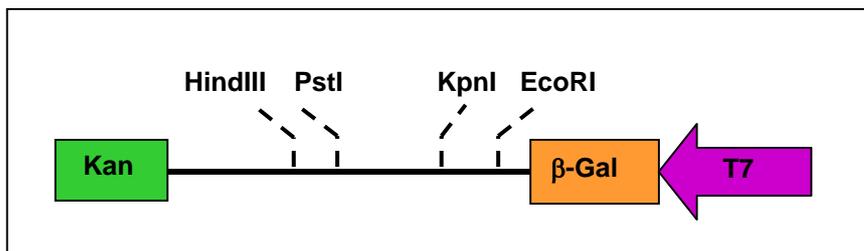


Abbildung 2-8: pTriKan 18-Vektor. Transkriptionsvektor für die *in vitro* Transkription der CCR5- und Ψ-RNA. Die Ψ-DNA wird zwischen EcoRI und HindIII, die CCR5-DNA zwischen KpnI und PstI kloniert.

2.1.6.1 Generierte Konstrukte

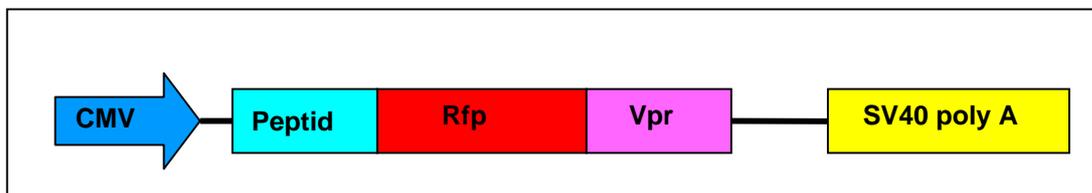


Abbildung 2-9: pF25 Peptid-Rfp-Vpr. Vektor mit dem Peptid-Rfp-Vpr-Fusionprotein. Das Peptid wurde N-terminal an des Rfp-Vpr-Protein kloniert.

generierte Konstrukte	Klonierung
pTriKanPSI	PSI mit pNL4-3PSId/pNL4-3PSIr Oligonukleotiden aus pNL4-3 amplifiziert und in den EcoRI/HindIII geöffneten pTriKan-Vektor ligiert
pTriKanCCR5	CCR5 PstI/KpnI aus pcDNA3CCR5 geschnitten und in den PstI/KpnI geöffneten pTriKan-Vektor ligiert
pF25Rfp-Vpr	Rfp mit RFPd-NheI/ RFPp-NarI aus pHRΨINcPPT-SRW amplifiziert und in NheI/NarI geöffneten pF25-Vpr-Vektor ligiert

generierte Konstrukte	Klonierung
pF25GS-Rfp-Vpr	Kont-Rfp-Vpr-d/r-Oligo in SacII/NheI geöffneten pF25Rfp-Vpr-Vektor ligiert
pF25HWWPWW-Rfp-Vpr	HWWPWW-Rfp-Vpr-d/r-Oligo in SacII/NheI geöffneten pF25Rfp-Vpr-Vektor ligiert
pF25HAWPWW-Rfp-Vpr	HAWPWW-Rfp-Vpr-d/r-Oligo in SacII/NheI geöffneten pF25Rfp-Vpr-Vektor ligiert
pF25HWWAWW-Rfp-Vpr	HWWAWW-Rfp-Vpr-d/r-Oligo in SacII/NheI geöffneten pF25Rfp-Vpr-Vektor ligiert

2.1.7 Phage Display Banken

Ph.D.TM Phage Display New England BioLabs GmbH, Peptide Library Kit, Schwalbach

M13KO7 Helfer Phage Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

Für das Biopanning wurden 3 verschiedene Phagenbanken, 2 lineare (7-mer und 12-mer) und eine zyklische (7cys), mit einer Diversität von jeweils $1,9 \cdot 10^9$ bis $3,7 \cdot 10^9$ unabhängigen Klonen verwendet.

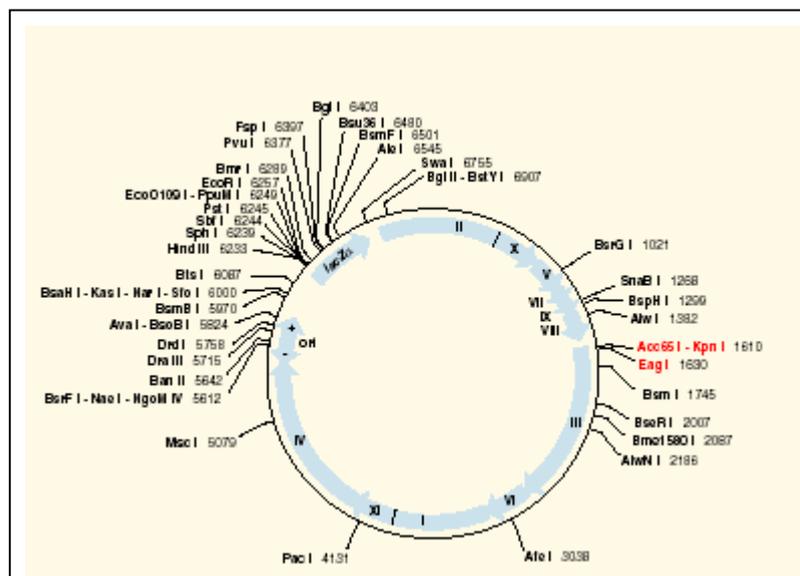


Abbildung 2-10: Vektor M13KE ist ein Derivat von M13 und ermöglicht die Expression von kurzen Peptiden in N-terminaler Fusion mit pIII. Zur blau-weiß Selektion enthält der Vektor ein lacZ Gen (New England Biolabs).

2.1.8 Peptide

Die aus den selektierten Phagen abgeleiteten Peptide wurden von der Gruppe von Prof. Schwalbe im Institut für Organische Chemie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main synthetisiert.

Bezeichnung
HWWPWW-myc
HSWPWW-myc
HHWPWW-myc
HLWPWW-myc
HPWHWW-myc
TTPP-myc
LPPL-myc
VLRP-myc
DAPRPR-myc
GSGSGS-myc
(myc- EQKLISEEDL)

2.1.9 Proteine

HIV-1SF2 p55 ^{Gag}	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Rockville
HIV-1 MN NCp7	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Rockville
HIV-1 BH10 Tat	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Rockville

2.1.10 Enzyme

Restriktionsenzyme

DNA-Restriktionsenzyme sowie deren Puffer wurden von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

Ligasen

T4-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
TaKaRa	Cambrex Bio Sciences, Belgien

Polymerasen

AmpliTaq® DNA Polymerase	Applied Biosystems, USA
Pfu-Polymerase	Stratagene Cloning Systems, USA
Superscript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
T7-MEGAshortscript Enzymmix	Ambion, Inc., Cambridgeshire, UK

Andere

DNaseI, RNase-frei	Roche, Penzberg
Protector RNase Inhibitor	Roche, Penzberg

2.1.11 Antikörper

α -M13-HRP (murin)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
α -c-myc-HRP (Kaninchen)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
α -IgG-Maus-HRP (Kaninchen)	Dianova, Hamburg
α -HIV-1 p55/17 IgG1 (murin)	MoBiTec, Göttingen

2.1.12 Bakterien und Anzuchtbedingungen

Als Wirtsstamm für molekularbiologische Arbeiten wurden *Escherichia coli*-Stämme TOP10 von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Plasmidhaltige Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 200rpm im LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin oder Kanamycin angezogen.

ER2738 Bakterien (New England Biolabs, Schwalbach) für die Phagenvermehrung wurden im LB-Medium mit 100µg/ml Tetracyclin kultiviert.

Stamm	Genotyp	Referenz
Top 10	F ⁻ mcrA Δ(mmr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe
ER2738	F'lacI ^q .Δ(lacZ)M15 pro A ⁺ B ⁺ zzzf:: Tn10(Tet)/ fhuA2 supE thi Δ (lac-proAB)D(hsdMS- mcrB)5(r _k -m _k -McrBC-)	New England Biolabs, Schwalbach

2.1.13 Zelllinien und Medien

DMEM-Standardmedium	500 ml DMEM-Medium 50 ml hitzeinaktiviertes FCS (fötales Kalbserum) 10 ml L-Glutamin 5 ml Penicillin/Streptomycin
---------------------	---

Zelllinie	Herkunft	Referenz	Medium
HR-YFP	Humane embryonale Nieren- epithelzellen, abstammend von der 293T Zelllinie, stabile Yfp-Expression, Ψ-Yfpist in das Zellgenom integriert	AG Grez, Frankfurt	DMEM- Standard

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen. Der Verdau erfolgt nach Angaben des Enzymherstellers in dem gelieferten Puffersystem. Dabei werden pro 20µl Ansatz 1µg Plasmid-DNA mit 15 Einheiten des Enzyms 1,5 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit und Temperatur können variieren. In der Regel wird nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Anschließend wird das Enzym bei 65°C 20 Minuten hitzeinaktiviert. Der Verdau wird durch elektrophoretische Auftrennung der DNA überprüft.

2.2.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente sowie der PCR-Produkte erfolgt durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese. Mit Hilfe dieser Methode kann man die Größe eines DNA-Fragmentes anhand eines Größenstandards bestimmen. In Abhängigkeit von der Größe des zu trennenden Fragmentes werden 0,8 - 1%-ige TAE-Agarose-Gele verwendet, denen zum Sichtbarmachen der DNA unter UV-Beleuchtung (366nm) 0,0008% Ethidiumbromid zugegeben werden. Die Auftrennung erfolgt im elektrischen Feld bei einer Spannung von 10mV/cm Gellänge.

Werden die DNA-Fragmente für Ligationen verwendet, müssen die aufgetrennten Banden vorsichtig mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten werden. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits der Firma Biorad (Quantum Prep™ Freeze'N Squeez, Kap.2.1.2) nach Angaben des Herstellers.

2.2.3 Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden für Linker-Klonierung

Die Hybridisierung von zwei komplementären DNA-Oligonukleotiden erfolgt in einem Endvolumen von 22,5µl mit jeweils 10µl (10pmol/µl) der einzelnen Oligonukleotide und 2,5µl des 10 x T4-Ligase-Puffers 5 Minuten, bei 95°C und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur. Die hybridisierten DNA-Fragmente können für eine Ligationsreaktion verwendet werden.

2.2.4 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) können definierte DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden. Dabei werden jeweils zwei gegenläufige Oligodesoxynukleotide (ca.15 - 20nt), die die Zielsequenz flankieren, im Überschuss eingesetzt. Die Reaktion wird mit der AmpliTaq- bzw. der Pfu-Polymerase nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

PCR-Reaktionsansatz für die AmpliTaq- bzw. Pfu-Polymerase

Zusammensetzung	Volumen
10x Amplifikationspuffer	5µl
50 mM MgCl ₂	5µl
dNTP-Lösung (10 mM ATP, GTP, CTP, TTP)	1µl
Hinprimer (10pmol)	2µl
Rückprimer (10pmol)	2µl
AmpliTaQ-DNA bzw. Pfu-Polymerase(2,5U/µl)	1µl
Plasmid-DNA (~100 - 500ng)	2µl
Wasser auf 50 µl	32µl
Endvolumen	50µl

Standardprogramm im Thermocycler

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1	1	95°C	4 Minuten	Denaturierung
2	25	95°C	30s	Denaturierung
		T _m -5°C	45s	Hybridisierung
		72°C	45s	Elongation
3		72°C	6 Minuten	Vervollständigung

Die generierten DNA-Fragmente können in einen Vektor/Plasmid kloniert werden.

2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgt mit der T4- bzw. TaKaRa-Ligase. Die Ligationsreaktion erfolgt in einem Gesamtvolumen von 20µl. Dabei wird der Vektor und ein Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 bei 16°C 2h inkubiert und anschließend für die Transformation in *E.coli* eingesetzt. Als Negativkontrolle wird immer eine Ligation mit dem Vektor-Plasmid jedoch ohne Insert eingesetzt und ebenfalls in *E.coli* transformiert.

2.2.6 Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot (50µl) chemokompetenter *E.coli*-Bakterien werden 10µl des Ligationsansatzes bzw. 100ng des zu transformierenden Plasmids gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch den anschließenden Hitzeschock für 2 Minuten bei 42°C erfolgt die Aufnahme der Fremd-DNA. Die Bakterien werden kurz auf Eis abgekühlt, durch Zugabe von 500µl LB-Medium verdünnt und anschließend bei 37°C und 225rpm für 1h rotiert. Die Vorkultur wird bei 9000rpm 3 Minuten zentrifugiert. 550µl des Überstandes werden verworfen. In dem Restvolumen wird das Bakterienpellet resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum (50µg/ml) ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Einzelkolonien können für das Animpfen von Minikulturen bzw. Vorkulturen für Maxikulturen verwendet werden.

2.2.7 Kultivierung von *E.coli*

Plasmidtragende *E.coli*-Stämme werden in mit entsprechendem Antibiotikum (100µg/ml) versetztem LB-Selektivmedium kultiviert. Für eine Flüssigkultur wird zunächst eine Vorkultur mit einer Einzelkolonie bei 37°C, 225rpm 6h inkubiert. Anschließend wird diese 1:100 im LB-Selektivmedium verdünnt und über Nacht bei 37°C und 225rpm rotiert.

2.2.8 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli*

2.2.8.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)

Für analytische Zwecke wird die Plasmid-DNA aus einer 2ml Bakterien-Flüssigkultur mit dem E.Z.N.A Mini-Kit von Peqlab (Erlangen) aufgereinigt.

2.2.8.2 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Maxi- Präparation)

Für die Isolierung von größeren Plasmid-Mengen (400 - 600µg) wird eine 100ml Bakterien-Übernachtskultur angesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mit dem Maxi-Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der DNA wird photometrisch bestimmt.

2.2.9 Photometrische Bestimmung der RNA/DNA-Konzentration

Die Messung der Extinktion der verdünnten RNA/DNA-Lösung bei 260nm und 280nm gibt Auskunft über die Konzentration und die Reinheit der präparierten Nukleinsäure. Dabei entspricht eine OD_{260} 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 μ g/ml RNA. Die Konzentration der Probe errechnet sich daher wie folgt:

DNA Konzentration [μ g/ml] = Extinktion₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 50

RNA Konzentration [μ g/ml] = Extinktion₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 40

Da aromatische Aminosäuren Licht der Wellenlänge 280 stärker absorbieren als DNA, kann der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} zur Beurteilung der Reinheit benutzt werden. Liegt der Wert unter 1,8 deutet dies auf eine Verunreinigung der DNA/RNA-Präparation mit Proteinen hin.

Für die Messung wird die DNA/RNA je nach Bedarf 1:50 bzw. 1:100 mit Wasser verdünnt.

2.2.10 Sequenzierung der Konstrukte

Die Sequenzierung wird von der Service-Abteilung des „Georg Speyer Hauses“ (Margot Landersz, Dr. U. Dietrich) auf einem ABI 3100 Sequenzierautomaten durchgeführt. Die Methode erfolgt nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. 1977. Zur Sequenzierung von Minipräparationen und Phagen-DNA wird ein Ansatz aus 10 μ l (0,6 μ g) DNA und 1 μ l 10 μ M Primerlösung verwendet. Bei Maxipräparationen werden 0,5 - 1 μ g Plasmid-DNA eingesetzt.

2.3 RNA-Synthese und Analytik

Alle Versuche werden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Hierfür werden alle Materialien, die in Berührung mit der RNA kommen, über Nacht in 20% SDS-Lösung inkubiert und am nächsten Tag mit DEPC-Wasser und Äthanol abs. gespült. Alle Puffer und Lösungen werden mit DEPC-Wasser oder Tween20 angesetzt.

2.3.1 *In vitro* Transkription der RNA

Für das Screening der Phagen-Banken ist es notwendig, RNA in großen Mengen zu transkribieren. Dies geschieht mit dem T7-MEGAshortscript™-Kit der Firma Ambion (Kap.2.1.2). Der Kit ermöglicht eine *in vitro* Transkription von Fragmenten mit einer Länge von 20 - 500nt und eine Ausbeute von bis zu 200µg RNA pro Ansatz.

Zunächst wird das zu transkribierende Fragment in einen Transkriptionsvektor pTRikan18 (Abbildung 2-8), der einen Tripeltandem-Promotor für die T7, T6 und Sp6 RNA-Polymerase enthält, kloniert. Für die Synthese von Transkripten einer definierten Länge wird der Vektor durch die Behandlung mit Restriktionsenzymen linearisiert. Der Verdau wird durch elektrophoretische Auftrennung der DNA überprüft und die Fragmente aus dem Gel mit dem Extraktions-Kit der Firma Biorad (Quantum Prep™ Freeze'NSqueeze) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Die Reaktion wird mit der T7 RNA-Polymerase (T7 MEGAshortscript Enzymmix aus dem T7-MEGAshortscript™-Kit) in einem Endvolumen von 20µl durchgeführt.

Zusammensetzung	Volumen
10x Transkriptionspuffer	2µl
DNTP-Lösung (10mM ATP, GTP, CTP, TTP) *	8µl
T7 MEGAshortscript Enzym-Mix	2µl
Plasmid-DNA (~1,2 - 2,4µg)	2µl
RNase freies Wasser auf 20µl	6µl
Endvolumen	20µl

*Die radioaktive Markierung erfolgt im Isotopenlabor durch die Zugabe von 1µl (5mM) des Isotops [α -³²P] UTP (Amersham) zum Reaktionsansatz.

Nach Inkubation von 3h bei 37°C wird durch die Zugabe von 1,5µl (2U/µl) DNase (Ambion, UK) und einer weitere Inkubation von 15 Minuten bei 37°C das DNA-Templat verdaut. Die Terminierung der Reaktion und Entfernung der T7-Polymerase erfolgt durch Zugabe von 115µl RNase freiem Wasser, 15µl NH₄AC und 150µl Phenol/Chloroform-Gemisches (Roth, Karlsruhe). Die Komponenten werden gut durchmischt. 150µl der oberen, wässrigen Phase werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend 300µl eiskaltes, absolutes Äthanol sowie 4µl 4M NaAc hinzugefügt. Die Fällung der

RNA erfolgt über Nacht bei -20°C . Am nächsten Tag wird die Probe 20 Minuten bei 13000rpm, 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 300 μl 70%-igem Äthanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation 15 Minuten bei 13000rpm, 4°C wird der Überstand verworfen und die RNA in 300 μl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Die transkribierte RNA wird durch elektrophoretische Auftrennung in einem denaturierenden PAA (Polyacrylamid)-Gel überprüft. Die Konzentration wird photometrisch bestimmt, die RNA aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Mit Hilfe der Methode kann man die Größe eines synthetisierten RNA-Fragmentes anhand eines Größenstandards bestimmen. In Abhängigkeit von der Größe des zu trennenden Fragmentes werden 8 - 10%-ige denaturierende PAA-Gele, denen zum Sichtbarmachen der RNA unter UV-Beleuchtung (366nm) 0,0008% Ethidiumbromid zugegeben werden, verwendet. Der Lauf findet im TBE-Puffer bei 90V statt. 500ng RNA werden vor dem Auftragen auf das Gel durch die Zugabe von 10 μl 1 x Probenpuffers (Promega, Madison) und die Erhitzung auf 95°C , 5 Minuten denaturiert. Die Größe der Fragmente wird anhand eines RNA-Längenstandards peqGOLD Low Range RNA-Leiter (Peqlab, Erlangen) bestimmt. Um eine Renaturierung der RNA zu verhindern, wird die Probe sofort auf das Gel aufgetragen.

2.3.3 Gelretentionsanalyse (EMSA) im nativen PAA-Gel zur Kontrolle der RNA-Funktionalität

Zur Kontrolle der Funktionalität der transkribierten RNA wird eine Gelretentionsanalyse im 5%-igen nativen PAA-Gel durchgeführt. Durch die Bindung eines Proteins wird die Beweglichkeit der RNA im Gel verringert. Die radioaktiv markierte RNA (500ng) wird in 10 μl PSI-Puffer (Kap.2.1.3) aufgenommen, bei 95°C 5 Minuten denaturiert und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur renaturiert. Dabei nimmt das RNA-Fragment die native dreidimensionale Faltung an. Den Proben werden anschließend 50ng HIV-1 Gag-Protein sowie Hefe t-RNA als unspezifischer Kompetitor im 100-fachen Überschuss (5 μg) zugegeben. Die nachfolgende Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Anschließend werden den Proben 2 μl Probenpuffer (Promega, Madison) zugegeben. Als Größenstandard wird die peqGOLD Low Range RNA-Leiter (Peqlab, Erlangen) verwendet. Das PAA-

Gel wird für 15 Minuten bei 90V vorgelaufen. Anschließend werden die Proben aufgetragen. Der Lauf findet auf Eis im TBE-Puffer, bei 75V 2h in der MiniProtean3-Gelapparatur der Firma Biorad statt. Das PAA-Gel wird anschließend auf einem Chromatographiepapier im Geldryer 583 (Biorad) getrocknet. Die Detektion der Retention erfolgt durch die Lichtemission mit einem Röntgenfilm.

2.3.4 Stabilitätsnachweis der Transkripte unter Versuchsbedingungen

Der Nachweis der RNA-Stabilität unter Versuchsbedingungen für das Screening von Phagen-Banken erfolgt im 5%-igen nativen PAA-Gel, dem 0,0008% Ethidiumbromid zugegeben werden. Die transkribierte RNA wird wie oben beschrieben einer Denaturierung und Renaturierung unterzogen. Anschließend wird die Probe mit 10µl der Phagenbanken (Kap.2.1.7) versetzt, 4h bei 4°C inkubiert und im Gel elektrophoretisch wie oben beschrieben aufgetrennt. Die Detektion erfolgt durch die UV-Beleuchtung (366nm).

2.3.5 Herstellung der RNA-DNA-Heteroduplices zur Biotinylierung der transkribierten RNA

Für das Screening von Phagenbanken ist es notwendig, die transkribierte RNA zu immobilisieren. Dabei macht man sich die hohe Affinität von zwei natürlichen Liganden, Biotin und Streptavidin, zu Nutze. Die Markierung der Ziel-RNA erfolgt mittels 5'-biotinylierter Oligonukleotide (5'bioPSIRNA), die zum 3'-Ende komplementär sind bzw. 3'biotinylierter Oligonukleotide (RNA-3'bio), die zum 5'-Ende der Transkripte komplementär sind. Dabei handelt es sich bei dem RNA-3'bio-Oligonukleotid um einen Universalprimer, da er sowohl an die Ψ - als auch an die CCR5-RNA bindet. Das 5'bioPSIRNA-Oligonukleotid ist dagegen Ψ -spezifisch. Zwischen der Sequenz und dem Biotin befindet sich ein dazwischen geschalteter Spacer von fünf dThymidinen, wodurch das Biotin aus dem Nukleotidrückgrad herausragt. Dies begünstigt einerseits die Bindung an das Streptavidin und verhindert andererseits die Interferenz mit der tertiären RNA-Struktur.

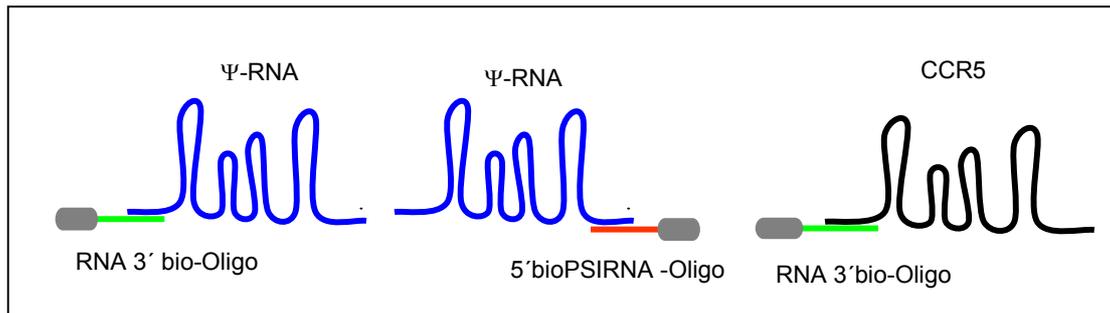


Abbildung 2-11: Strategie zur Biotinylierung der Transkripte. Das RNA 3'bio-Oligonukleotid ist sowohl zum 5'-Ende der Ψ -als auch der CCR5-RNA. Das 5'bioPSIRNA-Oligonukleotid ist Ψ -RNA spezifisch und hybridisiert mit dem 3'Ende der RNA.

Zur Hybridisierung werden 50ng der RNA und 10pmol der biotinylierten Oligonukleotide im PSI-Puffer bei 95°C, 5 Minuten erhitzt und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur renaturiert. Dabei kommt es zur Ausbildung von RNA-DNA-Heteroduplices.

2.3.6 Nachweis der RNA-DNA-Heteroduplices

Der Nachweis der RNA-DNA-Heteroduplices und der Biotinylierung erfolgt durch Gelretentionsanalyse sowie Blotten von MOPS-Gelen.

2.3.6.1 Gelretentionsanalyse zum Nachweis der RNA-DNA-Heteroduplices

Die Oligonukleotide werden wie zuvor beschrieben an die RNA hybridisiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt wie in Kap.2.3.3 beschrieben.

2.3.6.2 Blotten der MOPS-Gele zum Nachweis des biotinylierten Oligonukleotide

Die RNA wird mit 1 x Probenpuffer (Peqlab, Erlangen) wie oben beschrieben mit den Biotin-Oligonukleotiden hybridisiert und anschließend elektrophoretisch in einem 1%-igen, denaturierenden MOPS-Agarose-Gel aufgetrennt. Vor dem Lauf wird das Gel im MOPS-Laufpuffer 30 Minuten äquilibriert. Der Lauf findet bei 80V, 90 Minuten im MOPS-Laufpuffer statt. Zur Analyse der Biotinylierung werden die RNA-DNA-Heteroduplices auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) transferiert. Dazu werden 5

Filterpapiere, die Nitrozellulosemembran sowie Papiertücher auf Gelgröße und 3 Filterpapiere sehr groß zugeschnitten und im 10 x SSPE-Puffer (Kap.2.1.3) getränkt. Das Gel wird 4 mal im 10 x SSPE-Puffer gewaschen.

Auf eine Glasplatte, die auf einer mit 10 x SSPE-Puffer gefüllten Wanne platziert ist, werden 3 große Filterpapiere, die in den Puffer tauchen, gelegt. Der folgende Aufbau gleicht einem „Sandwich“ aus folgenden Lagen: Filterpapier, Gel, der Nitrozellulosemembran, 5 Filterpapieren und 20 Lagen Zellstofftücher. Zum Beschweren wird eine Glasplatte und ein Gewicht verwendet. Der Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgt über Nacht durch Kapillarkräfte.

Die Detektion der Biotinylierung erfolgt am nächsten Tag. Zunächst wird die Nitrozellulosemembran 5 Minuten im 10 x SSPE-Puffer gewaschen. Anschließend folgt die Vernetzung der RNA mit der Nitrozellulosemembran durch UV-Bestrahlung (6s) mittels eines UV-Crosslinkers (UV Stratalinker 1800, Stratagene). Die freien Bindungsstellen auf der Membran werden durch Inkubation bei Raumtemperatur 2h im 5% Milchpulver/PBS geblockt. Danach wird die Membran zwei mal mit 1 x PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Streptavidin-HRP-Konjugat (1:40000 in PBS) erfolgt bei Raumtemperatur und dauert 2h. Nichtgebundenes Streptavidin-HRP-Konjugat wird durch 2 maliges Waschen mit 1 x PBS entfernt. Die Detektion der Peroxidaseaktivität erfolgt mit dem ECL-Kit (Kap.2.1.2) nach Angaben des Herstellers, der Nachweis der Lichtemission mit einem Röntgenfilm.

2.3.6.3 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zum Nachweis der Ψ -RNA über Bindung von Gag / RNA-Immobilisierung

96-Loch-Platten werden mit 500ng/Loch Streptavidin in 100 μ l PBS über Nacht bei 37°C beschichtet. Die nicht besetzten Stellen werden mit 3%Milchpulver/PBS bei Raumtemperatur 2h geblockt. Das überschüssige Milchpulver wird durch 3 maliges Waschen mit 1 x PBS entfernt. Anschließend erfolgt die Bindung der RNA-DNA-Heteroduplices, die zuvor wie in Kap.2.3.5 bereits beschrieben vorbehandelt wurden, an das Streptavidin bei Raumtemperatur, 60 Minuten Die nichtgebundenen Heteroduplices werden durch 2-maliges Waschen mit 1 x PBS entfernt, bevor die Proben mit 100ng p55^{Gag}/Loch im PSI-Puffer inkubiert werden. Danach folgt die Inkubation mit 100 μ l des Erstantikörpers α -HIV-1 p55/17 IgG1 (Kap.2.1.11) (1:1000 in PBS) bei Raumtemperatur für 2h und anschließendes 3-maliges Waschen mit 1 x PBS. Ein Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper

(Kap.2.1.11) wird 1:5000 in PBS verdünnt, 100 μ l in jede Vertiefung pipettiert und bei Raumtemperatur 2h inkubiert. Die Vertiefungen werden mit 1 x PBS dreimal gewaschen. Die Detektion erfolgt mit OPD-Tabletten nach Angaben des Herstellers. Die Absorption wird schließlich im ELISA-Lesegerät (SpectraMax 340, USA) bei 492nm (Absorptionsmaximum von OPD) und 620nm (Referenzwellenlänge) gemessen.

2.4 Phage-Display

2.4.1 Ψ -Biopanning

Für das Biopanning werden drei Phagenbanken, Ph.D.-7, Ph.D.-C7C und Ph.D.-12 der Firma NEB (Schwalbach; Kap.2.1.7), verwendet. Für die positive Selektion wird die Ψ -RNA (Kap.2.1.5) und für die negative eine irrelevante RNA gleicher Länge (CCR5-RNA; Kap.2.1.5) eingesetzt.

24-Well Zellkulturplatten werden mit 5 μ g/Loch Streptavidin in 300 μ l 1 x PBS beschichtet und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird das nichtgebundene Streptavidin durch Waschen mit 1 x PBS (3x) entfernt und die freien Stellen durch 3%Milchpulver/PBS (Kap.2.1.3) bei Raumtemperatur 2h benetzt. Anschließend werden die Platten zur Entfernung des überschüssigen Milchpulvers drei mal mit 1 x PBS gewaschen.

2.4.1.1 Positive Selektion

Die RNA wird wie oben beschrieben (Kap.2.3.5) biotinyliert, in 90 μ l PSI-Puffer aufgenommen und auf den mit Streptavidin beschichteten Platten durch Inkubation bei Raumtemperatur 90 Minuten immobilisiert. Das anschließende Waschen (2x) mit 500 μ l 1 x PBS dient der Entfernung von nicht gebundener RNA. Die Inkubation der Phagen im PSI-Puffer erfolgt bei 4°C, 3h. Die ungebundenen bzw. schwach bindenden Phagen werden durch Waschen mit 1 x PBS entfernt. Die Anzahl der Waschschrte richtet sich nach der gewünschten Stringenz, die durch häufigeres Waschen erhöht wird. Im Versuchsansatz wird die Anzahl der Waschschrte von zwei in der 1-ten positiven Selektion auf zehn bei der 4-ten positiven Selektion erhöht. An die Ψ -RNA gebundene Phagen werden durch die Zugabe von 200 μ l 0,2M Glycin-HCl (pH 2,2) bei Raumtemperatur, 5 Minuten eluiert und anschließend mit

30µl Tris-HCl (pH9,1) neutralisiert. Die Eluate werden bei 4°C gelagert und für weitere Schritte (Titer, Amplifikation, weitere Selektion) verwendet.

Die Durchführung der 2-ten und 3-ten positiven Selektion erfolgt wie beschrieben, unterscheidet sich jedoch in der Häufigkeit der Waschschrirte und in der Menge der eingesetzten Phagen. Bei der 4-ten Selektion wird die biotinylierte RNA zunächst mit 20µl Phagen in 280µl PSI-Puffer bei 4°C, 2h inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur 30 Minuten an die mit Streptavidin beschichteten Platten gebunden. Die Eluierung erfolgt wie oben beschrieben.

In der Tabell sind die Versuchsbedingungen der 1 - 4 positiven Selektion zusammengefasst.

Selektion	Waschschrirte nach der Inkubation	Ansatz
1. pos. Selektion	2x	10µl original Phagen Bank + 290 µl PSI-Puffer
2. pos. Selektion	5x	20µl Phagen aus der 1 Ampl. + 280µl PSI-Puffer
3. pos. Selektion	10x	20µl Phagen aus der 2 Ampl. + 280µl PSI-Puffer
4. pos. Selektion	10x	20µl Phagen aus der 3 Ampl. + 280µl PSI-Puffer

2.4.1.2 Negativ-kompetitive Selektion

Die negativ-kompetitive Selektion schließt sich an die 4-te positive Selektion an und erfolgt nach dem Protokoll für die 4-te positive Selektion, jedoch mit einem 100-fachen Überschuss an CCR5-Kontroll-RNA sowie 50ng der Ψ-RNA. Dabei ist zu beachten, dass die Kontroll-RNA nicht biotinyliert ist und somit nicht an die Straptavidin beschichtete Platten bindet.

Selektion	Waschschrirte nach der Inkubation	Ansatz
1. negative Selektion	keine	20µl Phagen aus der 4 Ampl. 5µg CCR5-RNA (SL3mut) 50ng Ψ-RNA (SL3-RNA) 280µl PSI-Puffer

Die im Eluat befindlichen Phagen der negativen Selektion werden nicht mehr amplifiziert, sondern getitert.

2.4.2 SL3-Biopanning

Das SL3-Biopanning verläuft wie im Kap.2.4.1 beschrieben. Für die positive Selektion wird die biotinylierte SL3-RNA (Kap.2.1.5), für die negativ-kompetitive Selektion die SL3mut-RNA (Kap.2.1.5) eingesetzt. Frühere Untersuchungen haben die zentrale Rolle der GGAG-Sequenz der SL3-Schleife bei der Bindung des NCp7-Proteins an das HIV-1 Verpackungssignal gezeigt³⁵. Da im Rahmen des Projektes Liganden gesucht wurden, die die Verpackung der viralen RNA inhibieren, wurde bei der SL3mut-RNA die GGAG-Sequenz der Schleifenregion gegen AAAA ausgetauscht.

2.4.3 Amplifikation

Zwei Tage vor der Amplifikation werden *E.coli* ER2738 Bakterien auf Tetracyclin haltigen LB-Platten ausgestrichen (Kap.2.2.6) und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wird eine Kolonie der Übernachtskultur in 15ml LB-Medium mit Tetracyclin (100µg/ml) angeimpft und bei 37°C und 225rpm rotiert. Für die Amplifikation wird die Übernachtskultur 1:100 in 25ml LB-Medium verdünnt. 200µl des Eluats aus der positiven Selektion werden zugegeben und 4,5h bei 37°C und 225rpm kultiviert. Anschließend wird die Kultur bei 10000rpm, 4°C 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand (24ml) wird wie oben beschrieben erneut zentrifugiert und anschließend mit 1/4 des Endvolumens (24ml) mit 25%PEG/2,5%NaCl (6ml) gut vermischt. Die Phagen werden über Nacht bei 4°C gefällt.

Am nächsten Tag werden die präzipitierten Phagen bei 10000rpm, 4°C für 15 Minuten pelletiert und das Pellet in 1ml 1 x TBS resuspendiert. Durch weitere Zugabe von 300µl 25%PEG/2,5MNaCl und Inkubation auf Eis 4°C für 1h werden die Phagen erneut gefällt und durch Zentrifugation bei 4°C, 10 Minuten, 13000rpm pelletiert. Das Phagenpellet wird in 200µl TBS/0,02%NaN₃ aufgenommen und bei 4°C gelagert. Das Amplifikat wird für eine weitere Selektion bzw. zum Titern eingesetzt.

2.4.4 Titern

Phagen aus dem Eluat der negativ-kompetitiven Selektion werden 10^{-3} bis 10^{-6} in 1 x TBS verdünnt und getitert. Zum Titern wird am Vortag eine *E.coli* ER2738 Übernachtskultur angeimpft und Top-Agar angesetzt.

Am nächsten Tag werden LB-Platten vorgewärmt, der Top-Agar geschmolzen und auf 45°C abgekühlt. Pro Verdünnungsstufe werden 3ml Top-Agar mit 15µl IPTG (0,5M in Wasser) und 20µl Xgal (200mg/ml in DMF) vermischt und bei 45°C ins Wasserbad gestellt. 200µl der Übernachtskultur werden mit 10µl der verdünnten Phagen infiziert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wird die infizierte Kultur dem vorgewärmten Top-Agar hinzugefügt, gevortext und auf die warmen LB-Platten gegossen. Zum Aushärten des Top-Agars werden die Platten 1h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die blauen Plaques ausgezählt und der Phagentiter (pfu/ml) bestimmt. Die Einzelplaques werden für die Bestimmung der Spezifität mittels ELISA und Amplifikation der Einzelklone verwendet .

2.4.5 Amplifikation einzelner Phagenklone

Für die Amplifikation einzelner Phagenklone wird eine *E.coli* ER2738 Übernachtskultur angeimpft, bei 37°C 225rpm kultiviert und am nächsten Tag 1:100 im LB-Medium verdünnt. Mittels einer sterilen Pipettenspitze werden die positiven Klone von der 96-Loch-Platte aus der Einfach-Bestimmung gepickt und in 2ml der verdünnten Bakterienkultur 4,5h bei 37°C, 225rpm rotiert. Die Bakterien werden bei 13000rpm, 4°C 5 Minuten abzentrifugiert. 1,8ml des Überstandes werden erneut zentrifugiert. 1,5ml des Überstandes werden mit 500µl 25%PEG/2,5MNaCl versetzt, gevortext und die Phagen 1h auf Eis gefällt. Die gefällten Phagen werden anschließend bei 13000rpm, 4°C 15 Minuten pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Pellet in 100µl TBS/0,02%NaN₃ resuspendiert und bei 4°C gelagert. Die amplifizierten Phagen werden zur Isolierung der Phagen-DNA sowie zum Nachweis der Spezifität mittels ELISA verwendet.

2.4.6 ELISA

Der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist eine immunochemische Methode, die den Nachweis von Proteinen mit großer Sensitivität und hoher Spezifität ermöglicht. Sie kann ebenfalls zum Nachweis von Liganden-RNA-Wechselwirkungen benutzt werden.

2.4.6.1 Bestimmung der Spezifität der selektierten Phagen mittels ELISA

Zunächst werden die selektierten Phagen einer Einfach-Bestimmung unterzogen, die positiven Phagen werden anschließend im Triplikat getestet. Die Präparationen der Platten sind für beide Bestimmungen gleich.

96-Loch-Platten werden mit 500ng/Loch Streptavidin in 1 x PBS über Nacht bei 37°C beschichtet. Die nicht besetzten Stellen werden mit 3%Milchpulver/PBS 2h bei Raumtemperatur geblockt. Das überschüssige Milchpulver wird durch 3 maliges Waschen mit 1x PBS entfernt. Die Bindung der RNA-DNA-Heteroduplices (bei Ψ -RNA) bzw. der biotinylierten SL3-RNA (Kap.2.3.5) an das Streptavidin erfolgt bei Raumtemperatur, 1h. Die nichtgebundenen Heteroduplices werden durch zweimaliges Waschen mit 1 x PBS entfernt, bevor die Proben bei Raumtemperatur 2h mit 5 μ l den Phagenklonen (Kap.2.4.5) in 90 μ l PSI-Puffer inkubiert werden. Nicht gebundene Phagen werden durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS entfernt. Die gebundenen Phagen werden mit dem murinen α M13-HRP-Antikörper (Kap.2.1.11) nachgewiesen. 100 μ l des 1:5000 im PSI-Puffer verdünnten Antikörpers werden pro Loch eingesetzt und bei Raumtemperatur 2h inkubiert. Der nichtgebundene Antikörper wird durch Waschen (3x) mit 1 x PBS entfernt. Die Detektion erfolgt mit OPD-Tabletten der Firma Sigma (Deisenhofen, Kap.2.1.3) 6 Minuten im Dunkeln nach Angaben des Herstellers. Die Farbreaktion wird durch 25 μ l 0,5M H₂SO₄ gestoppt. Die entwickelten Platten werden im ELISA-Reader (SpectraMax 340, CA, USA) bei 492nm gelesen, als Referenzlänge werden 620nm verwendet. Die erhaltenen Werte (in Form von OD - optische Dichte) werden durch das Programm „SoftmaxProVersion 1.1.1“ der Firma Molecular Devices Corp. verarbeitet und angegeben. Die optische Dichte wird zur weiteren Analyse verwendet. Zur Auswertung wird die bei 492nm gemessene OD in einem Balkendiagramm dargestellt. Als Negativkontrolle dient der Helferphage M13KO7 (Kap.2.1.7), dessen Reaktionsstärke als Anhaltspunkt für die

Bildung des Ausschlußwertes (AW) dient. Der Ausschlußwert zeigt die unspezifische Reaktion des Phagen mit der RNA. Als positive Phagenklone werden solche gewertet, die mindestens den 4-fachen Wert (OD) der Negativkontrolle erreichen. Die positiven Phagen werden wie im Kap.2.2.10 beschrieben sequenziert.

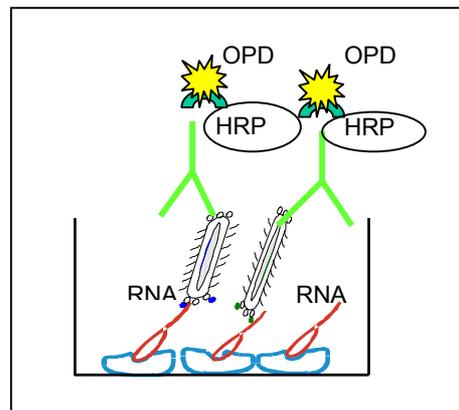


Abbildung 2-12: Aufbau eines ELISA's zur Bestimmung der Spezifität der selektierten Phagen.

2.4.6.1.1 Einfach-Bestimmung mittels ELISA

Für die Einfach-Bestimmung wird das Eluat der 5-ten Selektion getitert (Kap.2.4.4). Die Amplifikation erfolgt in einer 96-Loch-Platte. Hierfür wird eine Übernachtskultur *E.coli* ER2738 1:100 in LB-Medium verdünnt in 200µl/Loch aliquotiert und pro Vertiefung mit einem blauen Phagenklon infiziert. Die Platten werden bei 30°C, 175rpm, über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die Kulturen bei 1400rpm 7 Minuten pelletiert. 40µl des Überstandes werden für die Einfach-Bestimmung verwendet. Die Einfach-Bestimmung verläuft wie im Kap.2.4.6.1 beschrieben.

2.4.6.1.2 Dreifach-Bestimmung mittels ELISA

Phagen die in der Einfach-Bestimmung positiv waren, werden wie im Kap.2.4.5 beschrieben amplifiziert und einer Dreifach-Bestimmung unterzogen. Hiefür werden 10µl der gefällten Einzelphagen im Triplikate getestet. Die Vorgehensweise erfolgt wie im Kap.2.4.6.1 beschrieben. Bei der Dreifach-Bestimmung wird der Mittelwert der Triplikate gebildet und die Standardabweichung der einzelnen Wertepaare berechnet. Zur Auswertung wird die bei 492nm gemessene OD in einem Balkendiagramm dargestellt.

2.4.7 Präparation einzelsträngiger Phagen-DNA

Für die Extraktion der einzelsträngigen-(ss)-Phagen-DNA werden 50µl der amplifizierten Phagen (Kap.2.4.5) mit 25µl Phenol/Chloroform (Roth, Karlsruhe) vermischt, bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert und anschließend bei 10000rpm, 5 Minuten abzentrifugiert. Die wässrige Phase wird mit 90µl Äthanol abs. und 4µl 4M NaAc vermischt und bei -20°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag folgt die Pelletierung der ssDNA bei 13000rpm, 4°C 15 Minuten. Das Pellet wird mit 70%-igem Äthanol gewaschen, wie oben beschrieben zentrifugiert und getrocknet. Die extrahierte Phagen-DNA wird in 15µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Die ssDNA wird für die Sequenzierung (Kap.2.2.10) benutzt. Die Insertsequenzen geben Auskunft über RNA-bindenden-Peptide.

2.4.8 Peptid-ELISA

Als Vorlage für die Peptidsynthese, die zur Detektion an ein Myc-Tag fusioniert sind, dienen die Insertsequenzen der positiven Phagen (Kap.2.4.6.1.2). Die Testung der Peptidaffinität zur Ziel-RNA erfolgt mittels ELISA. Die RNA und die 96-Loch-Platten werden wie im Kap.2.4.6.1 beschrieben präpariert. Nach der Absättigung der freien Stellen mit 3%Milchpulver/PBS und dem dreifachen Waschen mit 1 x PBS, werden pro Vertiefung 500ng (5µM) Peptid (Kap.2.1.7) aufgetragen und bei Raumtemperatur 2h inkubiert. Jedem Ansatz werden 5µg Hefe t-RNA (Sigma, Steinheim) als unspezifischer Kompetitor beigefügt. Nichtgebundene Peptide werden durch Waschen (3x) mit 1 x PBS entfernt, bevor 100µl/Loch des murinen α Myc-HRP-Antikörpers (1:5000 in PBS; Kap.2.1.11) aufgetragen werden. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 2h. Der überschüssige Antikörper wird durch erneutes Waschen (2x) mit 1 x PBS entfernt und durch OPD-Tabletten nach Angaben des Herstellers detektiert.

2.4.9 Peptid-Kompetitions ELISA

Beim Kompetitions-ELISA wird die Peptidbindung an die Ziel-RNA mit dem nativen Proteinen p55^{Gag} und NCp7 (Kap.2.1.9) kompetitiert.

Eingesetzt werden Peptide, die im Peptid-ELISA als Ψ -bindend identifiziert werden konnten. Die Vorgehensweise beim Kompetitions-ELISA gleicht der

des Peptid-ELISA's (Kap.2.4.8). Nach der Inkubation der Peptide werden jedem Ansatz 50ng - 1µg des nativen p55^{Gag} (8,8nM-176nM) bzw. NCp7-Proteins (72nM-1,44µM) zugesetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die nichtgebundenen Proteine bzw. verdrängten Peptide werden durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS entfernt. Der Nachweis der Bindung des Peptids an die Ψ-RNA erfolgt durch den murinen α-myc-Antikörper (1:2000 in PBS; Kap.2.1.11). Die Auswertung erfolgt wie Kap.2.4.6.1.2 beschrieben. Eine Verdrängung des Peptids durch das native Protein äußert sich in der Abnahme der OD im Vergleich zur Kontrolle. Zum Nachweis der Spezifität der Kompetition wird das virale RNA-bindende Tat-Protein (4nM - 800nM) verwendet und wie oben beschrieben eingesetzt.

2.4.10 Bestimmung der Spezifität der selektierten Phagen mittels EMSA

Zur Bestätigung der ELISA-Daten werden ausgewählte Phagen einer Spezifitätskontrolle durch Gelretentionsanalyse im 5%-igen nativen PAA-Gel unterzogen. Die RNA (500ng) wird in 10µl PSI-Puffer bei 95°C 5 Minuten denaturiert und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur renaturiert. 5µl ausgewählter Phagenklone und 2µg Hefe t-RNA (Sigma-Aldrich, Steinheim) als unspezifischer Kompetitor werden anschließend mit der RNA 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 2µl Probenpuffer (Peqlab, Erlangen) auf das Gel aufgetragen. Der Lauf findet, wie im Kap.2.3.3 beschrieben, statt.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Auftauen und Einfrieren von Säugerzellen

Das Auftauen von Säugerzellen aus der Kryokonservierung erfolgt durch schnelles Aufwärmen im Wasserbad bei 37°C. Nach dem Auftauen werden die Zellen in 10ml DMEM-Medium überführt und bei 1800rpm, 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 10ml DMEM-Medium resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 1800rpm für 8 Minuten wird das Zellpellet in frischem DMEM-Medium resuspendiert und in einer Kulturflasche bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Zum Einfrieren werden nahezu konfluente Zellen mit 2ml Trypsin/EDTA von GibcoBRL (Eggenstein) von dem Flaschenboden abgelöst, abzentrifugiert und das Zellpellet im Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO und 20% FCS) resuspendiert. Die präparierten Zellen werden einige Stunden bei -20°C und anschließend über Nacht bei -80°C gelagert. Die Zellen werden in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt.

2.5.2 Kultivierung von adhärennten Säugerzellen

Adhärennte Zelllinien wie z.B.: 293T-Zellen, HR⁺YFP werden im Standard-DMEM-Medium (Kap.2.1.13), in einem Inkubator bei 5% CO_2 -Gehalt und 37°C kultiviert. Beim Erreichen der Konfluenz werden die Zellen so lange (5 - 7 Minuten) mit 2ml Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis sie sich durch leichtes Klopfen ablösen lassen. Das Trypsin/EDTA-Gemisch wird durch die Zugabe des Standardmediums inaktiviert und die Zellen mit einer 1:5 bis 1:10 Verdünnung passagiert.

2.5.3 Lentivirale Vektoren

Zur funktionellen Analyse der identifizierten Ψ -RNA-Liganden wird das 3-Vektoren-System verwendet. Die Übertragung von Genen in gewünschte Zielzellen erfolgt mit Hilfe von Gentransfervehikeln, die man als virale Vektoren bezeichnet. Das Design dieser Vektoren basiert auf der Trennung von cis- und trans-aktiven Sequenzen auf drei Plasmide sowie der Deletion aller akzessorischen (Vpu, Nef, Vif, Vpr) und der für die Replikation und Pathogenese essentieller Elemente.

Das 3-Vektoren-System (Abbildung 3-17) hat zugleich mehrere Vorteile:

- Expression retroviraler Strukturgene in der Zielzelle ist nicht mehr notwendig und jedes gewünschte therapeutische Transgen kann eingesetzt werden
- hohe Biosicherheit, da derartige Viruspartikel replikationsdefekt sind und die Zellen nur einmal infizieren können
- Ersatz des Env-Hüllproteins durch heterologe Hüllproteine führt zur Erweiterung oder Einengung (Pseudotypisierung) des Tropismus

In dieser Arbeit verwendete Vektoren sind lentiviraler Abstammung, die aus den Gag-Pol-Proteinen und Enzymen des HIV-1 und dem Hüllprotein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV) bestehen^{146,147}.

Verpackungskonstrukte:

Der Verpackungsvektor liefert die für die Verpackung notwendigen Proteine Gag, Pol, Pro, Tat und Rev (Abbildung 2-5). Das zweite Plasmid codiert für das VSV-G-Hüllprotein (Abbildung 2-6). Der Einsatz des VSV-G-Hüllproteins ermöglicht einen hohen Virustiter, hohe Partikelstabilität sowie eine tropismus- und proliferationsstatusunabhängige Transduktion von Zielzellen. Beide Vektoren stehen unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

Transgen-Vektor:

Der selbst inaktivierende (SIN) Transgenvektor enthält das Verpackungssignal Ψ und die „long terminal repeats“ (LTR) sowie das Transgen und das Yfp unter dem CMV-Promotor. Zur Herstellung replikationsinkompetenter Viruspartikel, die Zellen nur einmal transduzieren können („single round infection“), wurde in die U3-Region der 3'LTR eine Deletion eingeführt. Bei der hier verwendeten Zelllinie HR'YFP (Kap.2.1.13) wurde das Ψ -Yfp-Konstrukt ins Zellgenom integriert. Sie zeichnet sich durch stabile eYfp-Expression aus.

Transfergen-Vektor:

Der Transfergen-Vektor pF25-X-Rfp-Vpr (Kap.2.1.6.1) kodiert das zu untersuchende Gen (Peptid), das N-terminal an das Rfp-Protein (red fluorescence protein) gekoppelt exprimiert wird. Das Vpr ist C-terminal an das Rfp fusioniert. Die Expression des Peptid-Rfp-Vpr-Fusionproteins steht unter CMV-Promotorkontrolle. Als Basis für die Herstellung des pF25-X-Rfp-Vpr-Konstruktes (X-Peptid, Kap.2.1.6.1) diente der pF25-Gfp-Vpr-Vektor (Abbildung 2-3). Aus diesem Vektor wird das Gfp (green fluorescence protein) zwischen NheI und NarI-Schnittstellen deletiert und durch das Rfp ersetzt. Das Rfp wird mittels einer PCR (Kap.2.2.4) aus dem pHR'SINcPPT-SRW-Vektor (Abbildung 2-7) unter Einführung der NheI/NarI Schnittstellen amplifiziert und in den NheI/NarI geöffneten pF25-Vpr-Vektor kloniert. Für die Klonierung (Kap.2.2.5) der Peptide wird das Plasmid SacII/NheI geöffnet und ein für die Peptide codierender Linker (Kap.2.1.4, Kap.2.2.3) eingesetzt.

Der Grund für den Ersatz des Gfp's durch das Rfp waren die Absorptionsmaxima der Proteine. Für die Analyse der Proteinlokalisierung und-expression werden die transient transfizierten Zellen gefärbt und im CLSM untersucht. Da aber die Absorptionsmaxima von eYfp (Absmax. 495nm), das in den HR⁺YFP-Zellen stabil exprimiert wird, und eGfp (Absmax. 506nm) sich überlagern und somit die Unterscheidung zwischen der beiden Proteinen unmöglich wäre, musste das Gfp aus dem pF25 Gfp-Vpr-Vektor gegen das Rfp (Absmax. 558nm) ausgetauscht werden.

In der Gruppe von Dr. M. Grez wurde eine stabile HR⁺YFP-Zelllinie (Kap.2.1.13) mit dem LTR-, Ψ -Verpackungssignal und dem Yfp-Markergen generiert. Für die Herstellung lentiviraler Vektoren werden lediglich noch die Verpackungskonstrukte mit den Gag-Pol-Genen pCMV Δ R8.91 und dem VSV-G-Hüllprotein pMDG.2 sowie ein Plasmid mit dem zu untersuchenden Transfergen, das Peptid-Rfp-Vpr-Plasmid, benötigt. Die generierten Pseudoviren tragen das verpackbare Ψ -Yfp-Konstrukt.

2.5.4 Transiente Kalzium-Phosphat Transfektion von HR⁺YFP-Zellen zur Produktion von Lentiviren

Unter bestimmten Bedingungen können Zellen extern zugefügte DNA aufnehmen. Für die Transfektion werden 1×10^6 Zellen/Loch in eine 6-Well-Platte ausgesät. Die Konfluenz am nächsten Tag sollte 80% betragen. Zwei Stunden vor Transfektion wird das Medium gewechselt.

Für die Herstellung des Präzipitats werden:

6 μ l 2,5mM CaCl₂

5-10 μ g Plasmid-DNA (Verpackungskonstrukte + Transfergen-Vektor)

ad 60 μ l Aqua dest.

gemischt und unter Aufwirbeln zu 60 μ l 2 x HEPES tröpfchenweise hinzugefügt. Das Gemisch wird 20 Minuten bei Raumtemperatur zur Präzipitatbildung inkubiert und anschließend tröpfchenweise auf die Zellen gegeben.

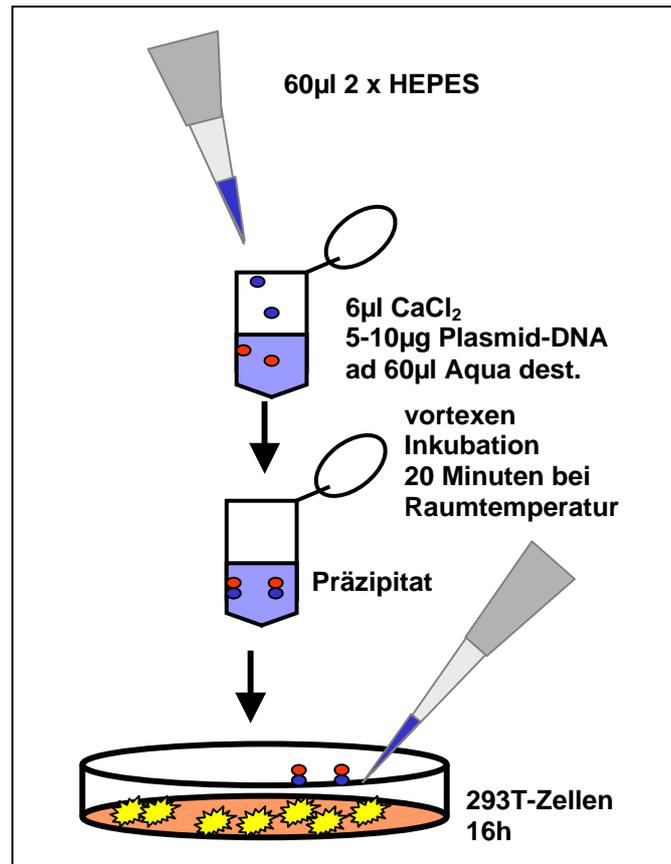


Abbildung 2-13: Herstellung des Präzipitats für die Transfektion.

Plasmid-DNA	VSV-G WT	Rfp-Vpr	GSGSGS- Rfp-Vpr	HWWPWW- Rfp-Vpr	HAWPWW- Rfp-Vpr	HWAWWW- Rfp-Vpr
pCMV ΔR8.91	1,6µg	1,6µg	1,6µg	1,6µg	1,6µg	1,6µg
pMDG.2 VSV-G	0,87µg	0,87µg	0,87µg	0,87µg	0,87µg	0,87µg
X-Rfp-Vpr	x	1-7µg	1-7µg	1-7µg	1-7µg	1-7µg
2,5mM CaCl ₂	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl	6µl
H ₂ O	ad 60µl	ad 60µl	ad 60µl	ad 60µl	ad 60µl	ad 60µl
2xHEPES	60µl	60µl	60µl	60µl	60µl	60µl

Tabelle 2-1: Zusammensetzung der Transfektionsgemische zur Herstellung von Pseudoviren (X = GSGSGS/ HWWPWW/ HAWPWW/ HWAWWW).

Plasmid-DNA	Konzentration
X-Rfp-Vpr	0-7µg
2,5mM CaCl ₂	6µl
H ₂ O	ad 60µl
2xHEPES	60µl

Tabelle 2-2: Zusammensetzung der Transfektionsgemische für die transiente Transfektion von HR-YFP-Zellen zur Lokalisation der Fusionproteine (X = GSGSGS/HWWPWW/ HAWPWW/ HWWAWW).

Nach 16 Stunden wird das Kulturmedium gewechselt. Die Transfektion wird unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Als Maß für die Transfektionseffizienz wird die Expression des X-Rfp-Vpr-Fusionproteins gewertet. Die virushaltigen Zellüberstände werden nach 48 Stunden geerntet und bei -80°C gelagert. Die Aliquots werden für die Bestimmung des Virustiters mittels des p24-Tests (Kap.2.5.5) und die Real-time-PCR (Kap.2.6) verwendet.

2.5.5 Zellfärbung zur Lokalisation des Peptid-Rfp-Fusionproteins

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM, Leica) ist eine mikroskopische Methode, die sich durch erhöhtes Auflösungsvermögen auszeichnet. Dabei wird eine Probe mit einem fokussierten Laserstrahl abgerastert. Damit ist eine exakte räumliche Verteilung von Fluoreszenzfarbstoffen oder die Detektion von fluoreszierenden intrazellulären Proteinen wie Rfp (Absmax. 558 nm) in biologischen Objekten möglich. Das System ermöglicht die Lokalisation von mehreren Fluorochromen. Dadurch können verschiedene Zellkompartimente bzw. exprimierte Proteine gleichzeitig untersucht werden. Die Analyse der Objekte erfolgt mit externer Software von Leica Confocal System (LCS).

Bei der Auswahl der Fluorochrome muss darauf geachtet werden, dass sich die Absorbitionsspektren der Farbstoffe sowie des zu detektierenden Expressionsproteins nicht überschneiden.

Für die Färbung der Zellkerne wird der Farbstoff ToPro®-3 (MoBiTec, Göttingen) mit einem Absorptionsmaximum von 661nm benutzt. Die Zellmembranfärbung erfolgt mit dem AlexaFluor488 Farbstoff (MoBiTec, Göttingen), dessen Absorbitionsmaximum bei 495nm liegt.

In eine 4 Loch-Platte mit integriertem Objektträger werden 1×10^5 293T-Zellen in DMEM-Medium ausplattiert und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt, die Zellen wie im Kap.2.5.4 beschrieben mit dem pF25-X-Rfp-Vpr-Plasmid (Kap.2.1.6.1) transfiziert und kultiviert. Nachdem die Expression im Floreszenzmikroskop überprüft wurde, werden die Zellen mit 1 x PBS dreimal gewaschen, mit 4%PFA/PBS 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert und erneut gewaschen. Die Farbstoffe werden 1:50 in PBS verdünnt, auf die fixierten Zellen aufgetragen und 3 Minuten im Dunkeln inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wird durch dreimaliges Waschen entfernt, das Präparat getrocknet und anschließend mit einer Ölschicht zur Fixierung des Farbstoffs überzogen. Das Deckgläschen wird durch Nagellack befestigt. Die Proben können lichtgeschützt mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

2.5.6 ELISA zur Bestimmung der p24-Konzentration in Zellkulturüberständen

Die Detektion und Quantifizierung der p24-Konzentration im Zellüberstand, die ein Maß für die Produktion viraler Partikel ist, erfolgt mit dem Innostest HIV™ Antigen mAb der Firma Innogenetics (Heiden) nach Angaben des Herstellers. Der Test basiert auf der Erkennung des HIV-1 Kapsidproteins p24 durch einen murinen anti-p24-Antikörper.

Da die Konzentration des p24-Proteins in den Zellüberständen unbekannt ist, kann diese anhand einer Standardkurve bestimmt werden. Hierfür wird eine Verdünnungsreihe (1:4 – 1:16) der Standardlösung erstellt und der Test nach Vorschrift durchgeführt. Der Auswertung wird das Modell der linearen Regression zugrunde gelegt.

Für die Bestimmung der p24-Konzentration werden die Zellüberstände nach Bedarf 1:100 bis 1:10000 verdünnt und dem Test unterzogen. Je Probe wird mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.5.7 Präparation viraler RNA aus Kulturüberständen

Die Präparation der viralen RNA aus den Kulturüberständen findet unter Verwendung des QIAamp®RNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) laut Angabe des Herstellers statt. Für die Präparation der RNA werden gleiche Mengen (14ng)

an p24 eingesetzt. In Abhängigkeit von dem zu präparierenden Volumen werden die Volumina der einzusetzenden Lösungen des Kits variiert. Um eine Kontamination der Proben mit chromosomaler DNA zu vermeiden, wird die isolierte RNA mit 1 µl (10U/µl) DNase (Roche, Penzberg) bei 37°C, 15 Minuten behandelt, an die sich die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 20 Minuten anschließt.

Die isolierte RNA wird kurzfristig bei –20°C gelagert und kann für die Real-time-PCR verwendet werden.

2.6 Real-time-PCR

Real-time-PCR ist eine hochsensitive Methode zur RNA-Quantifizierung. Sie basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion. Hierfür wird ein Farbstoff (SYBRGreen) benutzt, der im entstehenden doppelsträngigen PCR-Produkt interkaliert. Durch die Interkalierung erhöht sich die Fluoreszenz des Farbstoffs, der mit dem iCycler iQ™ von Biorad detektiert wird. Anhand der Größe des Fluoreszenzsignals kann man auf die vorhandene cDNA-Menge schließen. Durch die Aufnahme des Signals ist es möglich, die Zunahme des Produktes während eines PCR-Laufs zu verfolgen. Da der Farbstoff jedoch unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert, muss sichergestellt werden, dass nur ein PCR-Produkt synthetisiert wird.

Die Temperatur, bei der die Fluoreszenz des SYBRGreen schlagartig abnimmt, ist die Schmelztemperatur. Werden mehrere Schmelztemperaturen gemessen, so wurden mehrere verschiedene PCR-Produkte gebildet. Dies erscheint in Form von mehreren Peaks (Abbildung 2-14A) in der Schmelzkurve. In diesem Fall darf das Experiment nicht zur Quantifizierung der Ausgangs cDNA herangezogen werden. Ein Peak deutet auf eine spezifische Bindung der Primer an das Templat (Abbildung 2-14B) hin, wobei ein Produkt entsteht.

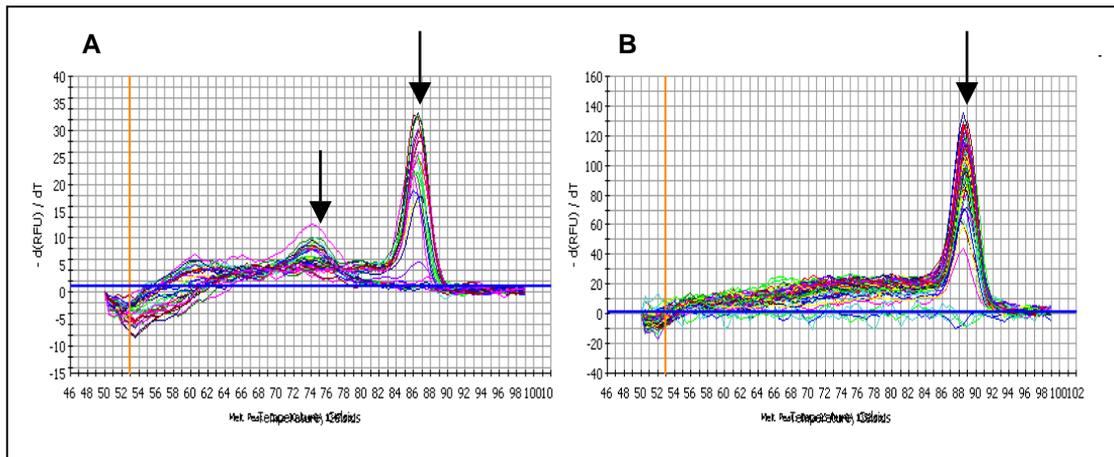


Abbildung 2-14: Schmelzkurven-Diagramm eines Real-time-Experimentes A: mit zwei Peaks (Pfeil); Zwei Schmelztemperaturen deuten auf eine mehrfache, unspezifische Bindung der Primer an das Templat. Dabei entstehen mehrere Produkte (mehrere Peaks). **B: mit einem Peak (Pfeil).** Ein Peak deutet auf eine spezifische Bindung der Primer an das Templat hin. Es entsteht ein Produkt.

2.6.1 Primer-Design für die Real-time-PCR

Um einen optimalen Verlauf der quantitativen PCR zu garantieren, ist es wichtig beim Primer-Design mehrere Faktoren zu berücksichtigen. Der prozentuale G/C-Anteil sollte, um mögliche nichtspezifische Interaktionen auszuschließen, zwischen 20 - 80% liegen und der Primer sollte eine Schmelztemperatur von 58 - 62°C aufweisen. Eine entscheidende Rolle bei der quantitativen PCR spielt auch die Länge des Amplikons (50 - 150 nt), da die Quantifizierung des gebildeten Produktes auf der Effizienz der Amplifikation basiert. Je kleiner das Produkt, umso effektiver verläuft die exponentielle Anreicherung des Produktes. Aus diesem Grund sollten die Primer einen möglichst kleinen DNA-Bereich flankieren.

2.6.2 Umschreiben der RNA in cDNA

Zur Quantifizierung der viralen RNA in der Real-time-PCR wird diese zunächst in cDNA mittels der reversen Transkriptase SuperScript™II (Invitrogen, Karlsruhe) umgeschrieben. Die SuperScript™II-Polymerase besitzt eine erhöhte Thermostabilität und eine reduzierte RNaseH-Aktivität. Die Reaktion findet im mitgeliefertem Puffer, in 20µl Endvolumen statt. Vor der Zugabe zum Reaktionsansatz wird die RNA bei 80°C, 10 Minuten zur Lösung der Tertiärstruktur denaturiert.

Zusammensetzung	Volumen
10 x Puffer	2µl
Primer SL4r (100pmol)	1µl
dNTP-Mix (10mM)	1µl
MgCl ₂ (2,5M)	4µl
RNase Inhibitor	0,5µl
SuperScript™II	0,25µl
RNase freies Wasser	1,25µl
vRNA (9ng)	10µl
Endvolumen	20µl

Die Reaktion wird 1h bei 37°C inkubiert. Die cDNA wird 1:10 verdünnt in der Real-time-PCR verwendet.

2.6.3 Durchführung der Real-time-Experimente

Die Quantifizierung der viralen RNA in den Zellkulturüberständen (Pseudoviren, Kap.2.5.3) findet durch die Anwendung der Real-time-PCR unter Benutzung des iCycler iQ™ von Biorad statt.

In den Versuchsansatz wird die 1:10 verdünnte, aus der viralen RNA umgeschriebene cDNA sowie der iQ™SYBR®Green Supermix eingesetzt. In dem Supermix sind alle nötigen Bestandteile wie DNA-Polymerase, SYBR-Green, Puffer, dNTP's und Fluoreszin (Referenzfarbstoff) enthalten. Jede Probe wird einer Doppelbestimmung unterzogen.

Zusammensetzung	Volumen
SYBR-Green-Mix	12,5µl
Primer SL1d (50pM)	0,5µl
Primer SL4r (50pM)	0,5µl
cDNA 1:10 verdünnt	2,5µl
Wasser	9µl
Endvolumen	25µl

Die PCR wird standardmäßig nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1	1	95°C	3 Minuten	Enzymaktivierung
2	45	94°C	30s	Denaturierung
		58°C	30s	Hybridisierung
		72°C	45s	Elongation

Schmelzkurve:

15s 95°C

15s 50°C

von 50°C bis 100°C in 0,5°C findet in Schritten je 10 s statt.

2.6.4 Auswertung der Real-time-PCR

Für die Auswertung der Real-time-PCR werden zunächst die Schmelzkurven aller untersuchten Proben analysiert. Wichtig für ein erfolgreiches Experiment ist eine Schmelztemperatur von über 70°C und nur ein Peak in der Schmelzkurve (Abbildung 2-14). Mehrere Peaks deuten auf die unspezifische Bindung der Primer an das Templat und somit mehrere Amplifikate, eine Schmelztemperatur von 70°C auf die Ausbildung von Primer-Dimeren, hin. Optimalerweise sollen die Amplifikationskurven (Abbildung 2-15) sigmoiden Verlauf aufweisen und Auskunft über die Effizienz der Reaktion geben. Je steiler diese sind, umso effizienter verläuft die Amplifikation.

Der Schwellenwert wird durch die Gerätesoftware errechnet und in den linearen Bereich der Kurve gesetzt. Anschließend errechnet das Programm für jede Probe den C_t -Wert (C_t =Threshold Cycle), die Zyklenzahl, die benötigt wird um den Schwellenwert zu erreichen. Je kleiner der Wert, umso mehr cDNA befindet sich in der Probe. Zum Vergleich und Auswertung der Proben sollte immer ein Referenzwert herangezogen werden. Als Referenz können die Wildtyp VSV-G oder Kontroll-Pseudoviren (Tabelle 2-1) verwendet werden. Um die cDNA-Proben mit dem Referenzwert vergleichen zu können, muss sichergestellt werden, dass keine Unterschiede bei der Präparation und der cDNA-Synthese aufgetreten sind. Um dies zu erzielen, sollte die Präparation und die reverse Transkription der Referenz und Probe parallel

verlaufen. Pipetierfehler beim Ansetzen der Real-time-PCR können nicht ausgeschlossen werden.

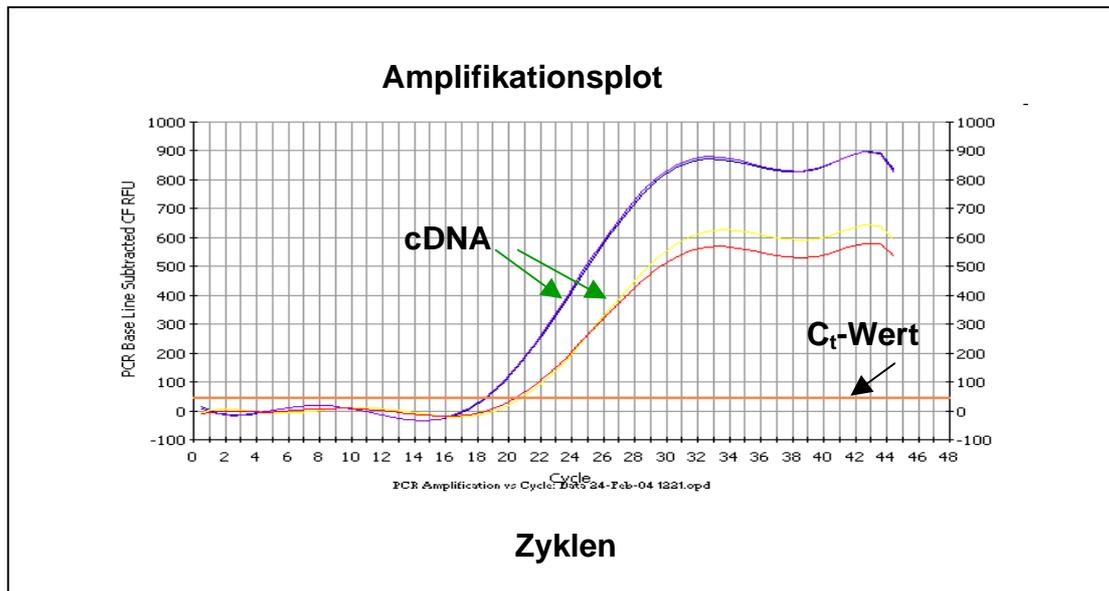


Abbildung 2-15: Exemplarische Darstellung eines Real-time-Experiments. Der C_t -Wert bezeichnet die Anzahl der Zyklen, die eine Probe benötigt um den Schwellenwert zu durchbrechen. Die grünen Pfeile zeigen den Unterschied zwischen den einzelnen cDNA's.

3 Ergebnisse

Die Entwicklung der Phage-Display-Technik ermöglichte das Durchsuchen von Phagen-Banken nach geeigneten Peptidliganden. Die Methode wird z.B. erfolgreich zur Identifizierung von Antikörperepitopen eingesetzt. Die Technik kann aber auch der Identifizierung von Liganden für funktionelle RNA-Strukturen dienen, was von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte⁹⁹.

Im Rahmen des Projektes sollte die Methode des Phage-Display für die Suche nach Peptidliganden für das HIV_{NL4-3} Ψ -Verpackungssignal sowie die Stammschleife SL3 eingesetzt werden. Die ca. 120nt umfassende Verpackungssequenz Ψ bildet die Ausgangsbasis für das Durchsuchen der Phagenbanken nach möglichst hochaffinen Liganden, die später die Interaktion von der Ψ -RNA mit dem p55^{Gag}-Protein hemmen sollen und die gezielte Inhibition der Verpackung der viralen RNA in die knospenden Viruspartikel ermöglichen.

3.1 Auswahl einer geeigneten Kontroll-RNA

Um eine möglichst effektive Affinitätsselektion mit einer hohen Ausbeute an Liganden zu erzielen, ist es notwendig, unspezifische Phagenbindungen an die Ziel-RNA zu eliminieren. Dies kann in Form einer Kompetition, durch die Zugabe einer Kontroll-RNA zum Reaktionsansatz oder durch eine negative Selektion unter Verwendung einer irrelevanten RNA geschehen. Eine höhere Effizienz kann durch die Kombination beider Schritte erzielt werden. Es wird von einer negativ-kompetitiver Selektion gesprochen. Dabei wird sowohl die Kontroll-RNA als auch die Ziel-RNA dem Reaktionsansatz zugegeben.

Im Rahmen des Projektes wurde nach sequenz- und strukturspezifischen Ψ - bzw. SL3-Liganden gesucht. Somit galt für die Auswahl der Kontroll-RNA, dass sich diese von der Ziel-RNA in der Primär- und Sekundärstruktur, jedoch nicht in der Länge unterscheiden sollte. Als Kontroll-RNA für das Ψ -Biopanning fungierte eine Teilsequenz des humanen CCR5-Rezeptors (nt735-nt864; Kap.2.1.5), die aus dem pcDNA3CCR5-Plasmid (Abbildung 2-2) stammte. Für das SL3-Biopanning wurde die SL3mut eingesetzt (Kap.2.1.5). Diese unterschied sich von der Zielsequenz durch Mutationen im Schleifenbereich (Kap.2.4.2).

3.2 Strategie zur Klonierung und Immobilisierung der RNA

Die Immobilisierung der RNA an die mit Streptavidin beschichtete Platten erfolgte mittels biotinylierter Oligonukleotide, wobei das RNA-3'bio-Oligonukleotid (Kap.2.1.4) sowohl zum 5'-Ende der Ψ -RNA als auch der CCR5-RNA (Kap.2.1.5) komplementär war. Das 5'bioPSIRNA-Oligonukleotid (Kap.2.1.4) war dagegen Ψ -spezifisch und hybridisierte mit der komplementären Sequenz am 3'-Ende des Ψ -Transkripts (Kap.2.1.5). Um Interferenzen der Oligonukleotide mit der RNA-Tertiärstruktur zu verhindern, musste das Transkript so konzipiert sein, dass sich sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende der Zielsequenz ein Spacer befindet. Dieser gehört nicht zur Ziel-Sequenz, ermöglicht aber die Hybridisierung der Oligonukleotide. Die Klonierung war so konzipiert, dass zwischen dem T7-Promotor und der Klonierungsstelle eine 20nt lange Sequenz belassen wurde, die ebenfalls transkribiert wurde und somit das 5'-Ende des Transkriptes bildete. Um einen Hybridisierungsabschnitt für das 5'bio-PSIRNA-Oligonukleotid zu generieren, wurde das Ψ -Fragment (120nt) plus 20nt zusätzlich aus dem pNL4-3 amplifiziert. Das Ψ -Amplifikat wurde in den EcoRI/HindIII geschnittenen pTriKan18-Vektor kloniert. Zur Generierung der Kontroll-RNA wurde das CCR5-DNA-Fragment (140nt) in den KpnI/PstI geschnittenen pTriKan18-Vektor (Abbildung 2-8) kloniert.

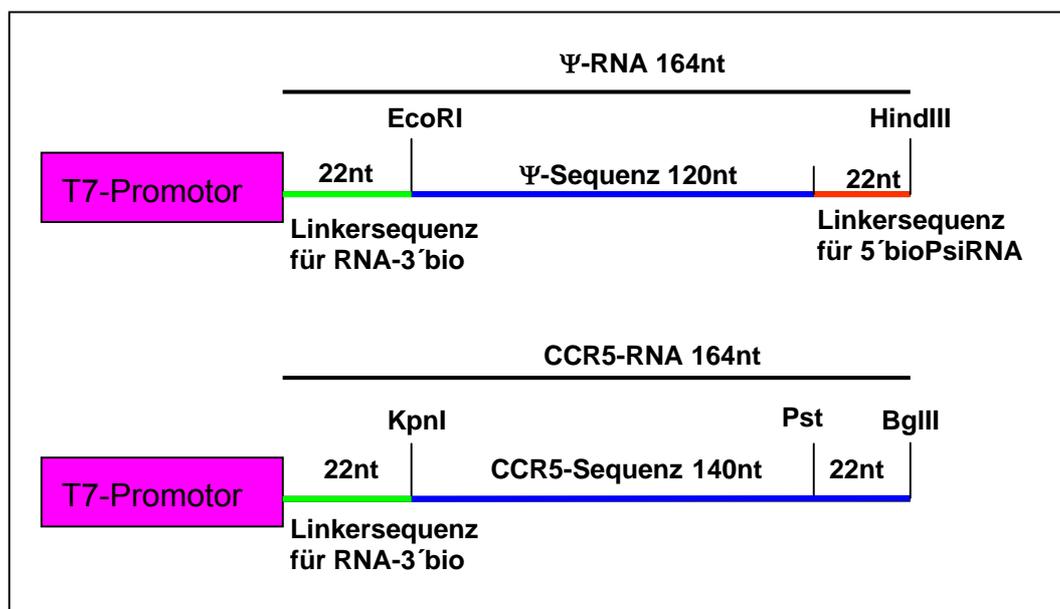


Abbildung 3-1: Strategie zur Klonierung und Immobilisierung der Ψ - und CCR5-Fragmente in den pTriKan18-Vektor. Am 5'- und 3'-Ende befinden sich Spacer, die die Hybridisierung der Oligonukleotide ermöglichen.

3.3 *In vitro* Transkription von Ψ - und CCR5-Kontroll-RNA

Um Transkripte einer definierten Länge zu erhalten, wurde das pTriKanPSI-Plasmid (Kap.2.1.6.1) mit HindIII und das pTriKanCCR5-Plasmid (Kap.2.1.6.1) mit BglII linearisiert. Die Transkription erfolgte mit der T7-Polymerase (MegaShort Script™ T7 Kit, Ambion, Inc., Cambridgeshire, UK).

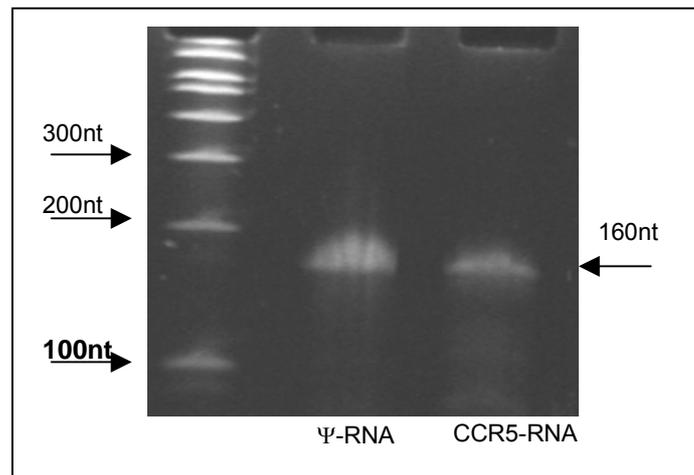


Abbildung 3-2: 8% PAA denat. Gel zur Verifizierung der Transkriptlänge. Die Ψ - und CCR5-Kontroll-RNA-Fragmente hatten eine Länge von 160nt.

Die Länge der RNA-Fragmente wurde in einem 8%-igen PAA denat. Gel anhand eines Größenstandards verifiziert. Die Transkripte hatten, wie erwartet, eine Länge von 160nt.

3.4 Funktionalitätsnachweis der Transkripte mittels EMSA

Bevor die Transkripte für das Screening von Phagen-Banken eingesetzt werden konnten, mussten diese auf ihre Funktionalität und Stabilität unter den Versuchsbedingungen getestet werden.

Zum Nachweis der Funktionalität der Transkripte (bezogen auf die Bindung des p55^{Gag}-Proteins an Ψ -RNA) wurde die isotopenmarkierte Ψ - und CCR5-Kontroll-RNA mit dem nativen HIV-1 p55^{Gag}-Protein (Kap.2.1.9) und Hefe tRNA als unspezifischen Kompetitor inkubiert. Anschließend wurde die Bindung des Proteins an die Transkripte anhand der Gelretentionsanalyse (Kap.2.3.3) in einem nativen 5%-igen PAA-Gel untersucht. Zur Kontrolle der spezifischen Bindung wurde die CCR5-Kontroll-RNA eingesetzt.

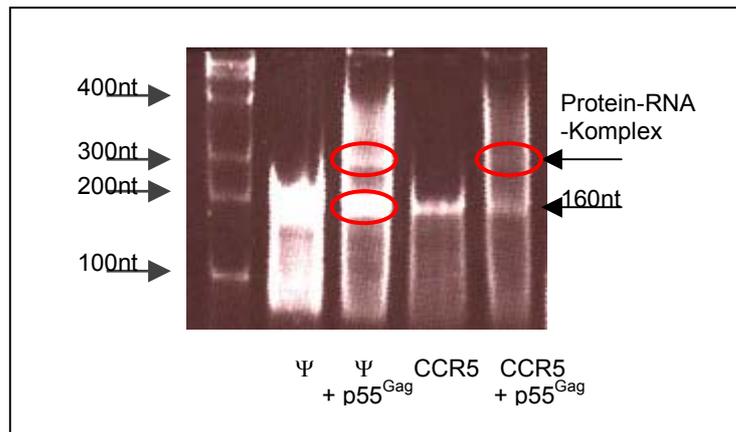


Abbildung 3-3: Gelretentionsanalyse im nativen 5% PAA Gel. Das p55^{Gag}-Protein bindet an die transkribierte Ψ-RNA. Eine schwache Bindung ist ebenfalls an die CCR5-Kontroll-RNA zu beobachten. Die Bindung verursachte eine langsamere Retention des RNA-Protein-Komplexes im Gel.

Die Inkubation der Ψ-RNA mit dem nativen p55^{Gag}-Protein führte zur Ausbildung eines Protein-RNA-Komplexes, was eine verringerte Retention im Gel im Vergleich mit der Probe ohne Protein, verursachte. Des Weiteren war eine 350nt lange Bande zu erkennen. Aufgrund ihrer Größe ist anzunehmen, dass es sich um Ψ-RNA-Dimere handelte. Wurde die CCR5-Kontroll-RNA mit dem p55^{Gag}-Protein inkubiert, so war eine schwache Bande in der Höhe des RNA/Protein-Komplexes erkennbar. Dies deutete auf eine schwache Bindung des Proteins an das CCR5-Fragment hin. Die Intensität der Banden ist ein Indiz für die Menge des RNA-Protein-Komplexes. Da die Bande im Ψ-Ansatz deutlich stärker war als im CCR5-Ansatz, kann davon ausgegangen werden, dass das p55^{Gag}-Protein eine höhere Affinität zur Ψ-RNA als zur CCR5-Kontroll-RNA hat.

3.5 Stabilitätsnachweis unter Versuchsbedingungen

Die RNA-Stabilität unter Versuchsbedingungen wurde im nativen, 5%-igen PAA-Gel analysiert. Hierfür wurden die Transkripte zunächst mit 10µl der Phagen-Bank (Kap.2.1.7) bei 4°C 4h inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Intaktheit wurde anhand eines Größenstandards verifiziert.

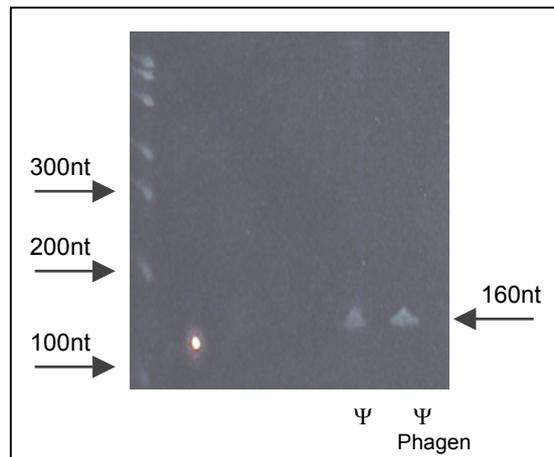


Abbildung 3-4: 5% PAA nativ. Gel zum Stabilitätsnachweis der Transkripte. Die RNA-Fragmente wiesen die erwartete Länge von 160nt auf und waren somit stabil unter den Biopanningbedingungen.

Sowohl die unbehandelte Ψ -RNA als auch das mit der Phagen-Bank inkubierte Ψ -Fragment liefen bei 160nt, was der transkribierten Fragmentgröße entsprach. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die Stabilität der RNA unter den Biopanningbedingungen (Kap.2.4) gewährleistet war.

3.6 Nachweis von DNA-RNA-Heteroduplices

Bei der Analyse der RNA-DNA-Heteroduplices wurden die Ψ - und CCR5-Transkripte mit den 5'bioPSIRNA- und RNA-3'bio-Oligonukleotiden hybridisiert und im 5%-igen, nativen PAA-Gel, 1%-igem MOPS-Gel und mittels ELISA untersucht.

3.6.1 Nachweis der RNA-DNA-Heteroduplices durch das Blotten der MOPS-Gele

Bei diesem Versuch wurden die Proben zunächst im 1%-igen MOPS-Gel elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran durch Kapillarkräfte transferiert (Kap.2.3.6.1). Der Nachweis erfolgte durch Streptavidin-HRP-Konjugat, die Detektion der Peroxidaseaktivität mit dem ECL-Kit nach Angaben des Herstellers. Zeigte eine Probe ein Signal, so wurde sie als RNA-DNA-Heteroduplex identifiziert. Kein Signal deutete auf fehlende Hybridisierung der Oligonukleotide mit der RNA hin.

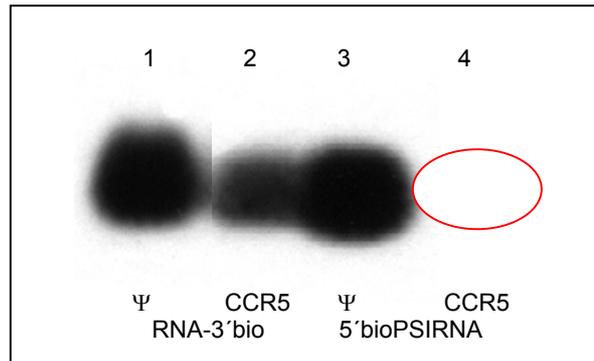


Abbildung 3-5: Blotten eines MOPS-Gels zum Nachweis der RNA-DNA-Heteroduplices. Die Heteroduplices wurden durch Kapillarkräfte auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte durch Streptavidin-HRP und anschließend dem ECL-Kit.

Wie in der Abbildung zu sehen ist, zeigten die Proben 1 (Ψ + RNA-3'bio), 2 (CCR5 + RNA-3'bio) und 3 (5'bioPSIRNA) ein deutliches Signal. Die Probe 4 (CCR5 + 5'bioPSIRNA) war dagegen negativ. Dies deutete auf eine Hybridisierung des RNA-3'bio-Oligonukleotides mit beiden Transkripten hin, das 5'bioPSIRNA-Oligonukleotid hat wie erwartet nur mit der Ψ -RNA hybridisiert.

3.6.2 Gelretentionsanalyse zum Nachweis der RNA-DNA-Heteroduplices.

Für die Analyse der RNA-DNA-Heteroduplices wurde ein EMSA, wie im Kap.2.3.6.1 beschreiben, durchgeführt.

Die Bildung einer RNA-DNA-Heteroduplex ist an der verlangsamten Retention im 5%-igen, nativen PAA-Gel erkennbar. Zum Vergleich wurden die RNA-Fragmente ohne Zugabe von Oligonukleotiden auf das Gel aufgetragen.

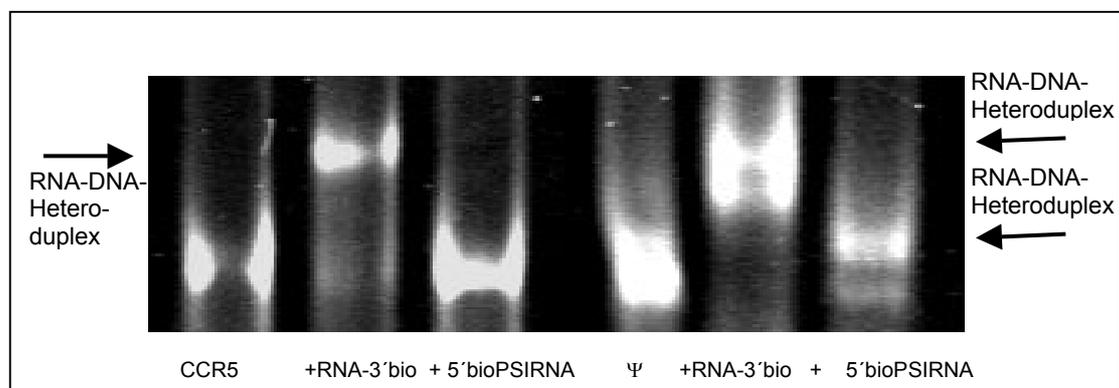


Abbildung 3-6: Gelretentionsanalyse im 5%-igen, nativen PAA Gel zum Nachweis der RNA-DNA-Heteroduplices. Die Hybridisierung des biotinylierten Oligonukleotides an die komplementäre RNA-Sequenz verursacht eine verlangsamte Retention der Probe im Gel.

Vergleicht man die Laufgeschwindigkeit des Ψ -Kontrollansatzes mit der der Ψ -RNA + RNA-3'bio, so ist ein deutlicher Unterschied in der Retention zu beobachten. Durch die Inkubation der RNA mit dem Oligonukleotid verringerte sich die Laufgeschwindigkeit, was auf eine Hybridisierung der Reaktionspartner hindeutet. Wurde die Ψ -RNA mit dem 5'bioPSIRNA-Oligonukleotid inkubiert, so ist ebenfalls ein Retentionsunterschied zum Ψ -Kontrollansatz erkennbar. Dieser ist jedoch nicht so deutlich wie mit dem RNA-3'bio-Oligonukleotid. Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen kann durch die Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen die Hybridisierung des Oligonukleotids erschwert werden, zum anderen könnte der Grund ein vorzeitiger Abbruch der Transkription sein. Dies würde bedeuten, dass einige Nukleotide am 3'-Ende des Transkriptes fehlen. Obwohl die Länge des Transkriptes mit Hilfe des denaturierenden PAA-Gels bestimmt wurde, so ist es nicht möglich die nukleotid-genaue Länge zu bestimmen. Dadurch wurde die Hybridisierung des Oligos beeinträchtigt. Folglich war das RNA-3'bio-Oligonukleotid für die Hybridisierung besser geeignet und sollte somit in den weiteren Versuchen verwendet werden.

Die Inkubation der CCR5-Kontroll-RNA mit den Oligonukleotiden führte nur bei dem RNA-3'bio-Oligonukleotid zur Hybridisierung. Wie erwartet hat das 5'bioPSIRNA-Oligonukleotid nicht an das CCR5-Transkript hybridisiert. Für die Hybridisierung der CCR5-Kontroll-RNA kann ebenfalls das RNA-3'bio-Oligonukleotid eingesetzt werden.

3.6.3 Nachweis der Funktionalität der Transkripte mittels ELISA / RNA-Immobilisierung

Einen weiteren Nachweis der Funktionalität und gleichzeitig der RNA-Immobilisierung lieferten die Ergebnisse des ELISA's. Die Immobilisierung erfolgte über die Biotin-Streptavidin-Bindung. Dazu wurden zunächst die Transkripte mit den Oligonukleotiden hybridisiert und anschließend mit dem p55^{Gag}-Protein inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit einem α -HIV-1 p55/17 IgG1 Antikörper (Kap.2.1.11) und dem α -Maus-HRP-Zweitantikörper (Kap.2.1.11). Der Versuchsaufbau ist im Kap.2.3.6.3 beschrieben. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle in Form von Streptavidin eingeführt. Ihre Reaktionsstärke diente als Anhaltspunkt für die Bildung des Ausschlußwertes (AW), der den 3fachen Wert der Negativkontrolle betrug. Eine OD, die höher lag als der AW, wurde als positiv gewertet und deutete auf die Bindung des Gag-Proteins an die RNA hin.

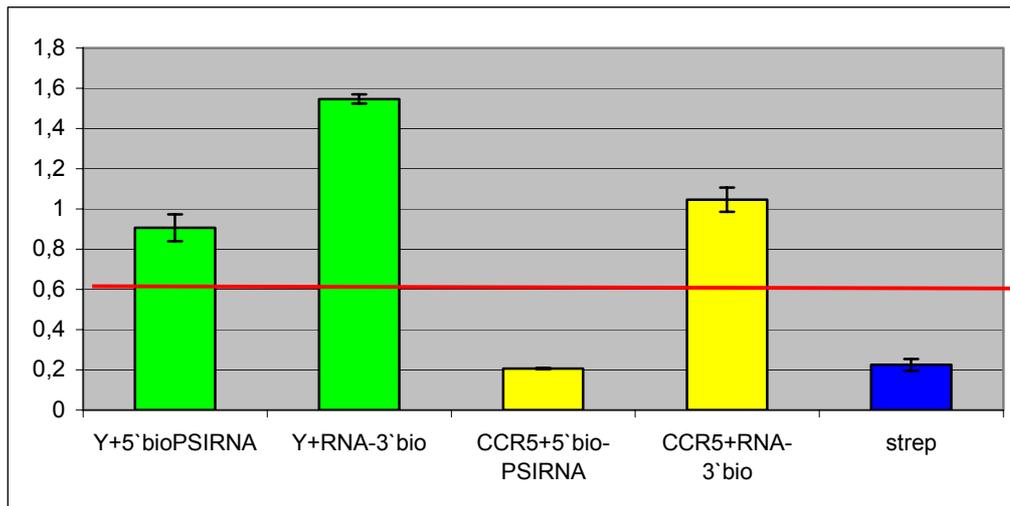


Abbildung 3-7: ELISA zum Nachweis der Funktionalität der Transkripte. Der Ausschlußwert lag bei 0,6. Die Bindung des p55^{Gag}-Proteins führte zur erhöhten OD.

Der Vergleichswert der Negativkontrolle lag bei 0,2 bei 492nm, der Ausschlußwert somit bei 0,6. Eine höhere OD deutete auf eine größere Menge des RNA-Protein-Komplexes hin.

Für die Detektion des p55^{Gag}-RNA-Komplexes war die Immobilisierung der RNA entscheidend. Voraussetzung für die Immobilisierung war die Ausbildung einer RNA-DNA-Heteroduplex. Wie bereits im Kap.3.6.2 gezeigt wurde, war das 3'bio-Oligonukleotid für die Immobilisierung der RNA geeigneter als das 5'bioPSIRNA-Oligonukleotid. Dementsprechend fielen die Ergebnisse des ELISA's aus. Wurde die Ψ -RNA mit dem p55^{Gag}-Protein inkubiert, so bildete sich ein Ψ -p55^{Gag}-Komplex aus. Dabei war hing aber die detektierte Menge des Ψ -p55^{Gag}-Komplexes von dem verwendetem Oligonukleotid ab. Wurde die Ψ -3'bio-Oligo-Heteroduplex mit dem p55^{Gag}-Protein inkubiert, so führte dies zu einer höheren OD als die Inkubation mit der Ψ -5'bioPSIRNA-Oligo-Heteroduplex.

Wurde die CCR5-Kontroll-RNA mit dem RNA-3'bio-Oligonukleotid inkubiert, so konnte auch hier ein CCR5-p55^{Gag}-Komplex detektiert werden. Diese schwache Bindung des p55^{Gag}-Proteins wurde auch schon bei der Gelretentionsanalyse (Abbildung 3-3) beobachtet. Da das 5'bioPSIRNA-Oligonukleotid nicht an die CCR5-RNA hybridisierte, konnte dementsprechen auch keine p55^{Gag}-Bindung detektiert werden.

Durch diesen Versuch konnte sowohl die Funktionalität der Transkripte, die Ausbildung der RNA-DNA-Heteroduplices als auch die RNA-Immobilisierung untersucht werden.

Zusammenfassend konnte man sagen, dass die transkribierten RNA-Fragmente unter Versuchsbedingungen stabil waren (Kap.3.5). Die Ψ -RNA war funktionell und hat spezifisch das native $p55^{\text{Gag}}$ -Protein gebunden. Das $p55^{\text{Gag}}$ -Protein zeigte eine schwache Bindung an die CCR5-RNA (Kap.3.4). Die Immobilisierung der Ψ - und CCR5-Transkripte konnte mit dem RNA-3'bio-Oligonukleotid erfolgen. Das 5'bioPSIRNA-Oligo konnte für die Immobilisierung der Ψ -RNA nicht verwendet werden, da die Ausbildung der RNA-DNA-Heteroduplex sehr schwach war. Die getesteten RNA-Transkripte konnten somit für weitere Versuche verwendet werden.

3.7 Ψ -RNA-Biopanning

Das Screening wurde mit der Ψ -Zielsequenz unter Verwendung von drei Phagen-Banken 7-mer, 12-mer und 7-cys mit zufälliger Aminosäuresequenz durchgeführt. Die eingesetzte Menge an den original Phagen-Banken betrug für die 7-mer- 2×10^9 pfu/ml und die 7-cys-Bank $3,7 \times 10^9$ pfu/ml und für die 12-mer-Bank $1,9 \times 10^9$ pfu/ml. Das Biopanning setzte sich aus 4 positiven und einer negativ-kompetitiven Selektion (Kap.2.4) zusammen. Für die negativ-kompetitive Selektion wurde die CCR5-Kontroll-RNA verwendet. Insgesamt wurden fünf unabhängige Biopannings durchgeführt.

Die Phagen aus dem Eluat der 4-ten und der 5-ten Selektion wurden getitert, die blauen Plaques ausgezählt und der Phagentiter in pfu/ml bestimmt.

Selektion	7-mer (pfu/ml)	12-mer (pfu/ml)	7cys (pfu/ml)
Ψ -1A	$2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
Ψ -2A	$2,9 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$
Ψ -2B	$2,9 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$
Ψ -2C	$4,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$
Ψ -2D	$3,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$

Tabelle 3-1: Phagentiter nach der 4-ten positiven Selektion. Getitert wurde Eluat.

Der Phagentiter nach der 4-ten positiven Selektion lag zwischen $10^6 - 10^8$ pfu/ml unabhängig von der verwendeten Phagen-Bank. Vergleicht man jedoch die einzelnen Biopannings untereinander, so treten geringe Unterschiede im Phagentiter auf, die aber wiederum eine Unabhängigkeit von der Phagen-Bank aufweisen.

Selektion	7-mer (pfu/ml)	12-mer (pfu/ml)	7cys (pfu/ml)
Ψ-1A	$3,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$1,8 \times 10^7$
Ψ-2A	$1,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^8$	$6,0 \times 10^7$
Ψ-2B	$2,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$
Ψ-2C	$3,3 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$
Ψ-2D	$5,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$

Tabelle 3-2: Phagentiter nach der 5-ten negativen Selektion. Getitert wurde das Eluat.

Wurde eine weitere Selektion (negativ-kompetitiv) zur Anreicherung von Ψ-RNA-spezifischen Phagen mit der CCR5-Kontroll-RNA durchgeführt, so hat eine Reduktion des Phagentiters stattgefunden. Der Phagentiter lag zwischen 10^5 - 10^8 pfu/ml.

Vergleicht man den Phagentiter der Originalbank mit dem der 5-ten Selektion, so ist eine Reduktion um 10^1 – 10^4 zu erkennen. Dies deutet auf eine weitere Selektion und somit eine Anreicherung von RNA-spezifischen Phagen hin.

3.7.1 ELISA zur Bestimmung der Phagenspezifität

Insgesamt wurden 1053 Klone aus dem Eluat der 5-ten negativ-kompetitiven Selektion mittels ELISA's auf ihre Reaktivität mit der Ψ-RNA in der Einfach-Bestimmung (Kap.2.4.6.1.1) getestet. Phagen, die in der Einfach-Bestimmung als positiv gewertet wurden, wurden zur Verifizierung der Ergebnisse einer Dreifach-Bestimmung (Kap.2.4.6.1.2) gegen Ψ-RNA unterzogen. Bei der Dreifach-Bestimmung wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung der einzelnen Werte berechnet. Zur Auswertung wurde die bei 492nm gemessene OD in einem Balkendiagramm aufgetragen. Als Negativkontrolle diente der Helferphage M13KO7, dessen Reaktionsstärke als Anhaltspunkt für den Ausschlußwert (AW) diente. Die Negativkontrolle zeigte die unspezifische Reaktion des Phagen mit der RNA. Als positive Phagenklone wurden solche gewertet, die Mindestens 4 x OD des Ausschlußwertes erreichten. In den unten aufgeführten Balkendiagrammen werden beispielhaft ELISA-Daten mit einigen Phagen aus der 12-mer, 7-mer und 7-cys Bank, präsentiert.

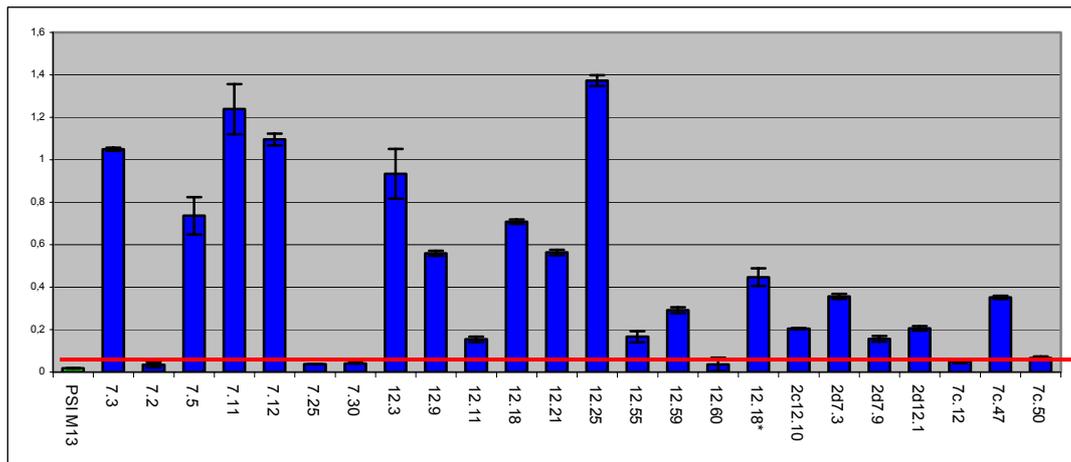


Abbildung 3-8: ELISA zur Bestimmung der Spezifität der Phagen. Phagen aus dem Eluat der 5-ten negativ-kompetitiven Selektion wurden im Triplikate auf ihre Spezifität zur Ψ -RNA getestet. Phagen-Bank 12-mer, 7-mer, 7.-cys (grün - Negativkontrolle M13KO7- Phage, blau - Phagen, rot - Ausschlußwertlinie).

Die OD-Werte der Negativkontrolle lagen bei 0,0175. Somit ergab sich ein Ausschlußwert von 0,07. Klone die eine höhere OD als 0,07 aufwiesen, wurden als positiv gewertet. Klone deren OD niedriger war, galten als nicht reaktiv. In dem hier gezeigten ELISA wurden 24 Phagenklone untersucht. Davon zeigten 6 (7.2; 7.25; 7.30; 12.60; 7c.12; 7c.50) keine Bindung an die Ψ -RNA, weitere 6 (12.11; 12.55; 12,59; 2c12.10; 2d7.3; 2d12.1) hatten eine geringe Affinität zur Ψ -RNA. 12 Klone (7.3; 7.5; 7.11; 7.12; 12.3; 12.9; 12.18; 12.21; 12.25; 12.18; 2d7.3; 7c.47) zeichneten sich durch ein Signal, das bis zum 19- fachen des Ausschlußwertes betrug, aus.

Phagenklone, die auf ihre Reaktivität mit der Ψ -RNA getestet wurden, wurden zum Nachweis der Spezifität nochmals im ELISA auf unspezifische Bindung gegen CCR5-Kontroll-RNA untersucht.

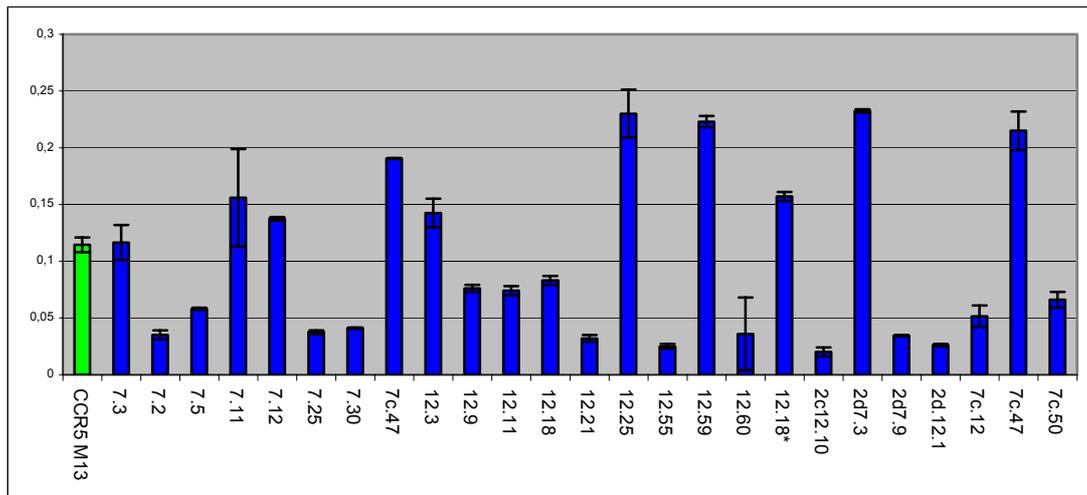


Abbildung 3-9: ELISA zur Bestimmung der Phagenspezifität. Phagen aus dem Eluat der 5-ten negativ-kompetitiven Selektion wurden im Triplikate gegen CCR5-RNA getestet. Phagen-Bank 12-mer, 7-mer, 7-cys (grün - Negativkontrolle M13KO7-Phage, blau - Phagenklone).

Die OD-Werte der Negativkontrolle lagen bei 0,114. Somit ergab sich ein Ausschlußwert von 0,456 (da die höchste OD bei 0,235 liegt, konnte die Ausschlußwertlinie nicht eingezeichnet werden). Phagenklone deren OD unterhalb des Wertes lag, haben an die CCR5-Kontroll-RNA nicht gebunden und waren somit spezifisch für die Ψ -RNA. Aus 24 untersuchten Phagenklonen hat keiner an die CCR5-Kontroll-RNA gebunden.

Alle hier exemplarisch aufgeführten Phagen zeigte eine Affinität zur Ψ -RNA jedoch keine zur CCR5-RNA. Somit wurden sie für die Sequenzierung (Kap.2.2.10) gewählt.

Die Bestimmung der Spezifität weiterer Phagenklone erfolgte analog. Von 1053 getesteter Phagenklone haben in der Einfach-Bestimmung 445 Phagen an die Ψ -RNA gebunden. Davon wurden 36 in der Dreifach-Bestimmung als Ψ -spezifisch identifiziert.

3.7.2 Statistische Verteilung positiver Phagenklone

Nach der Auswertung der positiven Phagenklone des Eluats der 5-ten Selektion, wurde eine Statistik erstellt. Diese zeigt einerseits die Anzahl der getesteten Phagenklone pro Bank und Biopanning sowie die prozentuale Verteilung der positiven und negativen Klone.

Phagen-Bank 7-mer	Summe der Klone	positive Klone	negative Klone
Ψ-1A	30	7 (20%)	23 (80%)
Ψ-2A	177	5 (3%)	172 (97%)
Ψ-2B	64	0 (0%)	64 (100%)
Ψ-2C	40	0 (0%)	40 (100%)
Ψ-2D	67	5 (8%)	62 (92%)
Summe	378 (100%)	17 (4,5%)	361 (95,5%)

Tabelle 3-3: Statistische Verteilung getesteter Phagenklone aus der 7-mer Bank.

Phagen-Bank 12-mer	Summe der Klone	positive Klone	negative Klone
Ψ-1A	60	8 (15%)	52 (85%)
Ψ-2A	186	2 (2%)	184 (98%)
Ψ-2B	67	1 (2%)	66 (98%)
Ψ-2C	32	1 (7%)	31 (93%)
Ψ-2D	56	4 (7%)	52 (93%)
Summe	401 (100%)	16 (4%)	385 (96%)

Tabelle 3-4: Statistische Verteilung getesteter Phagenklone aus der 12-mer Bank.

Phagen-Bank 7-cys	Summe der Klone	positive Klone	negative Klone
Ψ-1A	60	1 (1,5%)	59 (98,5%)
Ψ-2A	86	0	86 (100%)
Ψ-2B	40	0	40 (100%)
Ψ-2C	32	0	32 (100%)
Ψ-2D	56	2 (1%)	54 (99%)
Summe	274 (100%)	3 (1%)	271 (99%)

Tabelle 3-5: Statistische Verteilung getesteter Phagenklone aus der zyklischen 7-cys Bank.

Das Biopanning mit der 12-mer und der 7-mer Bank führte zu einer Ausbeute von 4 - 4,5% positiver Phagen.

Insgesamt wurden 1053 Klone auf ihre Affinität zur Ψ-RNA im ELISA getestet. Davon haben 36 Phagenklone (3,5%) mit der Ψ-RNA reagiert. 1014 (96,5%) Klone reagierten nicht mit der Ψ-RNA. Vergleicht man die Ausbeute an positiven Klonen, so werden Unterschiede in Abhängigkeit von der

verwendeten Bank deutlich. Wurde die zyklische 7-cys Bank verwendet, so konnte nur 1% positiver Phagen selektiert werden.

3.8 SL3-Biopanning

Da die Stammschleife SL3 der Ψ -Region das zentrale Verpackungselement bildet, wurde im Rahmen des Projektes ebenfalls nach Liganden für diese Struktur gesucht. Die Bindung des NCp7-Proteins erfolgt über die GGAG-Sequenz der Schleifenregion³⁸. Wird diese Sequenz ausgetauscht, so wird die Bindungseffizienz reduziert³⁵. Somit konnte als Kontroll-RNA ein SL3-RNA-Fragment mit mutierter Schleifenregion verwendet werden. Für die positive Selektion wurde die biotinylierte SL3-RNA (Kap.2.1.5) und für die negative Selektion die SL3mut-RNA (Kap.2.1.5) verwendet. Das Biopanning wurde wie im Kap.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurden drei unabhängige Biopannings durchgeführt.

Die Phagen aus dem Eluat der 4-ten positiven und der 5-ten negativ-kompetitiven Selektion wurden getitert, die blauen Plaques ausgezählt und der Phagentiter in pfu/ml bestimmt.

Selektion	7-mer (pfu/ml)	12-mer (pfu/ml)	7cys(pfu/ml)
SL3-1A	$8,5 \times 10^6$	$4,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^5$
SL3-1B	$7,7 \times 10^6$	$4,3 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$
SL3-1C	$2,0 \times 10^6$	$3,9 \times 10^7$	$2,6 \times 10^5$

Tabelle 3-6: Phagentiter nach der 4-ten positiven Selektion. Getitert wurde das Eluat.

Der Phagentiter nach der 4-ten positiven Selektion lag zwischen 10^5 - 10^8 pfu/ml in Abhängigkeit von der verwendeten Phagenbank. Den höchsten Titer ergab das Biopanning mit der 12-mer Bank, den niedrigsten die zyklische 7-cys Bank.

Selektion	7-mer (pfu/ml)	12-mer (pfu/ml)	7cys(pfu/ml)
SL3-1A	$8,4 \times 10^5$	$8,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$
SL3-1B	$9,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^7$	$5,4 \times 10^5$
SL3-1C	$1,3 \times 10^5$	$3,5 \times 10^6$	$5,0 \times 10^4$

Tabelle 3-7: Phagentiter nach der 5-ten negativen Selektion. Getitert wurde das Eluat.

Wurde eine weitere Selektion zur Anreicherung von SL3-RNA-spezifischen Phagen mit der SL3mut-RNA als Kompetitor durchgeführt, so verringerte sich die Anzahl der Phagen um eine Log-Stufe im Vergleich zum Phagentiter der 4-ten Selektion. Der Phagentiter lag zwischen 10^4 - 10^7 pfu/ml. Den höchsten Titer ergab das Biopanning mit der 12-mer Bank, den niedrigsten mit der zyklischen 7-cys Bank.

Vergleicht man den Phagentiter der Originalbank mit dem der 5-ten Selektion, so ist eine Reduktion um 10^1 - 10^4 zu erkennen. Dies deutet auf eine weitere Selektion und somit eine Anreicherung von SL3-spezifischen Phagen hin.

3.8.1 ELISA zur Bestimmung der Phagenspezifität

Insgesamt wurden 679 Klone aus dem Eluat der 5-ten negativ-kompetitiven Selektion mittels ELISA auf ihre Reaktivität mit der SL3-RNA in der Einfach-Bestimmung und später in der Dreifach-Bestimmung wie in Kap.2.4.6 beschrieben, getestet. Bei der Dreifach-Bestimmung wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung der einzelnen Werte berechnet. Die Auswertung erfolgte wie im Kap.3.7.1 beschrieben.

In den unten aufgeführten Balkendiagrammen werden beispielhaft ELISA-Daten mit einigen Phagen aus der 12-mer, 7-mer und 7-cys Bank, präsentiert.

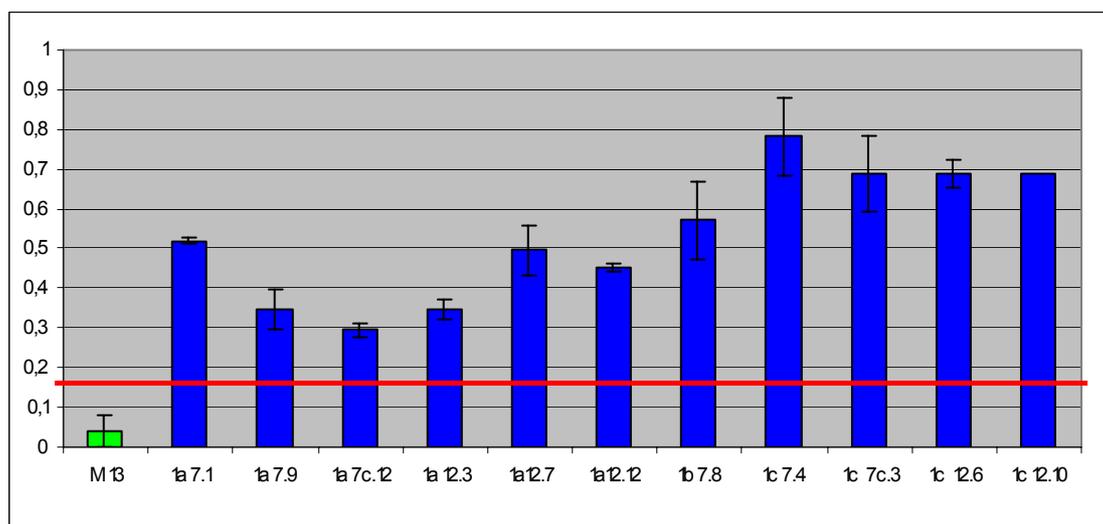


Abbildung 3-10: ELISA zur Bestimmung der Phagenspezifität. Phagen aus dem Eluat der 5-ten Selektion wurden im Triplikate gegen SL3-RNA getestet. Die Abbildung zeigt ausgewählte Phagen. Phagen-Bank 12-mer, 7-mer, 7-cys (grün - Negativkontrolle M13KO7-Phage, blau - Phagenklone, rot - Ausschlußwertlinie).

Die OD der Negativkontrolle lag bei 0,04. Somit ergab sich ein Ausschlußwert von 0,16. Phagenklone, die eine höhere OD als 0,16 aufwiesen, wurden als positiv gewertet. Klone deren OD niedriger war, wurden als nicht reaktiv eingestuft. In dem hier aufgeführten ELISA wurden beispielhaft 11 Klone untersucht, davon wiesen acht (1a7.1; 1a12.7; 1a12.12; 1b7.8; 1c7.4; 1c7c.3; 1c12.6; 1c12.10) einen OD-Wert, der mindestens den 4-fachen Wert des Ausschlußwertes erreichte. Drei Phagenklone (1a7.9; 1a7c.12; 1a12.3) wurden als schwach affin eigeordnet, da deren OD nur den 2-fachen Ausschlußwert erreichte.

Phagenklone, die auf ihre Reaktivität mit der SL3-RNA getestet wurden, wurden zum Nachweis der Spezifität nochmals im ELISA auf unspezifische Bindung gegen SL3mut-RNA untersucht.

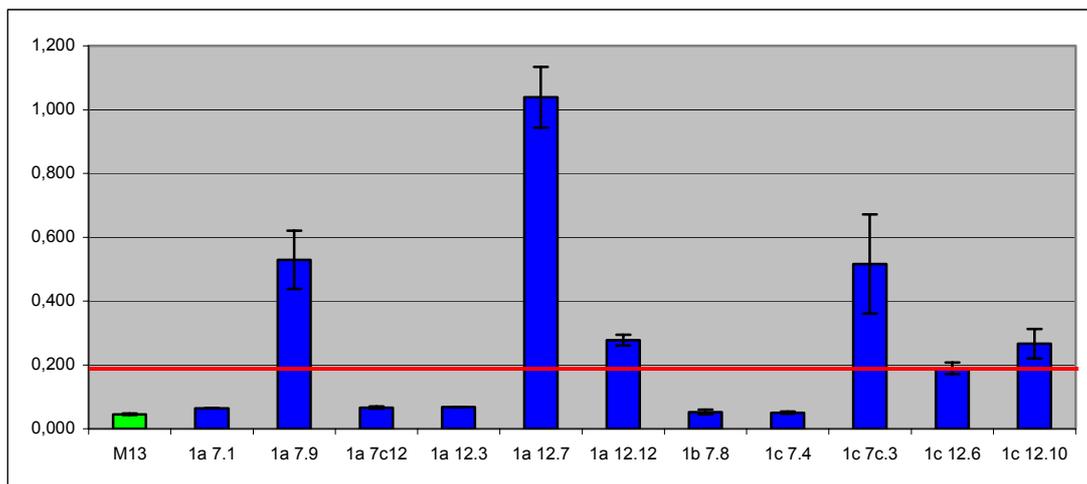


Abbildung 3-11: ELISA zur Bestimmung der Phagenspezifität. Phagen aus dem Eluat der 5-ten Selektion wurden im Triplikate gegen SL3mut-RNA getestet. Die Abbildung zeigt ausgewählte Phagen. Phagen-Bank 12-mer, 7-mer, 7-cys (grün - Negativkontrolle M13KO7-Phage, blau - Phagenklone, rot - Ausschlußwertlinie).

Die OD-Werte der Negativkontrolle lag bei 0,046. Somit ergab sich ein Ausschlußwert von 0,19. Phagenklone, die eine höhere OD als 0,19 aufwiesen, wurden als positiv gewertet. Klone deren OD niedriger war, wurden als nicht reaktiv eingestuft. Von den in diesem ELISA getesteten Phagenklonen wiesen sechs (1a 7.1; 1a7c12; 1a 12.3; 1b 7.8; 1c 7.4; 1c 12.6) einen OD-Wert, der unterhalb des AW lag. Die Klone 1a12.12 und 1c12.10 zeigten eine schwache Bindung an die SL3mut, da deren OD-Werte unwesentlich höher als der Ausschlußwert lagen. Drei Phagenklone (1a 7.9; 1a 12.7; 1c 7c.3) zeigten eine starke Affinität zur SL3mut-RNA mit dem Klon 1a12.7 als dem stärksten Binder.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass drei von den elf hier dargestellten Phagenklonen, Klon 1a 7.9 , 1a 12.7 und 1c 7c.3, sowohl mit der SL3 als auch der SL3mut-RNA reagiert haben. Der Unterschied lag in der Intensität des Signals. So war das Signal der SL3mut-RNA (OD 1,039) mit dem Klon 1a 12.7 doppelt so stark wie mit der SL3-RNA (OD 0,5). Klone 1a7.1, 1a7c.12, 1b 7.8, 1c7.4 und 1c12.6 waren SL3-RNA spezifisch, da sie nicht an die SL3mut-RNA aber an die SL3-RNA gebunden haben. Klone 1a 12.12 und 1c12.10 zeigten eine sehr schwache Affinität zur SL3mut-RNA und eine starke Bindung an die SL3-RNA. Beide Phagen können somit als SL3-spezifisch eingestuft werden.

Die Bestimmung der Spezifität weiterer Klone erfolgte analog. Von 687 getesteter Phagenklone waren 242 in der Einfach-Bestimmung positiv. Davon wurden 35 in der Dreifach-Bestimmung als SL3-spezifisch identifiziert.

3.8.2 Statistische Verteilung positiver Phagenklone

Nach der Auswertung der positiven Phagenklone des Eluats der 5-ten Selektion, wurde eine Statistik erstellt. Diese zeigt einerseits die Anzahl der getesteten Phagenklone pro Bank und Biopanning, sowie die prozentuale Verteilung der positiven und negativen Klone.

Phagen-Bank 7-mer	Summe der Klone	positive Klone	negative Klone
SL3-1A	23	9 (47%)	14 (53%)
SL3-1B	95	1 (1%)	94 (99%)
SL3-1C	95	2 (2%)	93 (98%)
Summe	213 (100%)	12 (5,8%)	201 (94,2%)

Tabelle 3-8: Statistische Verteilung getesteter Phagenklone aus der 7-mer Bank.

Phagen-Bank 12-mer	Summe der Klone	positive Klone	negative Klone
SL3-1A	47	10 (21%)	37 (79%)
SL3-1B	95	3 (3%)	92 (97%)
SL3-1C	95	2 (2%)	93 (98%)
Summe	237 (100%)	15 (6,3%)	222 (93,7%)

Tabelle 3-9: Statistische Verteilung getesteter Phagenklone aus der 12-mer Bank.

Phagen-Bank 7-cys	Summe der Klone	positive Klone	negative Klone
SL3-1A	39	6 (15%)	33 (85%)
SL3-1B	95	0 (100%)	95 (100%)
SL3-1C	95	2 (2%)	93 (98%)
Summe	229 (100%)	8 (3,4%)	221 (96,6%)

Tabelle 3-10: Statistische Verteilung getesteter Phagenklone aus der zyklischen 7-cys Bank.

Insgesamt wurden ca. 700 Klone auf ihre Affinität zur SL3-RNA im ELISA getestet. Davon hatten 35 Phagenklone (5%) mit der SL3 reagiert. 644 (95%) Klone reagierten nicht mit der SL3-RNA. Vergleicht man die Ausbeute an positiven Klonen, so werden Unterschiede in Abhängigkeit von der verwendeten Phagen-Bank deutlich. Das Biopanning mit der 12-mer und der 7-mer Bank führte zu einer Ausbeute von 12-15% positiver Phagen. Wurde die zyklische 7-cys Bank verwendet, so konnten nur 3,4% der Phagen selektiert werden.

3.9 Aminosäuresequenzen der Peptidinserts spezifischer Phagen

Es wurden insgesamt 36 Klone im ELISA als Ψ -RNA spezifisch identifiziert und sequenziert. Davon stammten 17 Klone aus der 7-mer, 16 Klone aus der 12-mer und 3 Klone aus der zyklischen 7-cys Bank.

Die Sequenzen der einzelnen Klone wurden nach dem Biopanning und der Phagenbank in der unten aufgeführten Tabelle zusammengefasst.

Klon	Phagen-Bank	Biopanning	AS-Sequenz
12.3	12-mer	1A	H H S W H W W H Q D R Q
12.9	12-mer	1A	H H S W H W W H Q D R Q
12.11	12-mer	1A	H H S W H W W H Q D R Q
12.18	12-mer	1A	L Q I T T P L L L S P A
12.21	12-mer	1A	R W W S W P S Y T Q S S
12.25	12-mer	1A	W P M T N W F H Y H S W
12.55	12-mer	1A	H F W P W W L Y S G T W
12.59	12-mer	1A	H H T L W T L T P P Q W

Klon	Phagen-Bank	Biopanning	AS-Sequenz
2A 12.10	12-mer	2A	M G N T H M S A L R I P
2A 12.14	12-mer	2A	M G N T H M S A L R I P
2B 12.5	12-mer	2B	L V P P S K G Q P N T G
2C 12.8	12-mer	2C	S Q L R P N A E S L R F
2D 12.1	12-mer	2D	S G S V G M K P S P R P
2D 12.4	12-mer	2D	H T H H T H K T H T A P
2D 12.5	12-mer	2D	S L N L A T L Q P L T G
2D 12.6	12-mer	2D	S T H H R H Y H D T L A
7.1	7-mer	1A	N F G P L M L
7.3	7-mer	1A	S L L C T P G
7.5	7-mer	1A	H W W L F W W
7.11	7-mer	1A	S L L C T P G
7.12	7-mer	1A	S L L C T P G
7.19	7-mer	1A	G E T R A P Q
7.29	7-mer	1A	L V Q H L S A
2A 7.1	7-mer	2A	A T T G N S E
2A 7.2	7-mer	2A	T N D T F V Y
2A 7.7	7-mer	2A	E A H Y P P N
2A 7.9	7-mer	2A	S Q G M S A V
2A 7.15	7-mer	2A	G E N R A P L
2D 7.2	7-mer	2D	R A R S S E P
2D 7.3	7-mer	2D	T A P G V S T
2D 7.7	7-mer	2D	Q K P H S K V
2D 7.8	7-mer	2D	M A I Y P R H
2D 7.9	7-mer	2D	D P A P R P R
7c.47	7-cys	1A	H W P F L H S
2D 7c.8	7-cys	2D	N N D A L G S
2D7c.3	7-cys	2D	K N Q H R Q S

Tabelle 3-11: Aminosäuresequenz der Ψ -RNA spezifischen Phagenklone.

Klone 12.3/9/11 bzw. 2A12.10/14 weisen identische Sequenzen auf.

Insgesamt wurden 35 Klone im ELISA als SL3 spezifisch getestet und sequenziert. Davon stammten 15 Klone aus der 12-mer Bank, 12 Klone aus der 7-mer Bank und 8 aus der zyklischen 7-cys Bank. In der unten aufgeführten Tabelle sind die Sequenzen nach dem Biopanning und der Phagen-Bank zusammengefasst.

Klon	Phagen-Bank	Biopanning	AS-Sequenz
12.1	12-mer	1A	N L L I P E N V P R L H
12.2	12-mer	1A	H A Q S Y T L L A T T T
12.3	12-mer	1A	G H I H S M R H H R P T
12.5	12-mer	1A	G H I H S M R H H R P T
12.6	12-mer	1A	G H I H S M R H H R P T
12.7	12-mer	1A	K H M H W H P P A L N T
12.12	12-mer	1A	L T H K N S H H H R W Q
12.13	12-mer	1A	K H M H W H P P A L N T
12.24	12-mer	1A	T S H W R W H H H S T W
12.29	12-mer	1A	L T H K N S H H H R Q W
1B 12.2	12-mer	1B	H A Q S Y T L L A T T T
1B 12.4	12-mer	1B	A L P K L S T G P S H T
1B 12.9	12-mer	1B	Q P R N F L H E M R L T
1C 12.6	12-mer	1C	P T P K N S H H H R W Q
1C 12.10	12-mer	1C	P T P K N S H H H R W Q
7.1	7-mer	1A	R T R W I K Q
7.3	7-mer	1A	S I L P Y P Y
7.5	7-mer	1A	S H I R R T N
7.7	7-mer	1A	R S R P L R E
7.8	7-mer	1A	T A T T Q L T
7.9	7-mer	1A	D P A P E P R
7.10	7-mer	1A	V M Y P Q W S
7.19	7-mer	1A	A L K P P K Y
7.20	7-mer	1A	T H R L R S R
1B 7.8	7-mer	1B	N P W P L R P
1C 7.4	7-mer	1C	S A R L P S H
1C 7.7	7-mer	1C	L G L P K L P
7c.2	7-cys	1A	N Q S W T V K
7c.4	7-cys	1A	H A L G P Y M
7c.7	7-cys	1A	R T A A A T A
7c.11	7-cys	1A	F K G S A G Y
7c.12	7-cys	1A	L P P L T T T
7c.22	7-cys	1A	H W W H G R H
1C 7c.1	7-cys	1C	N S S G Q W R
1C 7c.3	7-cys	1C	N K T Q L T F

Tabelle 3-12: Aminosäuresequenz der SL3-RNA spezifischen Phagenklone.

Klone 12.3/5/6 bzw. 1C12.6/10 zeichnen sich durch identische Sequenzen aus.

3.10 Statistische Auswertung der Sequenzen

Die Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren in den jeweiligen Klonen wurde für das Ψ- und SL3-Biopanning zusammengefasst. Die 100% beziehen sich auf die totale Aminosäure-Anzahl.

Aminosäure	Aminosäuresequenz in %	Eigenschaften der AS
Alanin (A)	2,9	unpolar
Arginin (R)	6,7	polar +
Aspargin (N)	2,8	polar
Aspartat (D)	1,2	polar -
Cystein (C)	1,2	polar
Glutamin (Q)	4,3	polar
Glutamat (E)	0,5	polar -
Glycin (G)	3,6	unpolar
Histidin (H)	13,4	polar +
Isoleucin (I)	1,7	unpolar
Leucin (L)	8,4	unpolar
Lysin (K)	3,6	polar +
Methionin (M)	2,4	unpolar
Phenylalanin (F)	1,2	unpolar
Prolin (P)	12,5	unpolar
Serin (S)	10,6	polar
Threonin (T)	9	polar
Tryptophan (W)	11,6	unpolar
Tyrosin (Y)	1	polar
Valin (V)	1,2	unpolar
Summe	100	

Tabelle 3-13: Statistik der AS-Sequenz in den selektierten Phagenklonen sowie deren Eigenschaften (rot: Aminosäuren mit der höchsten Frequenz).

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Häufigkeit der Aminosäuren in den selektierten Phagen. Während die Aminosäure Arginin, Histidin, Leucin, Tryptophan, Threonin, Prolin und Serin sehr häufig vertreten waren (zwischen 6,7-13,4%), war der Anteil an Tyrosin, Valin, Glutamat, Aspartat und Cystein sehr gering (zwischen 0,5-1,2%). Der Anteil der unpolaren Aminosäuren lag bei 45,5%, der polaren Aminosäuren bei 54,5%.

3.10.1 Sequenzhomologien der Phagenklone

Von insgesamt 71 sequenzierten Phagenklonen, wiesen 41 (59,15%) Homologien auf. Dabei gab es Phagenklone, die entweder identische Sequenzen oder gleiche bzw. ähnliche Motive besaßen. Auffällig war, dass Übereinstimmungen nicht nur unter Phagen, die Ψ - bzw. SL3-RNA spezifisch waren, sondern auch Ψ - und SL3-Phagen gemeinsam waren. Der Sequenzvergleich erfolgte mit "ClustalW 1.82" Software.

Klon	RNA	Aminosäuresequenz
		L L X T P
7.11	Ψ	S L L C T P G
7.12	Ψ	S L L C T P G
7.3	Ψ	S L L C T P G
12.2	SL3	H A Q S Y T L L A T---T T
12.59	Ψ	H H T L W T L-----T P P Q W
		H X W H W W
7.5	Ψ	H W W L F W W
7c.22	SL3	H W W----H-----G R H
12.13	SL3	K H M H W-----H-----P P A L N T
12.7	SL3	K H M H W-----H-----P P A L N T
12.24	SL3	T S H W-----R W-----H H H S T W
12.55	Ψ	H F W----P W W---L Y S G T W
12.3	Ψ	H H S W----H W W---H Q D R Q
12.9	Ψ	H H S W----H W W---H Q D R Q
12.11	Ψ	H H S W----H W W---H Q D R Q
12.21	Ψ	R W W----S W-----P S Y T Q S S
7c.47	Ψ	H W-----P-----F L H S
12.21	Ψ	R W W----S W-----P S Y T Q S S

Klon	RNA	Aminosäuresequenz
		H H T T T A P
2D 7.3	Ψ	T A P G V S T
2D 12.4	Ψ	H T H H T H K T H T A P
2D 7.9	Ψ	D P --- A P R P R
12.59	Ψ	H H T L W T L T P P Q W
		L P P
2B 12.5	Ψ	L V P P S K G Q P N T G
7c.12	SL3	L --- P P L T T T
1C 7.7	SL3	L G L --- P K L P
		T K N S H R W Q
1C 12.10	SL3	P T P K N S H H H R W Q
12.12	SL3	L T H K N S H H H R Q W
12.29	SL3	L T H K N S H H H R W Q
1C 12.6	SL3	P T P K N S H H H R W Q
1C 7c.1	SL3	N S S G Q W
		P L R P
12.1	SL3	N L L I P A N V -- P R L H
7.7	SL3	R S R P --- L --- R E
1B 7.8	SL3	N P W P --- L --- R P
7.9	SL3	D --- P - A --- P E P R
2D 7.9	Ψ	D --- P - A --- P E P R
2D 12.1	Ψ	S G S V G M K --- P - S --- P --- R P
		P S X
2B 12.5	Ψ	L V P P --- S K G Q P N T G
2D 7.7	Ψ	Q K P - H -- S K V
12.21	Ψ	R W W S W P --- S Y T Q S S
7.19	SL3	A L K P P --- K Y
1C 7.7	SL3	L G L P --- K L P

Klon	RNA	Aminosäuresequenz
		P P R P R
12.1	SL3	N L L I P E N V P R-----L H
2D 7.9	Ψ	D P A P R P R
2D 12.1	Ψ	S G S V G M K P S-----P R P
7.9	SL3	D P A P E P R
1B 7.8	SL3	N P W P L---R P
2A 12.10	Ψ	M G N T H M S A L R I P
2A 12.14	Ψ	M G N T H M S A L R I P
1A12.2	SL3	G H I H S M R H H R P T
1A12.5	SL3	G H I H S M R H H R P T
1A12.6	SL3	G H I H S M R H H R P T

Tabelle 3-14: Sequenzhomologien der identifizierten Phagenklone aus dem Ψ- und SL3-Biopanning. Farblich hervorgehoben sind homologe bzw. identische Sequenzen.

Folgende Phagen wiesen identische Sequenzen auf:

Ψ	7.3/7.11/7.12	SLLCTPG
Ψ	12.3/12.9/12.11	HHSWHWWHQDRQ
Ψ	2A 12.10/12.14	MGNTHMSALRIP
SL3	1C 12.6/ 12.10	PTPKNSHHHRWQ
SL3	1A 12.2/ 12.5/ 12.6	GHIHSMRHRPT

3.11 Homologien zu HIV-1 Proteinen

Die AS-Sequenzen der einzelnen Klone wurden auf Homologien zu HIV-Proteinen untersucht, wobei mindestens drei übereinstimmende Aminosäuren für ein Alignment vorhanden sein mussten. Es handelt sich hierbei um lineare Alignments mit den Proteinen des HXB-2 Isolats. Die Aminosäure-Positionen beziehen sich auf die elektronische Ausgabe des „HIV Sequence Database“ http://.hiv.lanl.gov/cgi-bin/LOCATE_SEQ/multiwheres der *Los Alamos National Laboratory*.

Klon	RNA	Aminosäuresequenz	HIV-1 Protein (Position 1 AS)
1A7.3/7.11/7.12	Ψ	S L L C T P G	gp160(813), RT(139)
1A 7.29	Ψ	L V Q H L S A	p24(190)
2A 7.1	Ψ	A T T G N S E	gp160(12)
2A 7.9	Ψ	S Q G M S A V	IN(147), gp160(862)
2A 7.2	Ψ	T N D T F V Y	RT(362)
2A 7.7	Ψ	E A H Y P P N	Rev(24)
2D 7.3	Ψ	T A P G V S T	p6(8)
2D 7.9	Ψ	D P A P R P R	p7(30)
1A 12.21	Ψ	R W W S W P S Y T Q S S	p1(6)
1A 12.11	Ψ	S T T T T P L L L S P A	p6(21)
1A 12.11	Ψ	S T T T T P L L L S P A	gp160(123)
1A 12.59	Ψ	H H T L W T L T P P Q W	gp160(122)
1A 7.1	SL3	R T R W I K Q	p24(132)
1A 7.7	SL3	W A L D R G A	MA(100)
1A 7.8	SL3	T A T T Q L T	gp160(54)
1A 7.9	SL3	D P A P R P R	p7(30)
1A 7c.11	SL3	F K G S A G Y	RT(153)
1A 7c.11	SL3	F K G S A G Y	RNaseH(113)
1A 7c.12	SL3	L P P L T T T	Rev(50)
1A 7c.12	SL3	L P P L T T T	RT(420)
1C 7c3	SL3	N S S G Q W R	Vif(4)
1C 7c3	SL3	N S S G Q W R	RT(335)
1C 7c3	SL3	N S S G Q W R	gp160(142)
1A 12.1	SL3	N L L I P E N V P R L	RT(50)
1A 12.1	SL3	N L L I P E N V P R L	IN(260)
1A 12.1	SL3	N L L I P E N V P R L	Tat(6)
1A12.29/12.12	SL3	L T H K N S H H H R W Q	Vif(4)
1C12.10/12.6	SL3	P T P K N S H H H R W Q	PR(79), Vif(4)
1C12.10/12.6	SL3	P T P K N S H H H R W Q	gp160(808)

Tabelle 3-15: Sequenzhomologien der Phagenklone mit HIV-1 Proteinen. Die Aminosäure-Position im Protein (HXB2-Isolat) bezieht sich auf die Angaben aus http://.hiv.lanl.gov/cgi-bin/LOCATE_SEQ/multiwheres (blau - Aminosäuren der Phagenklone, die eine Homologie aufweisen).

Sowohl Ψ - als auch SL3- spezifische Phagenklone wiesen Homologien mit HIV-Proteinen auf. Es konnten 21 Übereinstimmungen mit dem Gag-Pol-Vorläuferprotein bzw. dessen Spaltprodukten identifiziert werden. Zehn Klone wiesen Homologien zu dem gp160-Protein auf. Weitere Homologien gab es zu Rev, Vif und dem Tat des HIV-1. Phage 2D7.9 und 1A7.9 zeigten eine Homologie zum NCp7-Protein.

3.12 Aminosäuremotive spezifischer Phagenklone

Zur Herleitung der Aminosäuremotive wurden die Sequenzen der Phagenklone miteinander verglichen. Ein Motiv bestand aus festen und variablen Positionen. Die festen Positionen waren in mehreren Sequenzen gehäuft vertreten, die variablen X-Positionen repräsentierten Aminosäuren, die unterschiedlich waren.

Durch den Sequenzvergleich konnten 9 Aminosäuremotive, die eine Größe zwischen 3 und 12 Aminosäuren besaßen, abgeleitet werden. Weiterhin wurden auch Motive identifiziert, die eine Homologie zu nativen HIV-Proteinen besitzen.

RNA	Aminosäuremotiv	Anmerkung
Ψ /SL3	H X W P W W (12)	X = S,F,P,L,W,H
Ψ /SL3	P S X (5)	X = K,S,Y,L
Ψ /SL3	LLX LTP (5)	X = C,A
Ψ /SL3	LPP (3)	
SL3	TKNSH (5)	
Ψ /SL3	PPRPR (5)	
Ψ	HHTT (2)	
Ψ /SL3	D P A P R P R (2)	p7
SL3	R W Q (5)	Vif/RT
SL3	V L R P (1)	Tat
Ψ	T T P P (1)	p6
Ψ	T A P (4)	p6
SL3	L P P L (1)	Rev

Tabelle 3-16: Zusammenstellung der abgeleiteten Aminosäuremotive. In Klammer ist die Häufigkeit der Motive in den Inserts angegeben (X -variable Position).

Bei den abgeleiteten Motiven war der hohe Anteil an unpolaren Aminosäuren wie Prolin und Tryptophan (aromatisch) auffällig.

3.13 Kreuzreaktionen identifizierter Phagen mit Ψ /SL1/SL2 und SL3-RNA

Phagenklone, die das tryptophanreiche HXWPWW-Motiv (1A12.55/ 12.3/ 7.3; Tabelle 3-11) enthielten, wurden auf Kreuzreaktivität mit der Ψ -RNA, den Stammschleifen SL1-3 sowie den Kontroll-Fragmenten SL1-3mut und CCR5 getestet. Bei den Phagenklonen handelte es sich um Ψ -Phagen. Jeder Phage wurde im Triplikat getestet. Aus den erhaltenen OD-Werten wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet. Zur Bestimmung des Ausschlußwertes wurden die einzelnen RNA-Fragmente (Ψ / SL1-3/ CCR5/ SL1-3mut) mit dem WT-Phagen inkubiert und die Absorption bei 492nm bestimmt. Aus den erhaltenen OD-Werten wurde der Mittelwert gebildet, dessen dreifacher Wert bildete den Ausschlußwert. Als positive Phagenklone wurden solche gewertet, deren OD höher als der Ausschlußwert war. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in einem Balkendiagramm aufgetragen.

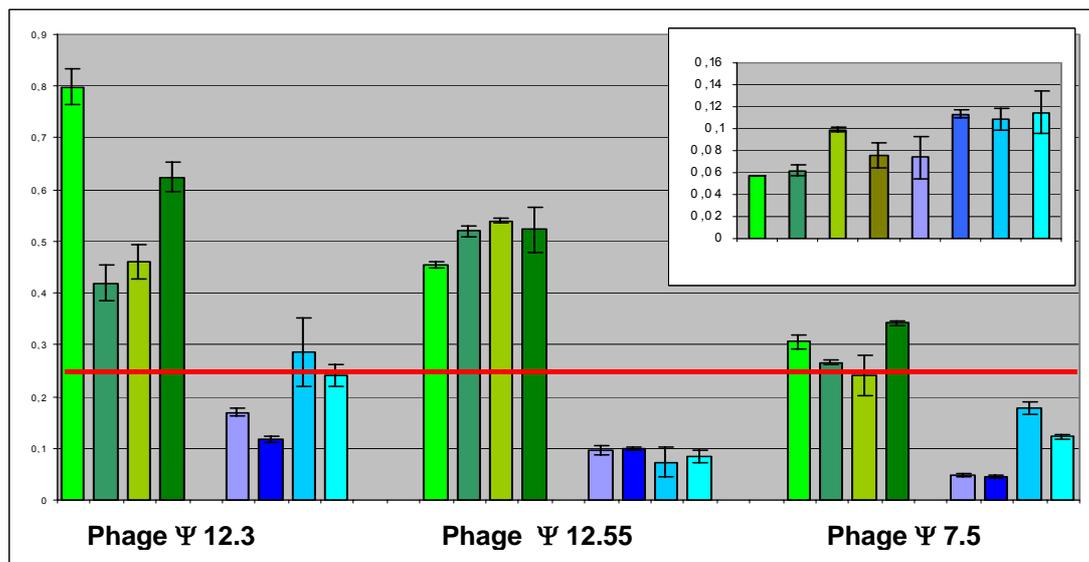


Abbildung 3-12: Kreuz-ELISA Ψ -spezifischer Phagen gegen Ψ /SL1/SL2/SL3-RNA und CCR5/SL1mut/SL2mut/SL3mut. In der kleinen Abbildung ist die Reaktivität des WT-Phagen mit den RNA-Fragmenten dargestellt, die für die Berechnung des Ausschlußwertes benötigt wurden (grün Ψ / SL1/ SL2/ SL3 in blau CCR5/ SL1mut/ SL2mut/ SL3mut, rot - Ausschlußwertlinie).

Wurden die RNA-Fragmente mit dem WT-Phagen inkubiert, so lag die OD zwischen 0,057 und 0,115. Der errechnete Mittelwert lag somit bei 0,088 und der Ausschlußwert somit bei 0,26. Klone, die eine höhere OD als 0,26 aufwiesen, wurden als positiv gewertet. Klone deren OD niedriger waren, galten als nicht reaktiv.

Phagen 12.3 und 12.55 haben sowohl an die Ψ -RNA, mit der sie selektiert wurden, als auch die Stammschleifen SL1-3 gebunden, wobei Unterschiede in der Intensität der Signale auftraten. So führte die Inkubation des Phagen 12.3 mit der Ψ -RNA zu einem OD-Wert von 0,799 (dreifacher Wert des Ausschlußwertes) und mit der Stammschleife SL3 zu einer OD 0,63 (2,5-facher Wert des Ausschlußwertes). Wurde der Phage mit SL1- bzw. SL2-Fragmenten inkubiert, so konnte eine OD von 0,42 bzw. 0,46 gemessen werden. Die Inkubation des Phagen 12.55 mit den RNA-Fragmenten (Ψ /SL1-SL3) lieferte ähnliche OD-Werte zwischen 0,4 - 0,5 unabhängig von der eingesetzten RNA. Phage 7.5 zeigte nur eine sehr geringe Affinität zu den RNA-Fragmenten SL1-3, Ψ und keine zu SL1-2.

Bei der Untersuchung der Interaktionen zwischen den Phagen und den Kontroll-RNA's, zeigte sich, dass Phage 12.3 nicht nur an die Ψ - und SL3-Fragmente, sondern auch an die SL2mut-RNA mit einer OD von 0,28 und an die SL3mut mit einer OD von 0,26 gebunden hat. Beide Werte waren nur unwesentlich höher als der Ausschlußwert (0,26) bzw. fielen unter den Ausschlußwert und konnten somit als unspezifisch eingeordnet werden. Die Absorption der übrigen Phagen blieb unterhalb des Ausschlußwertes, d.h sie haben nicht an die Kontroll-RNA-Fragmente gebunden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ausgewählten Phagen sowohl mit der Ψ -RNA, gegen die sie selektiert wurden, als auch mit den Stammschleifen SL1-3 reagierten. Die Bindung an die Stammschleifen war jedoch geringer als zur Ψ -RNA, was an der Intensität des Signal erkennbar deutlich wurde. Die Phagen haben nicht an die Kontroll-RNA-Fragmente gebunden, mit einer Ausnahme von Klon 12.3. Dieser entwickelt eine schwache Affinität zur SL2mut und SL3-mut, die jedoch vernachlässigbar ist.

3.14 Peptid-ELISA

Nachdem RNA-bindende Motive identifiziert werden konnten (Tabelle 3-16), wurden diese in Form von Myc-markierten Peptiden bei Prof. Schwalbe im Institut für Organische Chemie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main synthetisiert und auf ihre Affinität zur Ψ -RNA untersucht. Das Myc-Peptid diente dabei dem Nachweis des gebundenen Peptids über einen anti-Myc-Antikörper. Die Analyse der Affinität wurde auf die Ψ -RNA/Myc-Peptid Interaktion beschränkt, da das SL3-Fragment aufgrund der Länge von 20nt

nicht untersucht werden konnte. Die Konzentration der einzusetzenden Peptide wurde in Vorversuchen ermittelt. Dabei wurde eine Konzentrationsreihe (0ng-1 μ g) (0-10 μ M) des Myc-HWWPWW-Peptids angefertigt und ein Peptid-ELISA (Kap.2.4.8) durchgeführt. Für die weiteren Arbeiten wurde die Peptidmenge verwendet, die im ELISA ein deutliches Signal zeigte. Für das Erzielen eines deutlichen Signals waren 500ng (5 μ M) Peptid notwendig.

Zur Differenzierung der spezifischen von den unspezifischen Interaktionen zwischen Ligand und RNA wurde im ELISA ein irrelevantes Myc-GSGSGS-Kontrollpeptid (Negativkontrolle) eingesetzt. Die Reaktionsstärke (OD) des Kontrollpeptids gab einen Anhaltspunkt für die Ermittlung des Ausschlußwertes, der bei dem 2-fachen Wert der Negativkontrolle festgelegt wurde. Als reaktiv wurden Peptide gewertet, deren OD höher als der Ausschlußwert war. Weiterhin wurden die Myc-Peptide auf Wechselwirkungen mit der CCR5-Kontroll-RNA getestet.

Im ELISA wurden folgende Peptide untersucht:

Lfd.Nr.	AS-Sequenz
1	Myc - GSGSGS
2	Myc - HPWPWW
3	Myc - HLWPWW
4	Myc - HSWPWW
5	Myc - HWWPWW
6	Myc - HHWPWW
7	Myc - TTPP
8	Myc - TAP
9	Myc - VLRP
10	Myc - LPPL
10	Myc - DPAPRPR

Tabelle 3-17: Synthetisierte Peptide. N-gekoppelte myc-Sequenz (Myc-EQKLISEEPL).

Die Affinität der Peptide zur Ψ -RNA wurde in einer Dreifach-Bestimmung untersucht. Anschließend wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet. Zur Auswertung wurde die gemessene OD bei 492nm in einem Balkendiagramm aufgetragen.

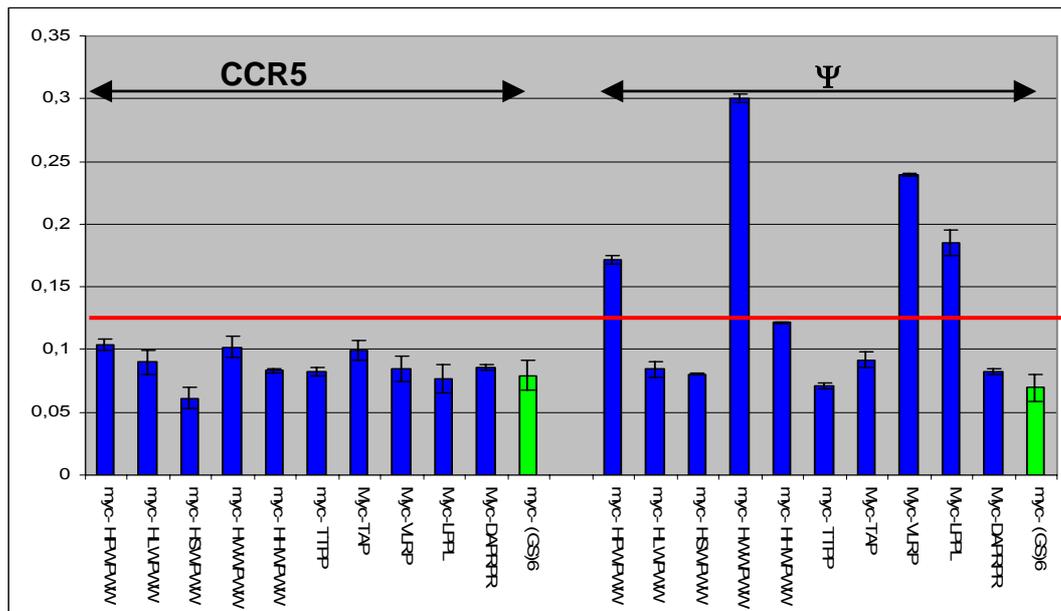


Abbildung 3-13: Peptid-ELISA zur Analyse der Spezifität der synthetisierten Peptide zur Ψ -RNA (blau - CCR5-/ Ψ -RNA mit Peptiden, grün - Kontrollpeptid Myc-GSGSGS).

Die OD der Negativkontrolle lag bei 0,065. Somit ergab sich ein Ausschlußwert von 0,13. Peptide, die eine höhere OD erreichten, wurden als affin gewertet.

Wurden die Peptide auf die Affinität zu der CCR5-Kontroll-RNA getestet, so lagen die OD-Werte zwischen 0,06 - 1,1 und somit unterhalb des Ausschlußwertes. Bei der Untersuchung der Affinität zu der Ψ -RNA wurden Unterschiede in der Reaktionsstärke der einzelnen Peptide deutlich. Als Ψ -bindend wurden Peptide HWWPWW, HPWPWW, VLRP und LLPP mit HWWPWW als dem stärksten Liganden mit einer OD von 0,3 identifiziert. Die Absorption der übrigen Peptide lag zwischen 0,075 - 1,2 und somit unter dem Ausschlußwert. Sie zeigten keine Bindung zur Ψ -RNA.

Aus neun getesteten Peptiden wurden vier (HWWPWW, VLRP, HPWPWW, LLPP) als hochaffin und sechs (HHWPWW, HLWPWW, TAP, TTTP, HSWPWW) als nicht bindend identifiziert. Das am stärksten bindende HWWPWW-Peptid wurde anschließend im Kompetitions-ELISA getestet.

3.15 Kompetitions-ELISA

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Verpackung der viralen RNA ein hochspezifischer Prozess ist, der auf der Erkennung der Ψ -Region durch die NCp7-Domäne des p55^{Gag}-Proteins beruht²³. Da das p55^{Gag}-

Vorläuferprotein erst zum späteren Zeitpunkt durch virale Proteasen gespalten wird, kann davon ausgegangen werden, dass das gesamte p55^{Gag}-Protein für die Bindung verantwortlich ist^{7,8,10,23,28}.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Myc-HWWPWW-Peptid unter den untersuchten Peptiden am stärksten an Ψ -RNA gebunden hat, war es interessant zu prüfen, ob die nativen Liganden p55^{Gag} und NCp7 die Bindung des Peptids kompetitieren können. Der Nachweis erfolgte durch einen Peptid-Kompetitions-ELISA (Kap.2.4.9). Zum Nachweis der Spezifität der Konkurrenz wurde das virale RNA-bindende Tat-Protein verwendet.

Eine weitere Frage war die für die Verdrängung des Peptids nötige Proteinmenge. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe zwischen 50ng - 1 μ g des Proteins (p55^{Gag} (8,8nM-176nM) bzw. NCp7 (72nM-1,44 μ M)) sowie einer konstanten Peptidkonzentration (500ng/5 μ M HWWPWW, Kap.3.14) angefertigt. Ein Ansatz ohne Peptid und ohne Protein bzw. mit 1 μ g/176nM p55^{Gag} Protein jedoch ohne Peptid diente der Bestimmung des Ausschlußwertes. Der Ausschlußwert betrug den 4-fachen Wert der beiden Kontrollen. Der Nachweis der Bindung des Peptids an die Ψ -RNA erfolgte durch den murinen anti-Myc-Antikörper (Kap.2.1.11). Eine Verdrängung des Peptids durch das native Protein äußerte sich in der Abnahme der OD im Vergleich zur Kontrolle. Jede Probe wurde im Triplikat getestet. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt und in einem Balkendiagramm aufgetragen.

3.15.1 Konkurrenz-ELISA mit Ψ -RNA und p55^{Gag}/NCp7

Im Reaktionsansatz wurde die Fähigkeit des p55^{Gag}- und NCp7-Proteins, das Myc-HWWPWW-Peptid zu verdrängen, getestet.

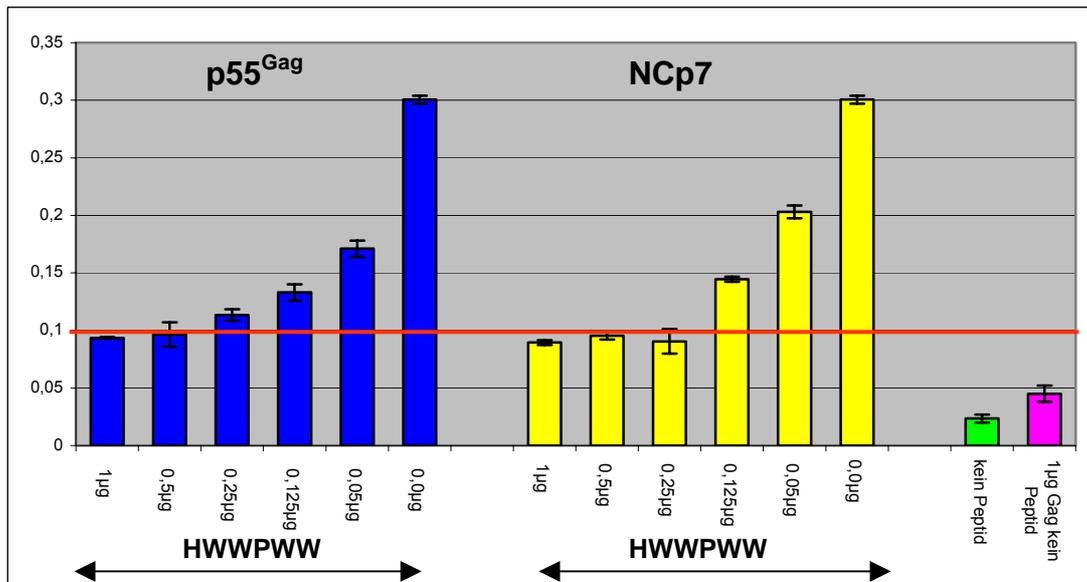


Abbildung 3-14: Kompetitions-ELISA mit Ψ -RNA, p55^{Gag} bzw. NCp7 und den myc-HWWPWW-Peptiden (blau - Myc-HWWPWW-Peptid+ p55^{Gag}; gelb - Myc-HWWPWW-Peptid + NCp7; grün - kein Peptid, kein p55^{Gag}; pink - kein Peptid, 1µg p55^{Gag}).

Die Absorption der Negativkontrolle lag bei OD - 0,025 und der Ausschlußwert somit bei OD - 0,1. Um Aussagen über die Konkurrenz der Peptidbindung treffen zu können, wurde zunächst die Absorption des Ansatzes ohne Protein jedoch mit dem HWWPWW-Peptid gemessen. Die gemessene OD lag bei 0,3.

Der OD-Wert der Referenzprobe (mit Peptid aber ohne p55^{Gag}) lag bei 0,3. Bereits die Zugabe von 50ng (8,8nM) des p55^{Gag}-Proteins führte zu einer Halbierung der Absorption auf 0,166. Eine weitere Erhöhung der Proteinmenge auf 0,25µg (44nM) hatte eine stetige Abnahme der Absorption bis auf den Ausschlußwert zur Folge. Eoner weitere Steigerung der Proteinkonzentration auf 0,500µg (88nM) ließ die OD unterhalb des Ausschlußwertes fallen. Weitere Konzentrationssteigerungen hatten keinen Einfluß auf die Absorption.

Der OD-Wert der Referenzprobe (mit Peptid aber ohne NCp7) lag bei 0,29. Wurde das Myc-HWWPWW-Peptid mit dem Zinkfingerprotein NCp7 kompetitiert, so führte eine Zugabe von 50ng (72nM) des nativen Liganden zu einer Reduktion des OD-Wertes bis auf 0,2. Eine Halbierung der Absorption wurde bereits mit 125ng (180nM) NCp7 erreicht und weitere Konzentrationserhöhungen auf 0,25µg (369nM) führten zur weiteren Absorptionsabnahme bis unter den Ausschlußwert. Die Absorption stagnierte bei erneuter Konzentrationserhöhung.

Die Ergebnisse des Experiments deuten auf eine Verdrängung des Myc-HWWPWW-Peptids durch die nativen Liganden p55^{Gag} und NCp7 hin. Wurde die Peptidbindung mit p55^{Gag}-Protein kompetitiert, so führten 50ng (8,8nM) des Protein bereits zur Halbierung der Absorption. Im Falle des NCp7-Proteins waren 125ng (180nM) des Proteins nötig.

3.15.2 Konkurrenz-ELISA mit Ψ -RNA und Tat

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Bindung des Peptids durch das native p55^{Gag}- sowie NCp7-Protein kompetitiert werden konnte, war interessant zu erfahren, ob das Peptid ebenfalls durch ein beliebiges, virales, RNA-bindendes Protein verdrängt werden kann. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Peptid-Konkurrenz-ELISA (Kap.2.4.9) mit dem HIV-1 Tat-Protein durchgeführt. Zum Vergleich wurde die Konkurrenz mit dem p55^{Gag}-Protein herangezogen.

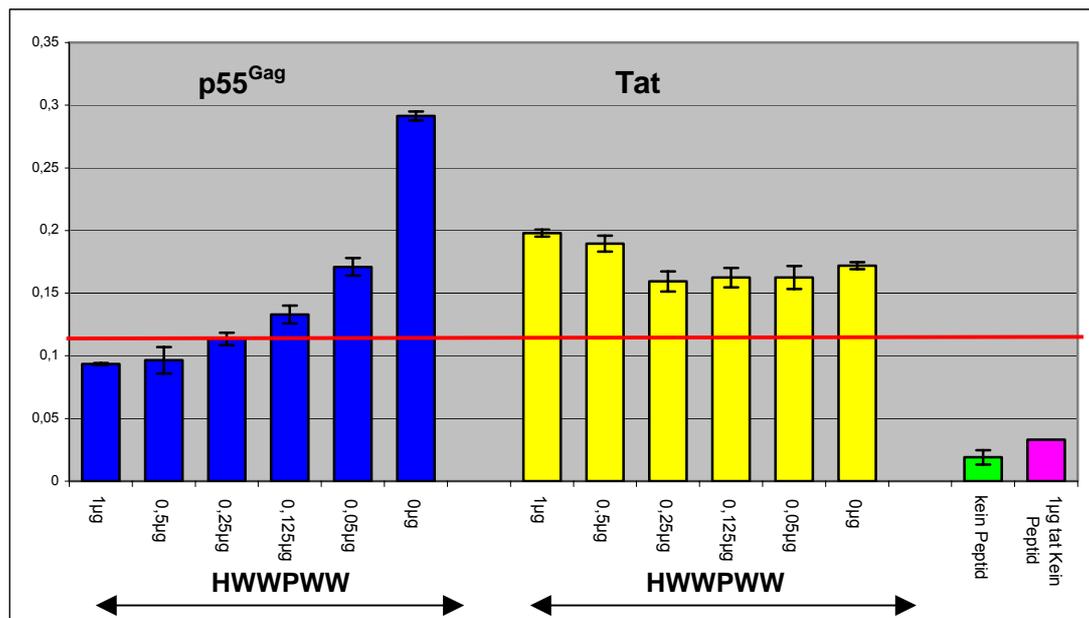


Abbildung 3-15: Konkurrenz-ELISA mit Ψ -RNA, Tat und den Peptiden Myc-HWWPWW (blau - Myc-HWWPWW-Peptid + p55^{Gag}; gelb - Myc-HWWPWW-Peptid + Tat; grün - kein Peptid, kein Tat; pink - kein Peptid, 1µg Tat).

Der berechnete Ausschlußwert lag bei 0,12 (die OD der Negativkontrolle lag bei 0,03). Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde (Kap.3.15.1), ist das native p55^{Gag}-Protein bei einer Konzentration von 50ng (88,8nM) in der Lage das Myc-HWWPWW-Peptid zu verdrängen und die Absorption zu halbieren.

Es wurde insgesamt eine geringere Absorption im Vergleich mit dem p55^{Gag} – Ansatz gemessen, die aber bei 0,16 unabhängig von der eingesetzten Proteinmenge stagnierte. Das bedeutete, dass die detektierte Peptidmenge konstant war. Die Erhöhung der Tat-Konzentrationen von 0,5µg (400nM) auf 1µg (800nM) führten sogar zur minimalen Erhöhung der OD-Werte von 0,16 auf 0,2, die aber auf Pipetierungenauigkeit zurückzuführen war.

Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Bindung mit dem nativen Protein p55^{Gag} und NCp7, jedoch nicht mit dem RNA-bindendem Tat-Protein, kompetitiert werden kann.

3.16 Bestimmung der Spezifität der selektierten Phagen mittels EMSA

Zur Bestätigung der ELISA-Daten des Ψ-Biopannings wurde eine weitere Methode, die Gelretentionsanalyse (Kap.2.4.10) herangezogen. Dabei macht man sich die Abhängigkeit der Laufgeschwindigkeit von der Größe der Probe zu Nutze. Die Methode basiert auf der Beeinflussung der Laufgeschwindigkeit durch die Ausbildung eines Komplexes zwischen zwei Molekülen. Wird ein Komplex gebildet, so verlangsamt sich die Retention im Vergleich zum Kontrollansatz. Für diese Methode war eine Fragmentlänge von mindestens 50nt nötig, so dass nur das Ψ-Fragment eingesetzt werden konnte.

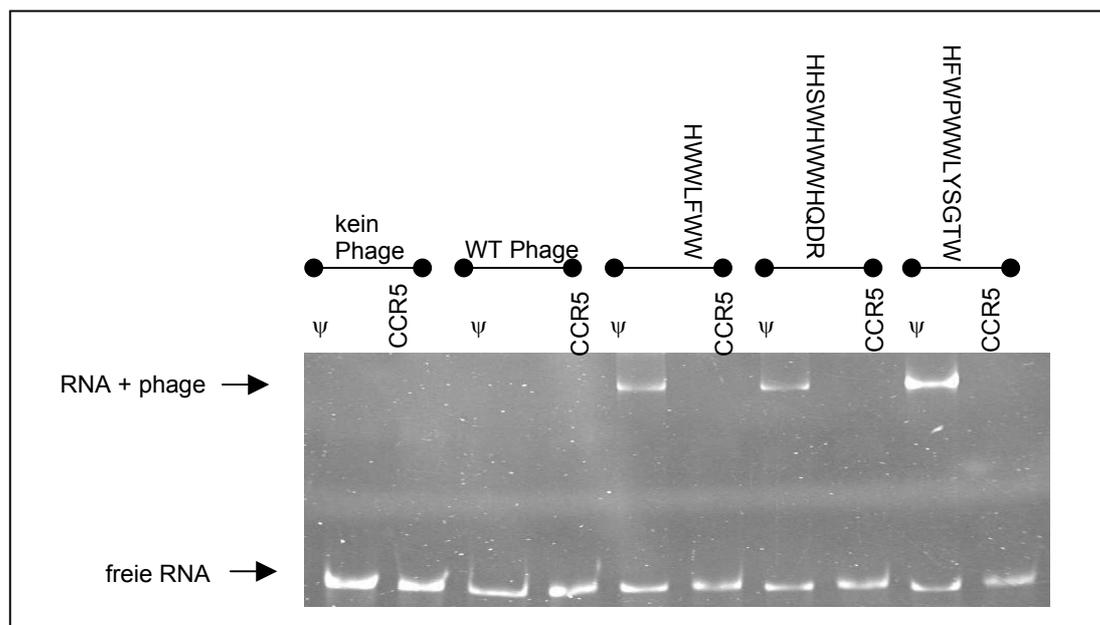


Abbildung 3-16: EMSA mit Ψ-RNA spezifischen Phagen im 5%, nativen PAA-Gel. Inkubation der Ψ-RNA mit den selektierten Phagen resultierte in einer verlangsamteten Retention im Gel. Die Inkubation der CCR5-Kontroll-RNA mit den Phagen hatte keine Auswirkungen auf die Laufgeschwindigkeit.

Das Gel zeigt die Retention ausgewählter, Ψ -spezifischer Phagen. Als Referenzwerte für die Laufgeschwindigkeit wurden Ψ - und CCR5-Kontroll-RNA-Fragmente ohne Phagen auf das Gel aufgetragen. Um unspezifische Interaktionen zwischen Phagen und RNA auszuschließen, wurden die Phagen mit der CCR5-Kontroll-RNA sowie der tRNA als unspezifischen Kompetitor inkubiert.

Die Bildung eines RNA-Phagen-Komplexes äußerte sich in einer Reduktion der Laufgeschwindigkeit. Wurden keine Komplexe gebildet, so liefen die Proben auf der Höhe der Referenzwerte. Wurden die Proben auf das Gel aufgetragen, so zeigten sich deutliche Unterschiede in der Laufgeschwindigkeit. Zwar konnte man die Bindung des Phagen an die Ψ -RNA nachweisen, eine quantitative Analyse der Bindungsstärke war jedoch kaum möglich. Wurde die CCR5-Kontroll-RNA mit den Phagen inkubiert, so glich die Retention dem Referenzansatz. Die Inkubation Ψ -spezifischer Phagen mit der Ψ -RNA resultierte in einer verlangsamten Gelretention, was auf die Ausbildung eines RNA-Phagen-Komplexes hindeutete. Dass die Phagen (7.5 HWWLFWW/ 12.3 HSWHWWHQDRQ/ 12.55 HFWPWWLYSGTW) an die Ψ -RNA, jedoch nicht an die CCR5-RNA binden, konnte schon im Phagen-ELISA (Abbildung 3-8) gezeigt werden. Allerdings fielen im ELISA Unterschiede in der Signalstärke auf, die hier nicht so deutlich wiederzufinden waren. Im ELISA hat der 12.3 Phage am stärksten an die Ψ -RNA gebunden, die schwächste Bindung konnte beim 12.55 Phagen detektiert werden. Ein etwas stärkeres Signal im EMSA, das sich in der Bandenstärke äußerte, war lediglich bei dem 12.55 Phagen erkennbar. Ob man aber auf die Affinität zur RNA schliessen kann, ist fraglich.

3.17 Ala-Scan und CD-Spektroskopie

In Zusammenarbeit mit Prof. Schwalbe aus dem Institut für Organische Chemie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main wurde die Affinität der identifizierten Peptide (Tabelle 3-17) zur Ψ - sowie SL3-RNA in CD-spektroskopischen Analysen bestimmt. Dabei zeigte das HWWPWW-Peptid eine Affinität von $25 \pm 2 \mu\text{M}$ zur Ψ -RNA und $34 \pm 2 \mu\text{M}$ zur SL3-RNA. Da die Affinität der übrigen Peptide deutlich niedriger war, wurden diese in funktionellen Assays nicht berücksichtigt.

Zur weiteren Charakterisierung des HWWPWW-Peptids wurde ein Ala-Scan durchgeführt. Dabei wurden die einzelnen Aminosäuren des Peptids gegen

Alanine ausgetauscht und die Affinität der neu entstandenen Peptide zur Ψ -RNA durch CD-Spektroskopie untersucht.

Folgende Peptide wurden CD-spektroskopisch analysiert:

Lfd.Nr.	Peptid
1	HWWPWW
2	AWWPWW
3	HAWPWW
4	HWAPWW
5	HWWAWW
6	HWWPAW
7	HWWPWA

Tabelle 3-18: Ala-Mutation des HWWPWW-Peptids für die CD-Spektroskopie.

Es stellte sich heraus, dass die Aminosäuren H1, W3 und W5 essentiell für die Bindung an die Ψ -RNA waren, da deren Austausch die Affinität beeinträchtigte. Im Gegensatz dazu führte der Austausch der Aminosäure W2 und P4 zur einer verbesserten Bindung an die Ψ -RNA. Somit konnten zwei weitere Peptide, nämlich das HAWPWW und HWWAWW, als Ψ -Liganden charakterisiert werden, wobei das HWWAWW-Peptid die höchste Affinität unter den untersuchten Peptiden besaß (nicht publiziert, AG Schwalbe, Institut für Organische Chemie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main).

Im ersten Teil des Projektes konnten aus drei Phagen-Banken Phagen selektioniert werden, die spezifisch an die Ψ -RNA gebunden haben. Die Spezifität wurde mittels ELISA (Kap.3.7.1, Kap.3.8.1) und EMSA (Kap.3.15.2) bestätigt. Weiterhin konnten aus den Phagensequenzen tryptophanreiche Peptide (Tabelle 3-17) abgeleitet werden, die im Peptid-ELISA (Kap.2.4.8) auf ihre Bindung an die Ψ -RNA getestet wurden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Bindung durch die nativen Liganden p55^{Gag} und NCp7, jedoch nicht durch das Tat-Protein, kompetitierbar waren (Kap.3.15). Nun stellt sich die Frage nach der *in vivo* Funktionalität der Peptide hinsichtlich der inhibitorischen Eigenschaften auf die Verpackung der HIV-1 RNA, die im zweiten Teil geklärt werden sollte. Im Rahmen der funktionellen Assays wurden folgende Peptide untersucht: HWWPWW, HAWPWW, HWWAWW.

3.18 Design eines funktionellen Assays zur Testung der inhibitorischen Eigenschaften der Ψ -RNA Liganden

Im Rahmen der funktionellen Analyse wurde der inhibitorische Einfluss der identifizierten Peptide auf die Verpackung der viralen RNA untersucht. Als besonders effektiv und geeignet stellte sich das lentivirale 3-Vektoren-System (Kap.2.5.3) heraus, das in Zusammenarbeit mit AG Grez erarbeitet wurde. Das System basiert auf der Produktion von Pseudoviren, die aus dem VSV-G-Hüllprotein, den Gag-Pol-Produkten und dem verpackbaren Ψ -Yfp-Konstrukt bestehen.

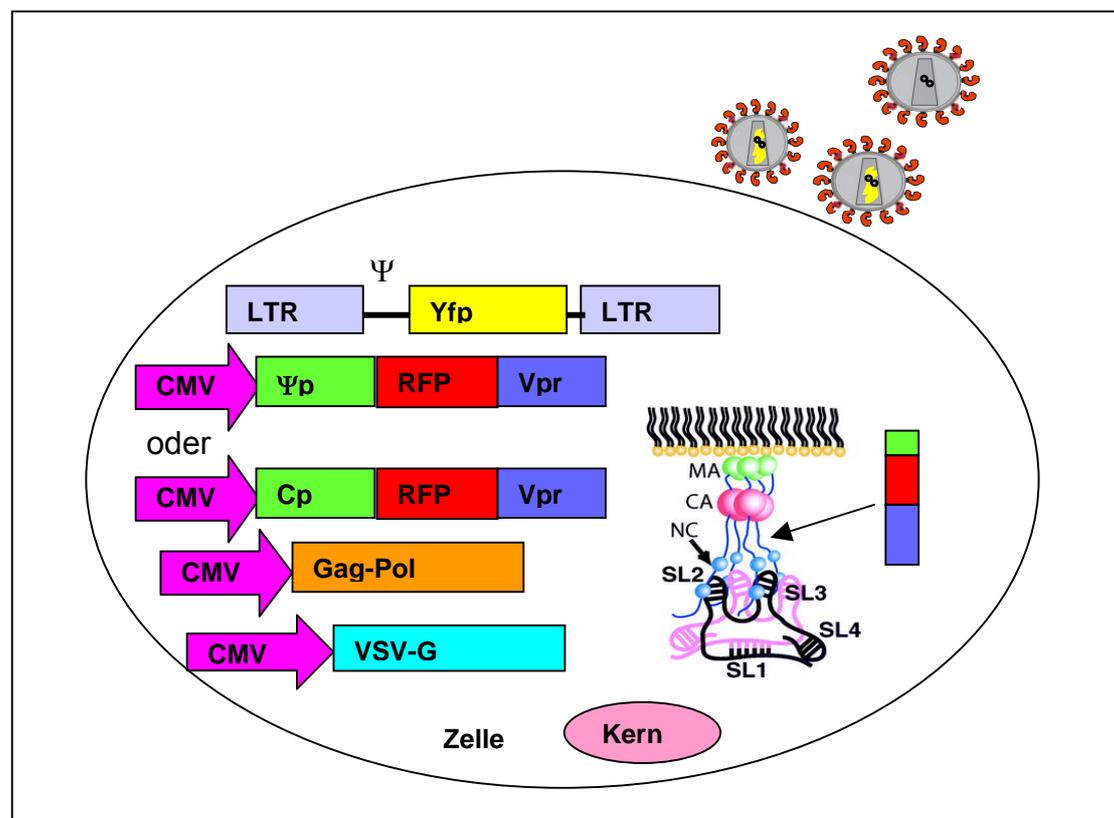


Abbildung 3-17: Versuchsaufbau zur funktionellen Analyse Ψ -RNA bindender Peptide Ψ_p (Cp - GSGSGS-Kontrollpeptid, Ψ_p - HWWPWW/ HAWPWW/ HWWAWW).

Bei der Auswahl eines geeigneten Systems für die Durchführung der funktionellen Assays wurden mehrere Punkte berücksichtigt:

- *in vivo* Stabilität des Peptids
- Auswahl eines geeigneten Vektors für die Expression des Peptids
- Lokalisation und Wirkort des Peptids im gleichen Zellkompartiment
- einfacher Nachweis der Peptidexpression und- lokalisation

In Vorexperimenten wurde in Kooperation mit der AG Stauber (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/M.) gezeigt, dass das biotinylierte HWWPWW-Peptid nach der Mikroinjektion in 293T-Zellen aufgrund der kleinen Größe innerhalb von 15 Minuten degradierte und nicht mehr detektierbar war (Daten nicht publiziert). Somit musste für die Analyse ein System eingesetzt werden, das einerseits eine hohe Expression und Stabilität des Peptids garantiert und andererseits eine einfache Lokalisierung ermöglicht. Das Problem der Instabilität konnte durch die Expression des Peptides als Fusionsprotein gelöst werden. Dazu wurden die Peptide (HWWPWW/ HAWPWW/ HWWAWW) in den pF25-Rfp-Vpr-Vektor (Abbildung 2-4) kloniert und als Fusionsprotein mit dem HIV-1 Vpr-Protein, das C-terminal an das Rfp (red fluorescence protein) gekoppelt ist, exprimiert. Als Kontrolle für die weiteren Versuche wurde ein irrelevantes GSGSGS-Peptid ebenfalls in den pF25-Rfp-Vpr-Vektor kloniert. Die Fusion des Peptids an das Rfp-Vpr-Protein im pF25Rfp-Vpr-Plasmid hat mehrere Vorteile: den einfachen Nachweis der Expression und Lokalisation mittels der CLSM (konfokale Laserraster Mikroskopie), die Stabilität des Peptides aufgrund der Größe des Fusionproteins und die Möglichkeit der Translokation zwischen Kern und Zytoplasma, die durch die „Shuttle“-Eigenschaften des Vpr-Proteins gegeben sind¹⁰⁶. Die erhaltenen Konstrukte wurden in Kap.2.1.6.1 zusammengefasst. Ein weiteres Problem stellte die Affinität des Peptids zur Ψ -RNA dar. Die Affinität des nativen Ψ -Liganden, des HIV-1 NCp7-Proteins, zur Ψ -RNA liegt im nanomolaren Bereich (50nM)⁷¹, die Affinität des zu untersuchenden Peptids jedoch im mikromolaren Bereich (Kap.3.17) und war somit um zwei Logstufen niedriger. Für die Gestaltung eines erfolgreichen Assays zum Nachweis des inhibitorischen Einflusses auf die Verpackung der virale RNA, war somit eine möglichst niedrige RNA- und Gag-Pol-Konzentration sowie eine hohe Peptid Konzentration in den Zellen notwendig. Dies wurde durch den Einsatz der HR⁺YFP-Zelllinie (Kap.2.1.13), bei der die Ψ -RNA stabil ins Zellgenom integriert ist, möglich. Für die Produktion von Pseudoviren wurde die HR⁺YFP-Zelllinie mit den Verpackungskonstrukten pCMV Δ R8.91 (Gag-Pol, Abbildung 2-5) und dem pMDG.2 (VSV-G, Abbildung 2-6) sowie dem pF25-Peptid-Rfp-Vpr nach Protokoll im Kap.2.5.4 transient transfiziert. Zur Kontrolle der spezifischen Inhibition wurde das irrelevante GSGSGS- sowie das Rfp-Vpr-Konstrukt eingesetzt. Beide Kontrollproteine sollten nicht an die Ψ -RNA binden und somit keinen Einfluß auf die RNA-Verpackung haben. Nach 48h wurde die Pseudoviruskonzentration in den Kulturüberständen mit Hilfe eines p24 ELISA's (Kap.2.5.5) gemessen. Die generierten Pseudoviren wurden

anschließend auf den Ψ -RNA Gehalt untersucht. Hierfür wurde zunächst aus den Pseudoviren die virale RNA präpariert (Kap.2.5.7), die anschließend für die Quantifizierung in die Real-time-PCR eingesetzt wurde (Kap.2.6). Eine hemmende Wirkung auf die Verpackung der RNA würde dadurch messbar sein, dass die in Anwesenheit der HWWPWW/ HAWPWW/ HWWAWW-Rfp-Vpr-Proteine produzierten Pseudoviren weniger von dem verpackbaren Ψ -Yfp-Konstrukt enthalten als die gleiche Menge der Kontrollviren (Abbildung 3-17), die in Anwesenheit des GSGSGS-Rfp-Vpr-Kontrollproteins bzw. Rfp-Vpr-Proteins hergestellt wurden.

3.19 Lokalisation des Peptid-Rfp-Fusionproteins in HE⁺YFP-Zellen

Da die Ψ -NCp7-Interaktion an der Plasmamembran stattfindet, war für die Inhibition dieser Wechselwirkung die zytoplasmatische Lokalisation des Peptid-Rfp-Vpr-Fusionproteins von entscheidender Bedeutung. Zur Ermittlung der Lokalisation des Rfp-Vpr-Fusionproteins wurde das Peptid-Rfp-Vpr-Konstrukt mittels der Kalzium-Phosphat-Methode (Kap.2.5.4, Tabelle 2-2) in HE⁺YFP-Zellen transfiziert und die Zellkompartimente selektiv gefärbt. Nach der Überprüfung der Transfektion im Fluoreszenzmikroskop wurden in zwei unabhängigen Ansätzen zunächst die Zellmembran mit dem AlexaFluor-488- bzw. der Zellkern mit dem TO-PRO[®]3-Farbstoff angefärbt (Kap.2.5.5). Die Analyse der Präparate erfolgte im konfokalen Laserraster Mikroskop (CLSM) von Leica. Die Aufnahmen lieferten Informationen über die genaue Lokalisation des Fusionproteins. Wurden die Peptid-Rfp-Vpr-exprimierenden Zellen mit dem 558nm Kanal angeregt, so erschienen sie aufgrund des Rfp-Markerproteins, das als Maß für die Transfektion diente, rot. In Abbildung 3-18 ist die Expression des HWWPWW-Rfp-Vpr-Konstruktes exemplarisch dargestellt.

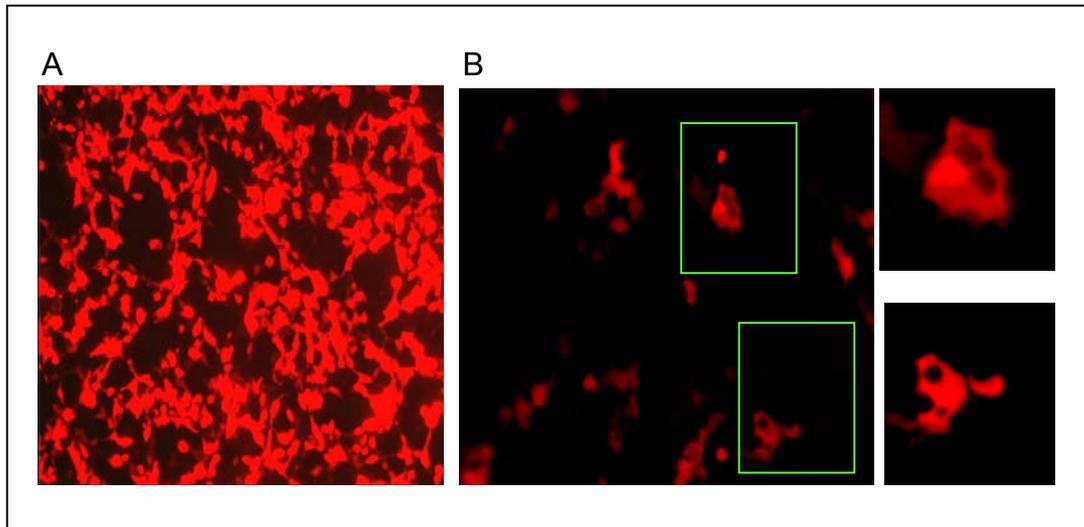


Abbildung 3-18: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahme des HWWPWW-Rfp-Vpr-Fusionproteins. A: Expression des Fusionproteins. Das exprimierte Protein erscheint rot. **B: Aufnahme einzelner HR-YFP-Zellen.** Erkennbar sind schwarze Aussparungen innerhalb der Zellen, wo kein Fusionprotein lokalisiert ist.

Wie in der Abbildung 3-18 zu sehen ist, wurde das HWWPWW-Rfp-Vpr-Fusionprotein (rot) in den transient transfizierten HR-YFP-Zellen exprimiert. Somit können die Zellen für die Bestimmung der Lokalisation des Fusionproteins verwendet werden.

Die Analyse der Expression und Lokalisation der restlichen Konstrukte erfolgte analog. Die Ergebnisse stimmten mit den hier dargestellten überein.

3.19.1 TO-PRO®3-Zellkernfärbung

TO-PRO®3 ist ein kationischer Cyanfarbstoff (Abs 642nm/ Em 661nm), der die Detektion von doppelsträngigen Nukleinsäuren ermöglicht.

Für die Analyse der Proteinlokalisierung im CLSM wurde zunächst das Fusionprotein durch die Anregung mit dem 558nm Kanal detektiert und anschließend durch die Anregung mit der Wellenlänge von 633nm der Zellkern sichtbar gemacht. In der Abbildung 3-19 wurde beispielhaft an zwei Zellen die Lokalisation des HWWPWW-Rfp-Vpr-Fusionproteins dargestellt. Die Ergebnisse konnten durch weitere CLSM-Aufnahmen bestätigt werden.

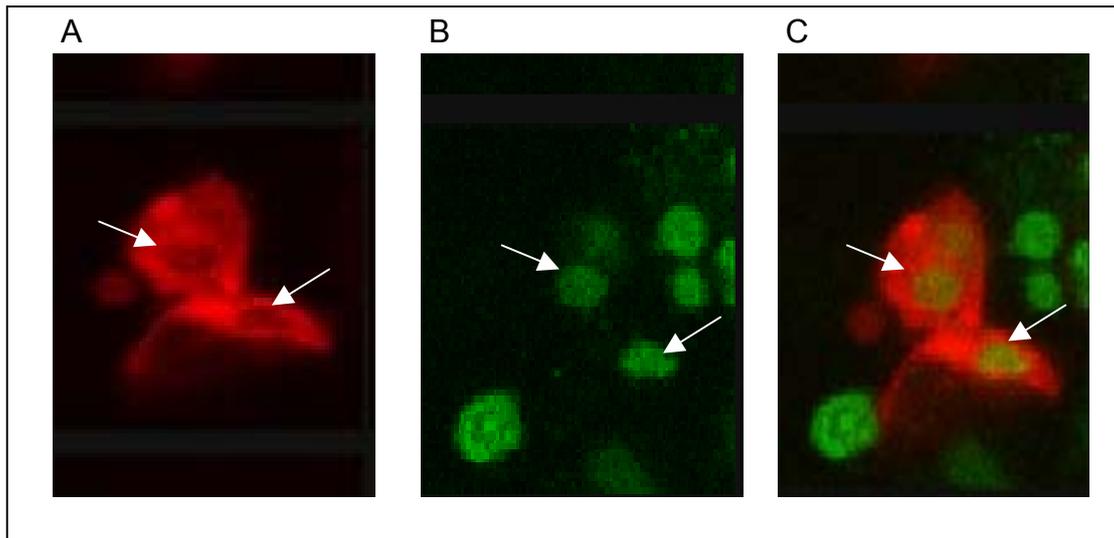


Abbildung 3-19: CLSM-Aufnahme der Zellkernfärbung mittels des TO-PRO®3-Farbstoffs. Der Farbstoff ermöglicht die Detektion von doppelsträngigen Nukleinsäuren. Weiße Pfeile deuten die Kerne an. **A: Fusionprotein.** Das Protein (rot) wird überwiegend im Zytoplasma exprimiert. **B: Kernfärbung.** Die Zellkerne sind grün gefärbt. **C: Überlagerung beider Aufnahmen.** Durch die Überlagerung erscheinen die Kerne leicht gelb. Dies deutet auf einen geringen nukleären Anteil des Proteins hin.

Wie man in der Abbildung 3-19A erkennen kann, ist das Fusionprotein (rot) vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Die weißen Pfeile deuten den Zellkern an, der im Bild als schwarze Aussparung erscheint. Wurde der TO-PRO®3-Farbstoff durch den 633nm Kanal angeregt, so traten Zellkerne (in grün dargestellt) zum Vorschein (Abbildung 3-19B). In der Abbildung 3-19C ist die Überlagerung der Aufnahmen A und B dargestellt. Durch Überlagerung der roten und grünen Farbe erscheinen die Kerne leicht gelb. Dies deutete auf einen geringen nukleären Anteil des HWWPWW-Rfp-Vpr-Proteins hin.

3.19.2 AlexaFluor488-Zellmembranfärbung

AlexaFluor488 (Abs 495nm/ Em 519nm) ist ein ConcanavalinA Konjugat, das an α -Mannopyranosyl- und β -Glycopyranosylreste der Zellmembran bindet und diese anfärbt.

Für die Lokalisation des Fusionsproteins wurde zunächst das HWWPWW-Rfp-Vpr Fusionsprotein durch die Anregung mit den 558nm Kanal und anschließend die Zellmembran durch die Anregung mit dem 488nm Kanal detektiert. Die Färbung wurde beispielhaft an einer Zelle in der Abbildung 3-20 präsentiert. Die Ergebnisse wurden durch weitere CLSM-Aufnahmen bestätigt.

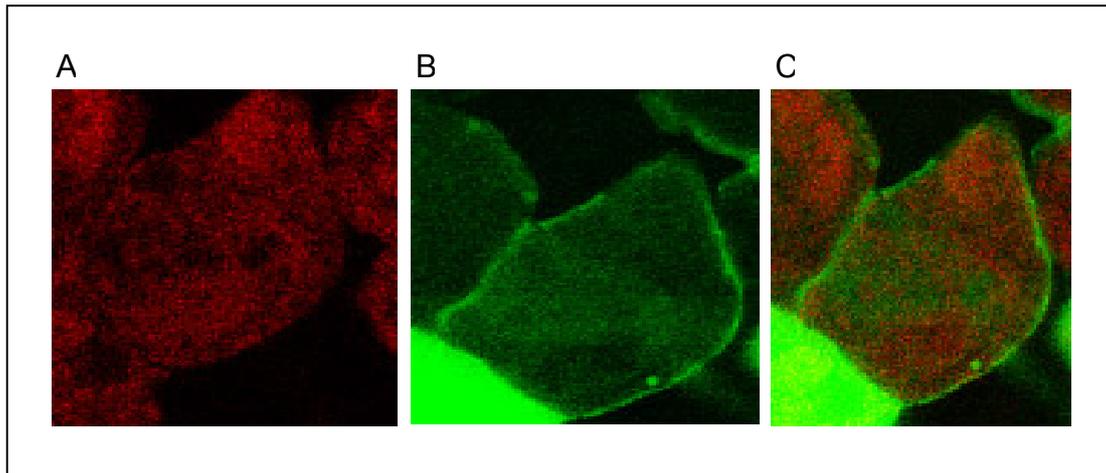


Abbildung 3-20: CLSM-Aufnahme der Zellmembranfärbung mittels des AlexaFluor488-Farbstoffs. Das ConcanavalinA-Konjugat bindet an die Zuckerreste der Zellmembran. **A: Fusionprotein.** Das Protein (rot) war gleichmäßig im Zytoplasma lokalisiert. **B: Zellmembranfärbung.** Die Zellmembran ist grün gefärbt. **C: Überlagerung beider Aufnahmen.**

Das HWWPWW-Rfp-Vpr-Fusionprotein, in der Abbildung 3-20 in rot dargestellt, war im Zytoplasma lokalisiert. Die Zellmembranfärbung ist in Abbildung 3-20B grün dargestellt. Die Überlagerung beider Aufnahmen (Abbildung 3-20C), zeigte eine gleichmäßige Verteilung des Proteins im Zytoplasma. Eine Anlagerung im Bereich der Zellmembran (erkennbar an der gelblichen Färbung des Areals) konnte nicht detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Peptid-Rfp-Vpr-Fusionprotein gleichmäßig im Zytoplasma gleichmäßig verteilt war.

Nachdem die stabile Expression der Peptidliganden als Peptid-Rfp-Vpr-Fusionprotein und dessen zytoplasmatische Lokalisation überprüft wurde, konnte dessen Einfluss auf die Verpackung der viralen RNA in neue Viruspartikel untersucht werden.

3.20 Transiente Kalzium-Phosphat Transfektion von HR⁺YFP-Zellen zur Produktion von Lentiviren

Zur Generierung von Pseudoviren wurden HR⁺YFP Zellen mittels der Kalzium-Phosphat-Methode gleichzeitig mit drei Expressionsplasmiden dem Gag-Pol-Vektor pCMV Δ R8.91 (Abbildung 2-5), dem pMDG.2 VSV-G-Vektor (Abbildung 2-6) und dem Transfergen-Vektor pF25Peptid-Rfp-Vpr (pF25HWWPWW-Rfp-Vpr, pF25HAWPWW-Rfp-Vpr, pF25HWWAWW-Rfp-Vpr, pF25GSGSGS-Rfp-Vpr, pF25Rfp-Vpr) (Kap.2.1.6.1) transfiziert.

Die Konzentration des maximalen eingesetzten Transfektions-Vektors wurde in Vorversuchen ermittelt. Dabei wurden die Zellen mit steigender Konzentration (0-20 μ g) des Peptid-Rfp-Vpr-Vektors transient transfiziert. Als Maximalmenge wurde die höchste Konzentration gewählt, bei der noch Pseudoviren produziert wurden. Dies waren 7 μ g. Anschließend wurde der Transfektionsvektor zwischen 0-7 μ g in 1 μ g-Schritten getitert und nach dem in Tabelle 2-1 dargestellten Schema transfiziert.

Die Transfektionseffizienz wurde im Fluoreszenzmikroskop überprüft (Abbildung 3-21). Durch die Anregung mit dem 558nm Kanal konnte das Peptid-Rfp-Vpr-Protein, durch die Anregung mit dem 514nm Kanal konnte das Yfp detektiert werden.

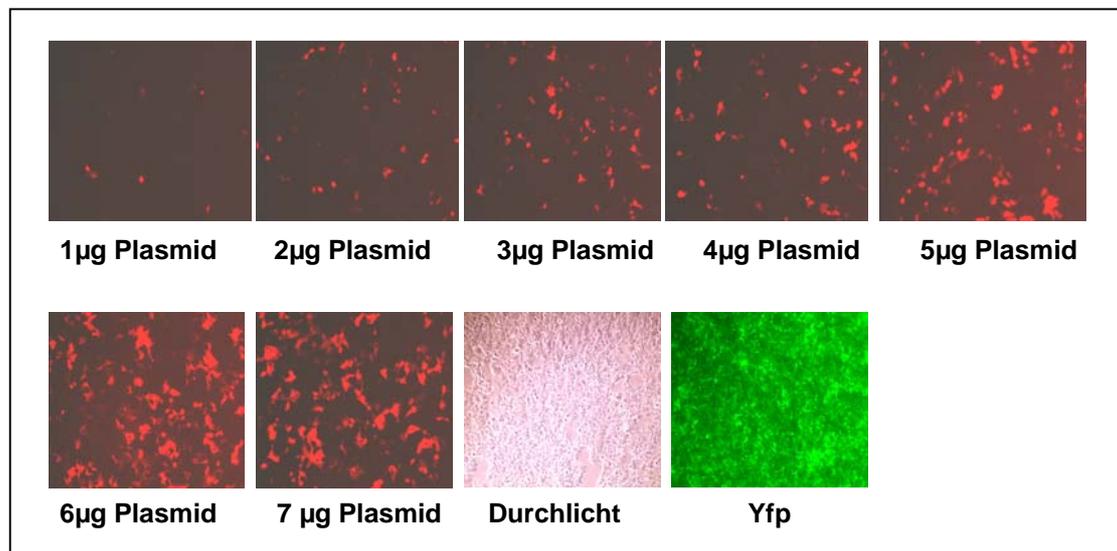


Abbildung 3-21: Transiente CaP-Transfektion mit pF25-X-Rfp-Vpr (1-7 μ g), pMDG.2 VSV-G, pCMV Δ R8.91. Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen. Das Rfp wurde mit dem 558nm, das Yfp mit 514nm Kanal angeregt (μ g-transfizierte Menge des pF25-X-Rfp-Vpr-Vektors).

Wie aus der Abbildung hervorgeht, wurde das Peptid-Rfp-Vpr-Fusionprotein exprimiert. Ebenfalls deutlich zu sehen ist die Abhängigkeit des exprimierten Fusionproteins von der eingesetzten Menge des Transfektions-Vektors. Je mehr Transfektionsvektor eingesetzt wurde, umso mehr Protein wurde exprimiert und umso intensiver war die Rotfärbung der Zellen.

Folgende Pseudoviren wurden produziert:

generiertes Pseudovirus	Transfergen-Vektor
Wildtyp	Kein
Rfp-Vpr-Virus	pF25-Rfp-Vpr
GS-Virus	pF25-GSGSGS-Rfp-Vpr
HWWPWW-Virus	pF25-HWWPWW-Rfp-Vpr
HAWPWW-Virus	pF25-HAWPWW-Rfp-Vpr
HWWAWW-Virus	pF25-HWWAWW-Rfp-Vpr

Tabelle 3-19: Erhaltene Pseudoviren nach transienter Transfektion von HR⁺YFP-Zellen.

Es wurden sechs verschiedene Pseudoviren generiert: ein VSV-G-WT-Virus zwei Kontrollviren (Rfp-Vpr, GSGSGS-Rfp-Vpr) und drei Testviren (HWWPWW/ HAWPWW/ HWWAWW-Rfp-Vpr).

3.21 Bestimmung der p24-Konzentration in den Zellüberständen

Die Bestimmung der Viruskonzentration im Zellüberstand wurde mittels eines ELISAs INNOTEST™HIV Antigen mAb von Innogenetics (Heiden) bestimmt (Kap.2.5.5). Der Test basiert auf der Erkennung des HIV-1 Kapsidproteins p24 durch den biotinylierten monoklonalen anti-p24-Antikörper. Der Nachweis erfolgt durch Straptavidin-konjugierte-HRP.

Die Quantifizierung einer unbekanntem Virusmenge konnte anhand einer Standardkurve ermittelt werden. Zum Erstellen dieser wurde eine Verdünnungsreihe 1/1, 1/2, 1/4, 1/16 des konzentrierten Standards (Bestandteil des Kits), der das rekombinante HIV-1 p24-Protein enthält, vorbereitet. Als Nullstandard wurde die Negativkontrolle (enthält kein p24-Protein) verwendet. Die Verfahrensweise gleicht dem Standard-ELISA (Kap.2.5.5). Mit Hilfe der linearen Regression wurde eine Standardkurve erstellt, wobei die Extinktion auf der Y-Achse und die Verdünnung auf der X-Achse aufgetragen wurden. Diese dienten dann der Bestimmung der p24-Konzentration jeder Probe.

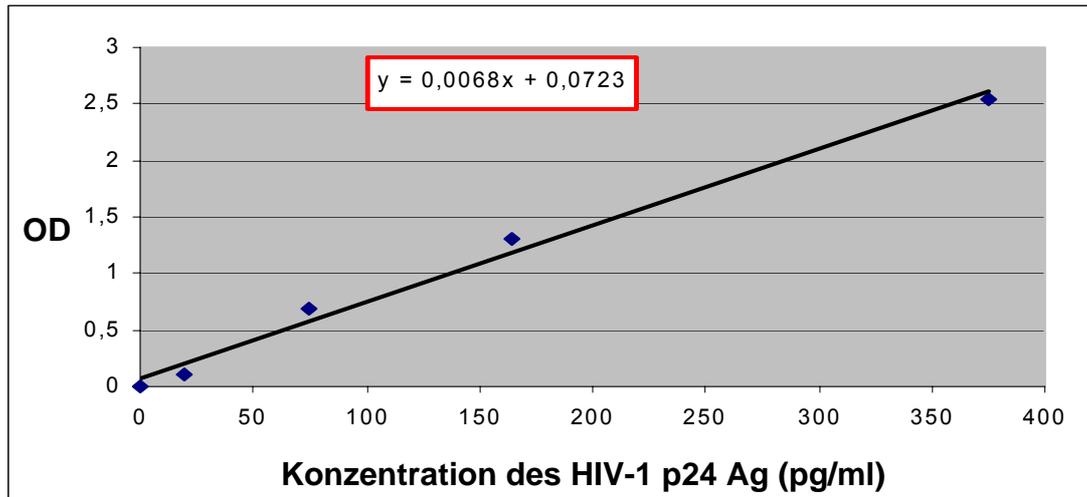


Abbildung 3-22: Standardkurve. Mit Hilfe der linearen Regression kann die p24-Konzentration (pg/ml) einer unbekannt Probe ermittelt werden.

Nachdem die durchschnittliche Extinktion der Standardlösung ermittelt und diese in ein Diagramm aufgetragen wurde, konnte mittels der linearen Regression eine Gleichung 1 zur Berechnung der Viruskonzentration einer unbekannt Probe erstellt werden.

$$y = 0,0068x + 0,0723$$

Gleichung 1: Gleichung zur Quantifizierung der Virusmenge einer unbekannt Probe. Ermittelt anhand der linearen Regression der Standardkurve ($y = OD$; $x = \text{Konz pg/ml}$).

Zur Ermittlung der nötigen Verdünnungsstufe wurden in Vorversuchen die zu untersuchenden Zellüberstände zunächst 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 verdünnt und im Duplet dem p24-ELISA unterzogen. Eine Probe konnte nur dann gewertet werden, wenn die Extinktion $< 2,5$ oder innerhalb der Kurve lag. War dies nicht der Fall, so musste die Probe erneut verdünnt und deren Extinktion nochmals ermittelt werden. Für weitere Experimente wurde die Verdünnungsstufe gewählt, deren Extinktion im Bereich der Standardkurve lag. Dies war 1:1000 für HWWPWW- und HWWAWW-Viren und 1:10000 für die Rfp-Vpr-, VSV-G-, Kontroll-GS- und HAWPWW-Viren. Anschließend wurden die Proben im Duplet bei 450 nm gemessen, der Mittelwert sowie die Standardabweichung der einzelnen Werte errechnet und zur Auswertung in einem Balkendiagramm aufgetragen. Die gemessene Extinktion gab Anhaltspunkte über die im Zellüberstand enthaltene Virusmenge.

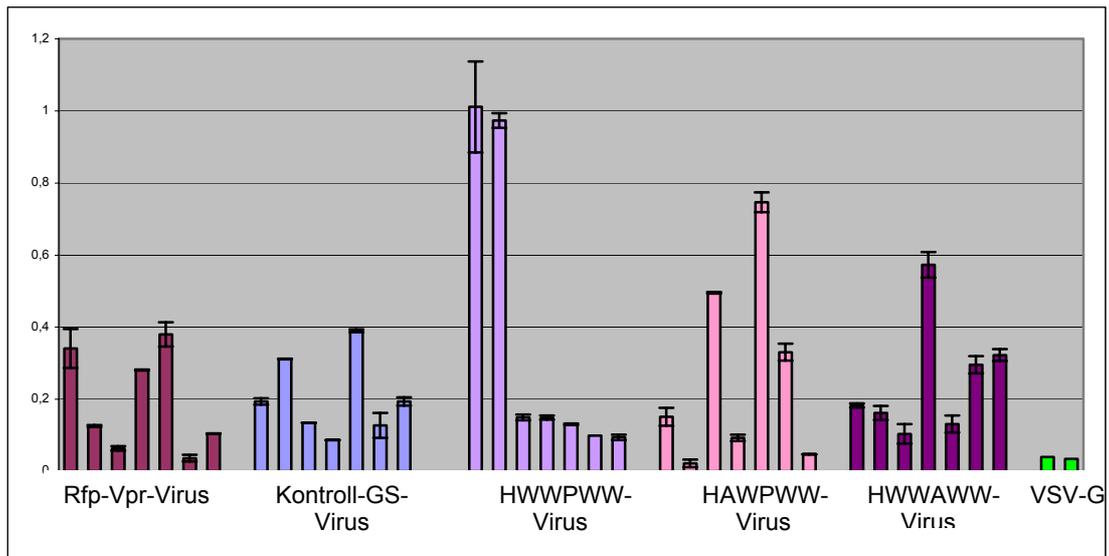


Abbildung 3-23: p24-ELISA zur Ermittlung der Virusmenge im Überstand. Dargestellt sind die gemessenen OD-Werte. Die Zellüberstände wurden 1:1000 für HWWPWW-, HWWAWW- und 1:10000 für die Rfp-Vpr-, VSV-G-, Kontroll-GS- und HAWPWW-Viren verdünnt (der Transfagen-Vektor wurde zwischen 1 μ g - 7 μ g getitert).

Insgesamt wurden sechs verschiedene Pseudoviren generiert. Darunter waren: ein Wildtyp (VSV-G), zwei Kontrollviren (GS und Rfp-Vpr) und drei zu testende Pseudoviren (HWWAWW, HAWPWW, HWWAWW). Für die Herstellung des Kontroll- sowie der HWWPWW-, HAWPWW- und HWWAWW-Pseudoviren wurden die jeweiligen Transfagen-Vektoren zwischen 1-7 μ g getitert. In der Abbildung 3-23 sind die OD-Werte der generierten Pseudoviren gruppenweise von 1 μ g - 7 μ g zusammengefasst. Durch die Auftragung der Extinktion in einem Balkendiagramm konnten die OD-Werte der Proben miteinander verglichen werden. Die Extinktionen bewegten sich zwischen OD 0,036 - 1,01, wobei keine Regelmäßigkeiten erkennbar waren.

Mit Hilfe der Standardkurve und der daraus abgeleiteten Gleichung 1 konnte die p24-Konzentration der einzelnen Proben bestimmt werden. Die p24-Menge diente als Maß für die Pseudovirusmenge. Um die genaue Viruskonzentration zu erhalten, musste der erhaltene Wert ($x = \text{p24 pg/ml}$) mit der Verdünnungsstufe multipliziert werden. Die Ergebnisse wurden in einem Balkendiagramm aufgetragen.

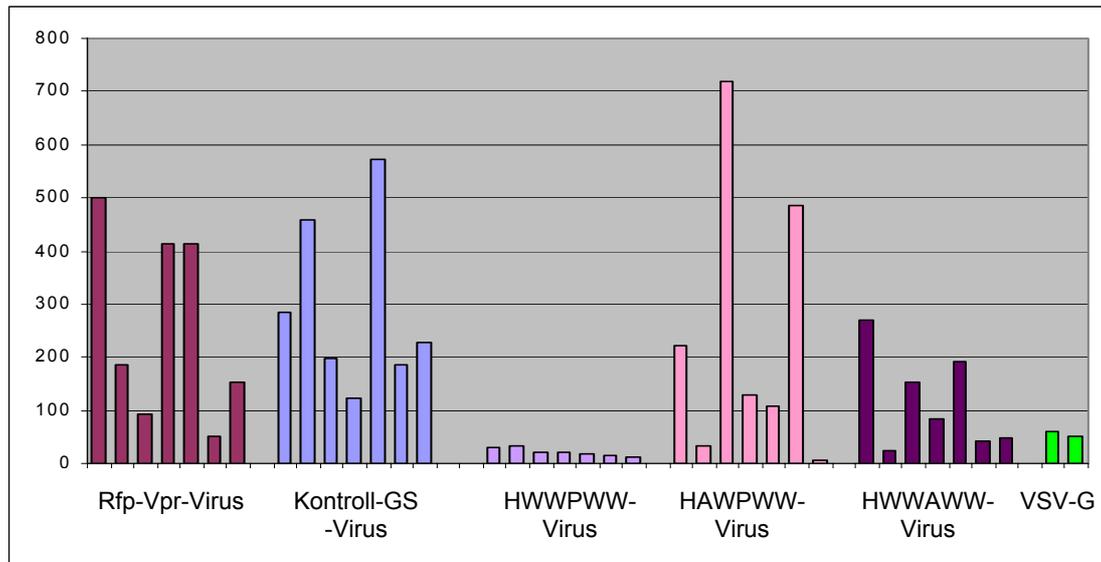


Abbildung 3-24: Bestimmung der p24-Konzentration in ng/ml im Zellüberstand. Die p24-Konzentration wurde anhand der Standardkurve ermittelt und diente als Maß für die produzierte Pseudovirusmenge.

Die Auftragung der p24-Werte erfolgte analog zur Abbildung 3-23. Betrachtet man die Abbildung 3-24, so ist keine Regelmäßigkeit erkennbar. Auch wirkte sich weder die eingesetzte Transfergen-Vektormenge auf die Produktion der Viren aus, noch war der Einfluss der Peptide auf die Virusproduktion erkennbar.

Bei den WildtypVSV-G-Viren, die keinen Transfergen-Vektor enthielten, wurden 59 bzw. 50 ng p24/ml gemessen. Betrachtet man die p24-Menge der Kontrollviren GS-Rfp-Vpr und Rfp-Vpr, so bewegte sich diese zwischen 53ng/ml und 573ng/ml. Da diese Konstrukte an die Ψ -Region der viralen RNA nicht binden (für GSGSGS im Peptid ELISA gezeigt Abbildung 3-13) und somit keinerlei inhibitorischen Einfluß auf die Verpackung der RNA ausüben sollen, muss die unterschiedliche Virusmenge andere Ursachen haben. Auch die Transfektion der HR'YFP-Zellen mit HWWAWW- bzw. HAWPWW-Transgen-Vektoren, führte zu unterschiedlich hohen Pseudoviruskonzentrationen. Es waren keine Regelmäßigkeiten erkennbar. Die geringste Ausbeute an Pseudoviren lieferte die Transfektion des HWWPWW-Rfp-Vpr-Konstruktes. Die Konzentration lag zwischen 13 - 31ng p24/ml. Hier zeichnete sich eine geringe Abhängigkeit der p24-Konzentration von der Konzentration des eingesetzten Transfergen-Vektors ab. So nahm die Virusmenge mit steigender Vektorkonzentration von 31ng bei 1 μ g Vektor bis auf 13ng/ml bei 7 μ g Vektor ab.

Aufgrund dieser Ergebnisse lassen sich keine Aussagen über die Funktionalität der Peptide treffen. Deswegen wurden die Pseudoviren auf den Gehalt der Ψ -RNA untersucht.

3.21.1 Real-time-PCR zur Ermittlung der Ψ -RNA-Menge in den generierten Pseudoviren

Da die identifizierten HWWPWW/ HAWPWW/ HWWAWW-Peptide *in vitro* an die Ψ -Region (Kap.3.14) gebunden haben, wurde angenommen, dass sie sich hemmend auf die Verpackung der viralen RNA auswirken könnten. Das würde zur Folge haben, dass Viruspartikel, die in Gegenwart dieser Peptide produziert wurden, weniger Ψ -RNA als die WT-Viren, die ohne Peptide, bzw. Kontrollviren, die mit einem irrelevanten GSGSGS-Peptid bzw. Rfp-Vpr hergestellt werden, enthalten (Abbildung 3-17). Um diese Frage zu beantworten wurde die quantitative Real-time-PCR-Methode (Kap.2.6) angewendet. Sie ermöglicht die Menge an synthetisierter DNA während einer PCR zu verfolgen. Da die Amplifikation der DNA während einer PCR-Reaktion logarithmisch erfolgt, kann die DNA-Menge spezifisch für eine ausgewählte Sequenz quantifiziert werden. Die Kombination von reverser Transkription und Real-time-PCR ermöglicht, die Konzentration an viraler RNA im Zellüberstand zu bestimmen.

Für die Analyse des Einflusses der Peptide auf die Verpackungseffizienz wurde aus den pseudovirushaltigen Zellüberständen (Tabelle 3-19) zunächst die virale RNA mit Hilfe des QIAmp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) präpariert. Um quantitative Aussagen über die RNA-Menge treffen zu können und später Rückschlüsse auf den Einfluss der Peptide auf die Verpackung der viralen RNA zu ziehen, musste für die Präparation die gleiche Menge an p24 eingesetzt werden. Für die Isolierung der RNA wurden jeweils 14ng p24 eingesetzt. Die RNA wurde anschließend durch reverse Transkriptase (Kap.2.6.2) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde der sequenzspezifische Primer SL4r (Kap.2.1.4) eingesetzt. Für die anschließende qPCR wurden sequenzspezifische Primer SL1d und SL4r (Kap.2.1.4), die aus der Ψ -Region stammten und ein etwa 80nt großes Fragment flankieren, generiert. Mit Hilfe von SYBRGreen und der RT-PCR konnte die RNA-Menge in den Pseudoviren quantifiziert werden. Jede Probe wurde einer Dopplebestimmung unterzogen. Insgesamt wurden drei Peptiden HWWPWW/ HAWPWW und HWWAWW untersucht, die als X-Rfp-Vpr-Fusionprotein in der Zelle exprimiert wurden. Zur Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Inhibition wurde ein irrelevantes GSGSGS-Peptid (ebenfalls als Rfp-Vpr-Protein exprimiert) sowie das Rfp-Vpr-Protein als Kontrollviren eingesetzt. Des weiteren wurde eine Kontrolle der Virusproduktion in Form von VSV-G Wildtypviren eingeführt.

Nach jedem Lauf musste sichergestellt werden, dass nur ein Produkt gebildet wurde. Hierfür wurde die Schmelzkurve analysiert. Diese ersetzt das Agarose-Gel nach der PCR. Bei der Analyse wird Anzahl der Peaks und die Schmelztemperatur untersucht. Sind während der Reaktion mehrere Produkte entstanden, weist die Schmelzkurve mehrere Peaks auf. Ein Peak zeugt von einem PCR-Produkt. Schmelztemperaturen von 70°C deuten auf die Bildung von Primerdimeren hin (Abbildung 2-14).

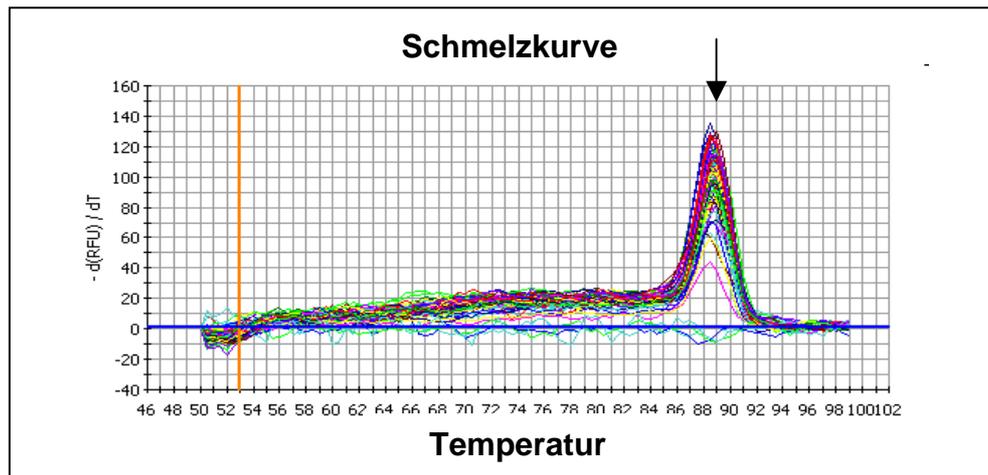


Abbildung 3-25 : Schmelzkurve eines Real-time-Experimentes. Die Schmelztemperatur lag bei 88,5°C. Da nur ein Peak zu sehen war, wurde nur ein Produkt gebildet und der Primer hat spezifisch an das Templat gebunden. Die Schmelztemperatur lag bei 88,5°C. Somit wurden keine Primerdimere gebildet.

Anhand eines Real-time-Experimentes, wurde eine Schmelzkurve exemplarisch dargestellt. Betrachtet man die Schmelzkurve der Abbildung 3-25, so ist nur ein Peak erkennbar. Dies deutet auf eine spezifische Bindung des Primers an das Templat und die Bildung eines einzigen Produktes hin. Die Schmelztemperatur von 88,5°C war ein Beweis dafür, dass keine Primerdimere entstanden sind. Somit war der Lauf für die Auswertung der C_T -Werte geeignet. Die Auswertung weiterer Experimente erfolgte analog. Alle Schmelzkurven wiesen nur einen Peak auf.

In Tabelle 3-20/ Abbildung 3-27 sind die Werte aus zwei unabhängigen Real-time-Experimenten zusammengefasst. Die Wildtyp VSV-G-Viren erreichten den Schwellenwert bei 17,45 Zyklen. Die C_T -Werte der Rfp-Vpr-Kontrollviren lagen ebenfalls zwischen 16,77 und 17,3. Die Erhöhung der Konzentration (1-7µg) des Rfp-Vpr-Transfagen-Vektors und somit des Rfp-Vpr-Fusionproteins hatte keinen Einfluss auf die RNA-Menge in den Pseudoviren mit einer Ausnahme, des 6µg Rfp-Vpr-Ansatzes, dessen C_T -Wert bei 18,2 und somit um einen Zyklus höher als die übrigen Werte lag. Dies könnte auf eine

Pipetierungenauigkeit beim Ansetzen der PCR-Reaktionen zurückgeführt werden, ist aber vernachlässigbar. Da sowohl die Wildtypviren VSV-G- als auch Rfp-Vpr-Kontrollviren vergleichbare C_t -Werte erreichten, konnte davon ausgegangen werden, dass das Rfp-Vpr-Fusionprotein keinen Einfluß auf die Pseudovirusproduktion hatte. Eine weitere Kontrolle war durch das GSGSGS-Rfp-Vpr-Fusionsprotein (irrelevante Peptidsequenz) gegeben. Da dieses Peptid nicht an die Ψ -Sequenz bindet, was im Peptid-ELISA (Kap.3.14) gezeigt wurde, sollte es die Verpackung der RNA nicht beeinflussen. Betrachtet man die C_t -Werte in der Tabelle 3-20, so bewegten sie sich zwischen 17,15 und 18,3 Zyklen und stimmten überwiegend mit den Werten der jeweiligen C_t -Werten der Rfp-Vpr-Kontrollviren überein. Drei Proben 1 μ g, 4 μ g und 5 μ g wiesen einen um 1-2 Zyklen erhöhten C_t -Wert auf. Dies bedeutete, dass diese Pseudoviren 1-2-fach weniger RNA enthielten als die Rfp-Vpr-Kontrollviren. Dieser Wert lag aber im Bereich der Pipetierungenauigkeit und konnte somit vernachlässigt werden. Bei der Auswertung wurden die C_t -Werte der Rfp-Vpr-Kontrollviren als Referenzwert herangezogen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der C_t -Wert der Rfp-Vpr-Viren als Standardwert festgesetzt. Dieser wurde für jede transfizierte Transfergen-Vektormenge (1 μ g-7 μ g) neu festgelegt. Bei der Auswertung der Real-time-Ergebnisse wurden die C_t -Werte des Standards mit den der X-Rfp-Vpr-Testviren verglichen, Bsp. 1 μ g Rfp-Vpr mit 1 μ g HWWPWW-Rfp-Vpr und die Differenz gebildet. Für die Berechnung der Reduktion (M) der Ψ -RNA-Menge in den Pseudoviren wurde zunächst die Differenz ΔC_t aus der Probe und dem Standard gebildet und anschliessend in folgende Formel eingesetzt.

$$M = 2^{\Delta C_t}$$

Gleichung 2: Formel zu Berechnung der RNA-Reduktion zwischen der verpackten RNA in den Rfp-Vpr-Viren und den X-Rfp-Vpr-Viren (ΔC_t -Differenz zwischen den Schwellenwerten der Rfp-Vpr (Standard) und X-Rfp-Vpr-Viren).

Positive ΔC_t -Werte bedeuteten, dass die Probe den Schwellenwert später als die Referenz erreichte und somit weniger Ψ -RNA enthielt. Negative ΔC_t -Werte bedeuteten, dass die Probe früher als die Referenz den Schwellenwert erreichte und somit mehr Ψ -RNA enthielt. Gleiches galt für die M-Werte. Die Reduktion der RNA-Menge wird dem Einfluss des Peptides, das als Peptid-Rfp-Vpr-Fusionprotein exprimiert wird, zugeschrieben.

In Abbildung 3-26 ist exemplarisch das Ergebnis eines Real-time-Experiments für das HWWAWW-Rfp-Vpr- ($1\mu\text{g}$) sowie der Kontrolle/Referenz in Form des Rfp-Vpr-Fusionproteins ($1\mu\text{g}$) gezeigt.

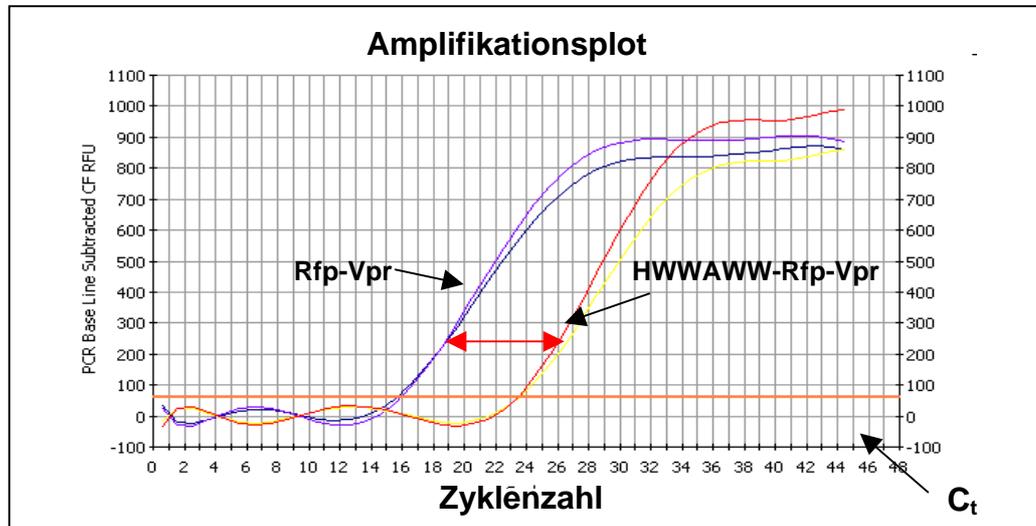


Abbildung 3-26: Representative Darstellung eines Real-time-Experimentes. Die Darstellung zeigt ein Amplifikationsplot des HWWAWW-Rfp-Vpr-Fusionproteins und der Rfp-Vpr-Kontrolle/Referenz bei einer Konzentration des Transfergen-Vektors von $1\mu\text{g}$. Die roten Pfeile kennzeichnen den Unterschied zwischen den beiden cDNA's. Der C_t -Wert bezeichnet den Wert, der eine Probe benötigt um den Schwellenwert zu überschreiten.

Die Probe der Rfp-Vpr-Viren (Referenz) hat den Schwellenwert (C_t -Wert, „threshold cycle“) bei 16,55 Zyklen erreicht. Der C_t -Wert der HWWAWW-Viren lag dagegen bei 24 Zyklen und war somit um etwa 7,4 (ΔC_t) Zyklen größer als der Standard. Die Berechnung des M-Wertes anhand Gleichung 2 ($M=2^{7,4}$) ergab eine 168-fache Reduktion der Ψ -RNA-Menge in den HWWAWW-Viren verglichen mit dem Rfp-Vpr-Standard. (Der in der Tabelle 3-20 angegebene Wert für HWWAWW-Rfp-Vpr ist ein Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten).

Pseudovirus	C_t	ΔC_t	$2^{\Delta C_t}$
VSVG	17,45	0	0
$1\mu\text{g}$ Rfp-Vpr	16,55	0	0
$1\mu\text{g}$ Kontroll-GS	17,72	1,17	2,25
$1\mu\text{g}$ HWWPWW	18,05	1,5	2,8
$1\mu\text{g}$ HAWPWW	18,35	1,8	3,4
$1\mu\text{g}$ HWWAWW	23,02	6,47	88,64

Pseudovirus	C_t	ΔC_t	2^{ΔC_t}
2μg Rfp-Vpr	17,3	0	0
2μg Kontroll-GS	17,57	0,27	1,2
2μg HWWPWW	17,57	0,27	1,2
2μg HAWPWW	15,67	-1,63	-3,1
2μg HWWAWW	17,7	0,4	1,3
3μg Rfp-Vpr	16,77	0	0
3μg Kontroll-GS	17,15	0,38	1,3
3μg HWWPWW	16,85	0,08	1,06
3μg HAWPWW	14,25	-2,52	-5,74
3μg HWWAWW	28,625	11,85	3691
4μg Rfp-Vpr	17,35	0	0
4μg Kontroll-GS	18,3	0,95	1,93
4μg HWWPWW	17,05	-0,3	-1,23
4μg HAWPWW	15,175	2,18	4,53
4μg HWWAWW	18,25	0,9	1,86
5μg Rfp-Vpr	17,2	0	0
5μg Kontroll-GS	18,22	1,02	2
5μg HWWPWW	15,22	-1,98	-3,94
5μg HAWPWW	16,95	-0,25	1,2
5μg HWWAWW	16,72	-0,3	1,23
6μg Rfp-Vpr	18,25	0	0
6μg Kontroll-GS	18,45	0,2	1,14
6μg HWWPWW	18,52	0,27	1,2
6μg HAWPWW	15,55	-2,7	6,5
6μg HWWAWW	17,925	-0,33	-1,25
7μg Rfp-Vpr	17,375	0	0
7μg Kontroll-GS	17,57	0,4	1,31
7μg HWWPWW	18,87	0,38	1,3
7μg HAWPWW	20,72	2,75	6,72
7μg HWWAWW	18,65	0,67	1,6

Tabelle 3-20: Zusammenfassung der Real-time-Experimente. Die C_t-Werte geben einen Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten wider. ΔC_t ist die Differenz aus dem

Referenzwert und der Probe. Negative Werte entsprechen einer höheren RNA-Menge, positive Werte bedeuten eine niedrigere RNA-Konzentration im Vergleich zum Rfp-Vpr-Virus/Standard.

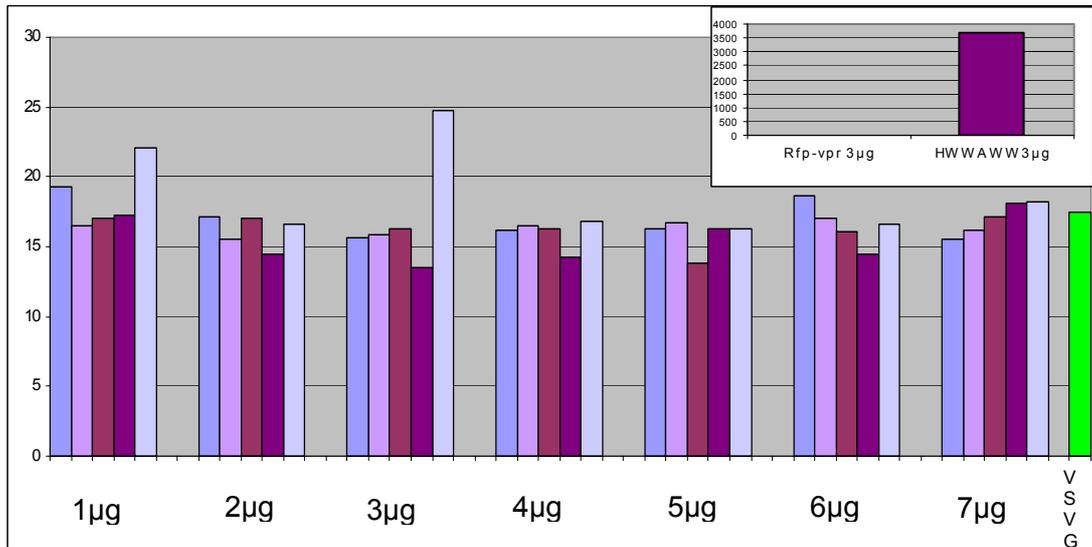


Abbildung 3-27: Graphische Zusammenfassung der Real-time-Experimente. Die C_t -Werte (Tabelle 3-20) geben einen Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten wieder. (Rfp-Vpr/GS-Rfp-Vpr/HWWPWW-Rfp-Vpr/HAWPWW-Rfp-Vpr/HWWAWW-Rfp-Vpr/VSVG). In der kleinen Abbildung ist der M-Wert für den 3 µg HWWAWW- sowie den Rfp-Vpr-Ansatz Referenzwert dargestellt.

3.21.1.1 Einfluss des HWWPWW-Peptids auf die Verpackung der Ψ -RNA

Wurde der HWWPWW-Rfp-Vpr-Transfergen-Vektor zwischen 1 µg - 7 µg in 1 µg Schritten getitert, so hatte dies keinen Einfluss auf die Ψ -RNA-Menge in den Testviren. Die C_t -Werte der Testviren waren mit den C_t -Werten der dazugehörigen Kontrollviren, die bei ca. 18 Zyklen lagen, vergleichbar. Somit wurden gezeigt, dass das HWWPWW-Peptid keinen reprimierenden Einfluss auf die Verpackung der Ψ -RNA ausübt. Auffällig war die 5 µg Probe, die zu einer minimalen Erhöhung der Ψ -RNA um den Faktor 3,94 führte.

3.21.1.2 Einfluss des HAWPWW-Peptids auf die Verpackung der Ψ -RNA

Wurde der HAWPWW-Rfp-Vpr-Transfergen-Vektor zwischen 1 µg - 7 µg in 1 µg Schritten getitert, so konnte ein geringer Einfluss auf die Ψ -RNA-Menge in den Testviren festgestellt werden. Betrachtet man die C_t -Werte der HAWPWW-Testviren, so werden Unterschiede zu den C_t -Werten der dazugehörigen Kontrollviren deutlich. Dabei fiel auf, dass es sowohl Testviren gab die weniger bzw. mehr Ψ -RNA als auch die Kontrollviren enthielten.

Enthielten die Testviren mehr Ψ -RNA als die Kontrollviren, so war dies an negativen ΔC_t - und auch der M-Werte sichtbar. So wurde für den 2 μ g-Ansatz ein ΔC_t -Wert von -1,63 ermittelt, was einer 3,1-fachen Reduktion entsprach. Für den 3 μ g-Ansatz wurde ein ΔC_t -Wert von -2,52 ermittelt, was einer 5,74-fachen Reduktion entsprach. Die hemmende Wirkung des Peptides ließ sich an den positiven ΔC_t - und M-Werten erkennen. So wies der 4 μ g-Ansatz eine 4,5-fache und der 7 μ g-Ansatz eine 6,72-fache Reduktion der RNA-Menge auf. Die C_t -Werte der restlichen Ansätze glich den jeweiligen Referenzwerten.

3.21.1.3 Einfluss des HWWAWW-Peptids auf die Verpackung der Ψ -RNA

Wurde der HWWAWW-Rfp-Vpr-Transfergen-Vektor zwischen 1 μ g - 7 μ g in 1 μ g Schritten getitert, so konnte ein deutlicher Einfluss auf die Ψ -RNA-Menge in den Testviren festgestellt werden. Hierbei liess sich der hemmende Einfluß der Peptide auf die Ψ -RNA-Verpackung schon anhand der ΔC_t -Werte erkennen. Die Intensität der Hemmung wurde aber erst durch den Vergleich der M-Werte ($2^{\Delta C_t}$) deutlich. Schon der Einsatz von 1 μ g des Transfergen-Vektors führte zu einer Verschiebung des Schwellenwertes um 6,47 Zyklen verglichen mit der Referenzprobe. Dies bedeutet, dass die generierten 1 μ g Testviren 88,64 mal weniger RNA enthalten war als die 1 μ g Kontrollviren (Rfp-Vpr). Betrachtet man den 3 μ g-Ansatz, so wird der hemmende Effekt noch deutlicher. Im Vergleich zum Kontrollvirus wurde der Schwellenwert um 11,85 Zyklen später erreicht. Somit enthielten die Testviren 3691-mal weniger RNA als die Kontrollviren.

Die restlichen Proben (2 μ g, 4 μ g, 5 μ g, 6 μ g, 7 μ g) wiesen keine Unterschiede in der RNA-Menge im Vergleich zu den Kontrollwerten. Die RNA-Menge blieb auch bei der Steigerung der Vektormenge konstant.

Die Ergebnisse der Real-time-Experimente ließen darauf schließen, dass nur das HWWAWW-Peptid einen deutlichen Einfluss auf die RNA-Verpackung ausübte und in der Lage war, die Menge der Ψ -RNA in den Pseudoviren negativ zu beeinflussen. So enthielten Pseudoviren die in Gegenwart von 2 μ g bzw. 3 μ g des HWWAWW-Transfergen-Vektors generiert wurden, 88,64 bzw. 3691-mal weniger RNA als die dazugehörigen Referenzwerte. Dies korreliert mit den Ergebnissen der CD-Spektroskopie. Dabei wurde das HWWAWW-Peptid als das affinste Peptid identifiziert (3.17).

Ebenfalls zu beobachten war die nicht erwartete Erhöhung der Ψ -RNA durch den Einsatz des Fusionproteins. Dazu gehörten folgende Pseudoviren: 2 μ g, 3 μ g HAWPWW und 5 μ g HWWPWW.

4 Diskussion

In den letzten Jahren hat RNA als Ziel für therapeutisch wirksame Substanzen an Bedeutung gewonnen. Die Fähigkeit, komplexe dreidimensionale Strukturen auszubilden, versetzt die RNA in die Lage, Effektormoleküle zu binden und somit viele regulatorische Funktionen in der Zelle auszuüben. Die hohe Diversität der RNA, die durch die dreidimensionale Faltung gegeben ist, bietet großes Potential für die Entwicklung von strukturbasierenden Molekülen. Zusätzlich hat die Entdeckung der RNA-Viren sowie die damit verbundene Notwendigkeit neuer Therapieansätze, das Interesse an der Entwicklung von potentiellen RNA-Inhibitoren geweckt.

Als therapeutische Zielstruktur bietet die RNA gegenüber der DNA einige Vorteile. Während die chromosomale DNA im Zellkern dicht verpackt und somit der Zugriff auf kleine Moleküle limitiert ist, ist die RNA generell im Zytoplasma zugänglich.

Neu entwickelte *in vitro* Selektionsmethoden eröffnen viele Möglichkeiten für die Suche und Identifikation von RNA-Liganden. Eine sehr oft eingesetzte Methode für die Identifizierung von möglichen Liganden für beliebige Zielstrukturen ist die Phage-Display-Technik. Die Methode bedient sich einer Affinitätsselektion und wurde erfolgreich für die Selektion von Peptiden für Proteine, Antikörper und Enzyme eingesetzt. Da die Suche nach geeigneten Liganden auf der Strukturerkennung des Zielmoleküls durch die auf der Phagenoberfläche exprimierten Peptide basiert, kann die Methode ebenfalls für die Suche nach RNA-Liganden geeignet sein. Tatsächlich konnten aus einer Phagenbank für die snRNP, Peptide mit einem hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren identifiziert werden⁹⁹.

Das Ziel des Projektes war die Identifizierung von struktur- und sequenzspezifischen Liganden für das HIV-1 Verpackungssignal Ψ sowie dessen Teilelement SL3 unter Verwendung der Phage-Display-Technik. Des Weiteren sollten die selektierten Liganden auf ihre Funktionalität in der Zellkultur getestet werden.

4.1 Funktionalitätsnachweis der Transkripte

Bevor die Transkripte für das Biopanning eingesetzt werden konnten, mussten sie auf ihre Stabilität und Funktionalität untersucht werden. Dies erfolgte mit Hilfe von ELISA und EMSA. Es wurde davon ausgegangen, dass das p55^{Gag}-Protein, in Gegenwart eines unspezifischen Kompetitors in Form

von tRNA, nur die Ψ -RNA bindet, nicht jedoch die CCR5-Kontroll-RNA. Betrachtet man die Abbildung 3-3 und 3-7, so ist neben der starken Bindung des p55^{Gag}-Proteins an die Ψ -RNA, eine schwache Bindung an die CCR5-Kontroll-RNA erkennbar. Die schwache, unspezifische Bindung an die CCR5-Kontroll-RNA war nicht unerwartet. So konnte die Gruppe um Muriaux zeigen, dass das p55^{Gag}-Protein in Abwesenheit der Ψ -Region sowohl tRNA als auch andere RNA-Fragmente bindet. Befindet sich in einem Pool jedoch Ψ -RNA, so wird diese preferentiell gebunden¹¹². Dies war auch hier der Fall. Wurde dem p55^{Gag}-Protein tRNA und Ψ -Fragment angeboten, so wurde Ψ -RNA bevorzugt gebunden (Abbildung 3-3), was an der starken Bande in der Ψ +p55^{Gag}-Spur zu sehen ist. Wurde dem Protein jedoch eine irrelevante RNA angeboten (tRNA und CCR5), so wurden beide mit einer niedrigeren Affinität gebunden. Da aber nur die CCR5-Kontroll-RNA isotopenmarkiert war, erschien die Bande sehr schwach (Abbildung 3-7). Die p55^{Gag}-assoziierte tRNA war im Gel nicht zu sehen, da sie unmarkiert war. Diese Ergebnisse wurden nochmals durch den ELISA bestätigt (Abbildung 3-7).

Den Stabilitätsbeweis der RNA unter Versuchsbedingungen lieferten die Ergebnisse des EMSA's (Abbildung 3-4). Eine deutliche RNA-Bande auf der Höhe des gesamten Transkripts nach Inkubation mit der Phagen-Bank schließt eine massive RNA-Degradation unter Versuchsbedingungen aus. Das nächste Problem das geklärt werden sollte, war die Immobilisierung der RNA für das Biopanning sowie den ELISA. Diese erfolgte über die Interaktion der natürlichen Liganen Streptavidin und Biotin. Hierfür wurde an die transkribierte Ψ - und CCR5-RNA ein biotinyliertes DNA-Oligonukleotid, das zu dem 5' bzw. 3'-Ende des Transkriptes komplementär war, hybridisiert (Kap.2.3.5). Während das RNA-3'bio-Oligo sowohl zum 5'-Ende der Ψ - als auch der CCR5-RNA komplementär war, war das 5'bioPSIRNA-Oligonukleotid dagegen Ψ -spezifisch und hybridisierte mit dem 3'-Ende diesen Transkriptes (Abbildung 3-1). Bei der Analyse der Hybridisierungseffizienz hat sich jedoch herausgestellt, dass das RNA-3'bio-Oligonukleotid besser mit der Ψ -RNA hybridisierte (Abbildung 3-6 und 3-7). Aufgrund der Ergebnisse wurde sowohl für die Immobilisierung der Ψ -RNA als auch der CCR5-RNA das RNA-3'bio-Oligonukleotid verwendet. Die SL3 und SL3mut wurden synthetisch hergestellt und biotinyliert. Die SL3mut lag neben der biotinylierten Form auch unbiotinyliert vor (Kap.2.1.5).

4.2 Identifizierung von Peptidliganden durch Screening von Phagen-Banken

Zur Identifizierung von Peptidliganden für das Ψ -Signal und dessen Teilstruktur, die Stammschleife SL3, wurden drei kommerzielle Phagen-Banken mit zufälliger Aminosäuresequenz und einer Diversität von $1,9-3,7 \times 10^9$ unabhängigen Klonen verwendet. Die Peptidinserts hatten eine Länge von 7 bzw. 12 Aminosäuren und lagen als lineare Sequenz oder flankiert von Cystein-Resten in zyklischer Form vor. Insgesamt wurden mehrere unabhängige Biopannings je RNA und Phagen-Bank durchgeführt. Unspezifische RNA-Phagen-Wechselwirkungen wurden durch den Einsatz von Kontroll-RNA-Fragmenten in der negativ-kompetitiven Selektion eliminiert. Da die Ψ -Region über eine ausgeprägte dreidimensionale Struktur verfügt und das Ziel des Biopannings die Selektion von struktur- und sequenzspezifischen Phagen war, sollte sich die Kontroll-RNA sowohl in der Primär- als auch der Sekundärstruktur von der Ziel-RNA unterscheiden. Die Wahl fiel auf eine Teilsequenz des humanen CCR5-Rezeptors, der beide Kriterien erfüllte (Kap.2.1.5, Kap.3.1).

Ziel des SL3-Biopannings war die Selektion von sequenzspezifischen Phagen, die an die Schleifenregion binden. Dies wurde durch den Einsatz von SL3mut-RNA erzielt (Kap.2.1.5), bei der die GGAG-Sequenz der Schleifenregion gegen Adenine ausgetauscht wurde. Dies hatte zwei Gründe: zum einen sind die beiden Guanosine G⁷ und G⁹ in die Bindung an das NCp7 direkt involviert, zum anderen konnte gezeigt werden, dass Mutationen, die diesen Bereich betreffen, zu einer 80-fachen Reduktion der Verpackungseffizienz führten^{38,78}.

Nach der 4-ten positiven und der 5-ten negativ-kompetitiven Selektionsrunde wurden die Phagen der jeweiligen Eluate getitert, die blauen Plaques ausgezählt und der Titer in pfu/ml bestimmt. Der Selektionserfolg war am Phagentiter deutlich zu erkennen. Der Titer lag nach der 4-ten Selektionsrunde für die Ψ -RNA bei $10^6 - 10^8$ (Tabelle 3-1) und nach der 5-ten bei $10^5 - 10^8$ pfu/ml (Tabelle 3-2). Ähnlich verhielt sich der Titer für die SL3-RNA. So lag dieser nach der 4-ten Selektionsrunde bei $10^5 - 10^8$ (Tabelle 3-6) und nach der 5-ten bei $10^4 - 10^7$ pfu/ml (Tabelle 3-2). Dieses Ergebnis deutet auf eine deutliche Reduktion der Phagen und somit auf eine gezielte Selektion und Anreicherung von RNA-spezifischen Phagen hin. Die Zahl der Phagen konnte im Vergleich mit der Originalbank (2×10^9) um 10^1-10^4 reduziert

werden. Betrachtet man den Titer des Ψ - und SL3-Biopannings, so fallen Unterschiede auf, die auf einen Zusammenhang zwischen RNA-Länge und Ligandengröße hindeuten. Wurde das kurze RNA-Fragment (SL3 20nt) eingesetzt, so stammten die meisten Phagen aus der 12-mer Bank, die kleinste Ausbeute ergab der Einsatz der zyklischen 7-cys Bank (Kap.3.8). Wurde dagegen das lange Fragment verwendet, so konnten keine Unterschiede im Phagentiter festgestellt werden (Kap.3.7).

Insgesamt wurden aus dem Ψ -Biopanning ca. 1000 Phagenklone im ELISA (Kap.3.7.1) auf die Spezifität zur Ψ -RNA getestet. Davon haben 36 spezifisch an die RNA gebunden, was 3,6% entsprach. Die Verteilung positiver Phagen sah wie folgt aus: 16 aus der 12-mer Bank (Tabelle 3-4), 17 aus der 7-mer (Tabelle 3-3) und 3 aus der zyklischen 7-cys Bank (Tabelle 3-5). Dieses Ergebnis war überraschend, da der Phagentiter (Kap.3.7) wie oben bereits erwähnt bei allen Phagen-Banken vergleichbar war. Somit wurde auch mit gleichmäßiger Verteilung positiver Phagen gerechnet. Aus dem SL3-Biopanning wurden ca. 700 Phagenklone im ELISA (Kap.3.8.1) auf die Spezifität zur SL3 getestet. Davon waren insgesamt 35, was 5% entsprach, als SL3-spezifisch eingestuft. Die geringste Ausbeute von 8 Phagen (Tabelle 3-10) lieferte ebenfalls die zyklische 7-cys Bank. Im Vergleich dazu konnten mit der 12-mer Bank 15 Phagen (Tabelle 3-9) und mit der 7-mer 12 Phagen (Tabelle 3-8) selektioniert werden. Diese Ergebnisse spiegelten sich im Phagentiter wider (Kap.3.8). Dieser war für die linearen Phagen-Banken höher als für die zyklische.

Der Grund für die geringe Ausbeute aus dem Biopanning mit der zyklischen 7-cys Phagen-Bank könnte die geringe Angriffsfläche des zyklischen Peptids sein, die scheinbar für die Bindung an die RNA nicht ausreichend war. Zwar gleichen sich das lineare und das zyklische 7-mer Peptid in der Länge, durch die Zyklisierung wird jedoch die Angriffsfläche reduziert. Dies führte zu der Annahme, dass die linearen Phagen-Banken für das RNA-Biopanning geeigneter waren als die zyklische. Bei den linearen Phagen-Banken war die Peptidlänge für die Ausbeute irrelevant, da sowohl für das lange Ψ -Fragment (156nt) als auch für das kurze SL3-Fragment (20nt) vergleichbare Anzahl positiver Phagen aus der 12-mer und 7-mer Phagen-Bank identifiziert werden konnten. Die Zahl der unspezifischen Phagen (ca. 95%) im Eluat der 5-ten negativ-kompetitiven Selektionsrunde war im Vergleich zu der Zahl der positiven Phagen (ca. 4 -5%) sehr hoch. Eine weitere Selektionsrunde führte jedoch nicht wie erwartet zur Eliminierung von unspezifischen Phagenklonen,

sondern zum kompletten Verlust aller Phagen, was in Vorversuchen gezeigt wurde. Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen und somit einer höheren Ausbeute an positiven Phagen könnten für die negativ-kompetitive Selektion weitere unrelevante RNA-Fragmente eingesetzt werden. Zusätzlich könnte die Stringenz durch weitere Waschschriffe erhöht werden.

Die spezifischen Phagen wurden anschließend sequenziert und die Peptidinserts auf Homologien sowohl untereinander als auch zu HIV-1-Proteinen untersucht. Dabei wurden viele Übereinstimmungen zwischen Ψ - und SL3-Phagen festgestellt (Tabelle 3-11, Tabelle 3-12). Die Peptidinserts enthielten basische, aromatische, hydrophobe und polare Aminosäuren, die mit unterschiedlicher Frequenz vertreten waren. Die Häufigkeit hing von der Natur der Wechselwirkungen zwischen der RNA und den einzelnen AS ab. Dabei handelte es sich sowohl um spezifische, als auch um unspezifische Interaktionen. Zu den unspezifischen gehörten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Aminogruppe der basischen Aminosäuren Histidin (13,4%) und dem negativen Rückgrad der RNA. Ein Beispiel hierfür war der SL3-Phage 12.3/5/6/24 GHIHSMRHRPT. Sehr oft vertreten war die ebenfalls basische Aminosäuren Arginin (R) mit 6,7%. Sie nimmt jedoch eine Sonderstellung unter den positiven Aminosäuren ein, da sie sich durch einige strukturelle Eigenschaften auszeichnet, die sie zum optimalen RNA-Bindungspartner machen. Neben der positiven Ladung und der langen aliphatischen Kette, verfügt sie über eine π -Elektronenwolke, die zwischen den Basen der Nukleinsäuren interkalieren kann. Wie in der Literatur beschrieben, können argininreiche Motive (ARM) unabhängige Domänen ausbilden, welche die RNA, die als Gerüst fungiert, mit hoher Affinität und Spezifität binden. Speziell binden ARM vor allem an Schleifen und Bulge-Regionen der RNA¹¹⁸, die in der Ψ - und der SL3-RNA zu finden sind. Des weiteren tragen die positiven Aminosäuren zur Erhöhung des positiven Potentials an der Proteinoberfläche und somit zur stärkeren Bindung an die RNA bei⁸⁰. Diese Elemente wurden in natürlichen viralen RNA-Liganden wie Tat, Rev und NCp7 gefunden^{44,119,120}. Betrachtet man die Tabelle 3-11 und Tabelle 3-12, so fällt der hohe Anteil der aromatischen AS Tryptophan (W/11,6%) in Verbindung mit basischen Aminosäuren Histidin (H/13,4%), Arginin (R/6,7%) und Lysin (K/3,6%) auf. Ein Beispiel hierfür ist der Ψ -Phage 7.5 HWWLFWW. Schon in früheren *in vitro* Selektionsexperimenten mit RNA konnten tryptophanreiche Elemente identifiziert werden¹¹³. Tryptophan besitzt einen Indolring an einer

Methylengruppe, der ein Stickstoffatom enthält. Diese stark hydrophobe Aminosäure zeichnet sich durch eine delokalisierte π -Elektronenwolke aus, die es ihr ermöglicht mit anderen π -Systemen in Wechselwirkung zu treten und Elektronen zu übertragen (Interkalation). Die interkalierenden Eigenschaften des Indolrings tragen zur Affinität sowie Stabilität des Protein-RNA-Komplexes bei⁴⁴. Interessanterweise wiesen diese Motive (aromatische Aminosäuren in Verbindung mit basischen Aminosäuren) Ähnlichkeiten mit dem nativen Ψ -Liganden, dem NCp7-Protein auf. So verfügt das HIV-1 NCp7 über konservierte N-terminale Arginine, die sich zu einer 3_{10} -Helix falten, an unspezifischen Wechselwirkungen mit der Stammschleife 3 beteiligt sind und auf den RNA-Protein-Komplex eine stabilisierende Wirkung ausüben^{38,67}. Eine weitere Übereinstimmung ist das Tryptophan, das auch im NCp7 zu finden ist und für die spezifische Bindung des NCp7-Proteins an die SL3 von zentraler Bedeutung ist. So bindet das NCp7 über das Trp³⁷ an das G⁷ des SL3-Tetraloops der SL3 (Kap.1.4.1)³⁸. Deshalb ist es nicht zufällig, dass sowohl mit der Ψ - als auch der SL3-RNA ähnliche, überlappende Motive selektioniert werden konnten. Ebenfalls häufig zu finden war die Iminosäure Prolin (P/12,5%), die an hydrophobe Bereiche der RNA bindet. Prolin unterscheidet sich von den anderen Aminosäuren durch Ausbildung einer starren Ringstruktur, die einen großen Einfluss auf die Architektur der Peptide ausübt. Prolin ist häufig in Knickpunkten von Peptiden bzw. Proteinen zu finden. Durch den Knick können diese Peptide sich besser an die räumliche Struktur der RNA anpassen. Der hohe Anteil der polaren Aminosäuren Serin (S/10,6%), Threonin (T/9%) und Glutamin (Q/4,3%) lässt sich durch die hydrophilen Eigenschaften dieser Aminosäuren erklären. Sie sind für die Löslichkeit der Peptide im wässrigen Milieu verantwortlich und binden an RNA-Abschnitte, die in der wässrigen Lösung exponiert sind. Das Biopanning ergab ebenfalls einen hohen Anteil der hydrophoben Aminosäure Leucin (L/8,4%), die über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Basen der RNA interagiert. Auffällig war der niedrige Anteil (insgesamt 1,7%, Tabelle 3-13) an sauren Aminosäuren wie Glutamat (E) und Aspartat (D). Diese Aminosäuren verfügen über negativ geladene Carboxygruppen, die zur Ausbildung von Abstoßungskräften zwischen der negativen Aminosäure und dem negativen Phosphodiesterückgrad der RNA führten. Somit wird deren Bindung an die RNA durch diese elektrostatischen Wechselwirkungen erschwert. Die AS Cystein (C) kam ebenfalls selten vor (1,2%), wohingegen der Anteil an Methionin (M) trotz strukturellen Ähnlichkeiten deutlich höher war (4,3%).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Methode des Phage-Display für die Suche nach sequenz- und strukturspezifischen Peptidliganden für RNA-Fragmente geeignet ist. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die RNA über die Fähigkeit zur Ligandenauswahl verfügt.

Die Peptidinserts der Phagen wurden schließlich auf Homologien mit dem HXB2-Isolat des HIV-1 mit Hilfe des http://hiv.lanl.gov/cgi-bin/LOCATE_SEQ/multiwheres Alignmentprogramms von *Los Alamos National Laboratory* untersucht. Dabei wurden ausschließlich lineare Übereinstimmungen berücksichtigt. Aufgrund der fehlenden Möglichkeiten konnten jedoch keine Konformationshomologien beurteilt werden, die aber nicht auszuschließen sind. Insgesamt wurden bei 25 von 71 sequenzierten Phagen Homologien zu HIV-1 Proteinen festgestellt (Tabelle 3-15). Dabei entfielen 13 Homologien auf die Ψ - und 12 auf die SL3-Phagen. An dieser Stelle werden nur Klone mit vier übereinstimmenden Aminosäuren vorgestellt. Homologien, die nur 3 Aminosäuren umfassten, werden nicht besprochen. Dies hängt mit der Wahrscheinlichkeit zusammen, mit der mehrere Aminosäuren hintereinander Homologien zu einem Protein zeigen. Die Wahrscheinlichkeit (W) wird nach folgender Formel berechnet:

$$1/20^x \times AS = W$$

Gleichung 3: Formel zu Berechnung der Wahrscheinlichkeit einer Homologie zu einem Protein (x - Anzahl der homologen Aminosäuren, AS - Anzahl der Aminosäuren insgesamt).

wobei x für die Anzahl der homologen Aminosäuren und AS für die Zahl aller Aminosäuren im HIV-1 steht. Die Proteine des HIV-1 bestehen aus ca. 3200 Aminosäuren. Somit liegt die Wahrscheinlichkeit, dass drei Aminosäuren hintereinander homolog zu einem HIV-1 Protein sind, bei 40%. Bei vier homologen Aminosäuren liegt die Wahrscheinlichkeit bei 2%.

Unter den den 25 Phagen wiesen nur drei eine Homologie auf, die 4 Aminosäuren umfasste, wobei zwei davon auf die Spaltprodukte des p55^{Gag}-Polyproteins entfielen. Das TTTP-Motiv (Ψ 1A12.11) ist im p6-Linkerprotein zu finden. Das p6 ist lediglich für die Verpackung des Vpr-Proteins sowie die Rekrutierung des zellulären Tsg101-Proteins zuständig^{10,11}. Die WPSY-Sequenz (Ψ 1A12.21) zeigte Homologie zum p1-Spacerprotein. Beide Proteine sind nicht an der Verpackung der RNA beteiligt. Das LPPL-Motiv (SL3 1A7c.12) findet man im Rev-Protein. Dieses Protein bindet zwar an die virale RNA jedoch an den RRE-Bereich²⁹. Die Tatsache, dass keine

Homologie zu dem nativen Ψ -Liganden, dem NCp7, identifiziert werden konnte, deutet darauf hin, dass keine NCp7-spezifischen Motive für die Bindung des Phagen an die Ψ - bzw. SL3-RNA notwendig sind. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Spezifität eines Peptids nicht nur durch dessen AS-Sequenz, sondern vielmehr durch die Peptidstruktur gegeben ist⁵⁰. Des Weiteren verfügen die Peptide über die Fähigkeit, sich an bestimmte Strukturen anzupassen („induced fit“) und somit als optimaler Bindungspartner zu fungieren^{44,121,122}.

Zur Bestätigung der Bindungsspezifität wurden ausgewählte Phagen auf die Kreuzreaktivität mit der Ψ -RNA sowie den Stammschleifen SL1-3, den Teilabschnitten der Ψ -Region, untersucht (Abbildung 3-12). Zur Kontrolle wurden die CCR5-Kontroll-RNA sowie die SL1-3mut-Fragmente verwendet (Kap.2.1.5). Da die Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan eine zentrale Rolle bei der Bindung des NCp7 an die SL3 der Ψ -Region spielen (Kap.1.4.1)³⁸, fiel die Wahl auf tryptophan- und phenylalaninhaltige Phagen. Dazu zählten die Ψ -Phagen 12.55, 12.3 und 7.5. Theoretisch müssten Phagen, die mit der Ψ -RNA selektioniert wurden, ebenfalls an eine der Stammschleifen-Strukturen binden, da diese Teilabschnitte der Ψ -Region repräsentieren. Dies war auch bei den Phagen 12.3 und 12.55 deutlich zu erkennen. Sie haben mit unterschiedlicher Intensität an alle Ziel-RNA's (Ψ , SL1-3) gebunden. Dass es sich um eine spezifische Bindung handelte, zeigten die Ergebnisse der Bindung an die Kontroll-RNA-Fragmente. So konnte weder eine Bindung an die CCR5- noch an die SL1mut-RNA detektiert werden. Die schwachen Signale bei SL2mut und SL3mut konnten als unspezifisch eingeordnet werden, da die OD-Werte kaum höher (bei SL2mut) als der Ausschlußwert waren bzw. dem gleichen (SL3mut). Die Sequenz des 12.3 Phagen war reich an basischen Aminosäure (H, R) was auf eine unspezifische Bindung hindeutete. Wäre dies der Fall, so müßte der Phage mit ähnlicher Intensität sowohl an die Ziel- als auch die Kontroll-Fragmente binden, was wie bereits erklärt, nicht eingetreten ist. Die stärkste Bindung ergab die Inkubation des Phagen mit der Ψ -RNA, eine etwas schwächere mit der SL3-RNA. Vermutlich hat der Phage sogar an die GGAG-Schleifenregion der SL3 gebunden. Ein Indiz dafür war die Tatsache, dass der Phage an die SL3mut, deren Schleifenregion im Unterschied zur SL3 aus vier Adeninen bestand, nicht gebunden hat (OD-Wert = Ausschlußwert), was anscheinend die Phagenbindung verhinderte. Der Phage 12.3 hat ebenfalls, auch wenn etwas schwächer, an die SL1 und SL2 gebunden. Beide Stammschleifen

enthalten eine GGXG-Sequenz in der Buldge bzw. Schleifenregion. Da die GGXG-Sequenz der GGAG-Sequenz, (SL3) die dieser Phage preferentiell bindet, sehr stark ähnelt (Unterschied von nur einer Base), ist auch die etwas schwächere Bindung zu erklären. Betrachtet man die Aminosäuresequenz des 12.55-Phagen, so könnte man aufgrund des Tryptophans und Phenylalanins ebenfalls eine starke Bindung an die Ψ - und SL3-RNA vermuten. Die Bindung des Phagen war trotz dieser Aminosäuren schwach. Auffällig war jedoch, dass die Bindung sowohl an die Ψ -RNA als auch an die einzelnen Stammschleifen 1-3 gleich stark war. Scheinbar ist in die Bindung die GGXG-Sequenz involviert, die bei allen RNA-Fragmenten vertreten ist. Auch hier konnte von einer spezifischen Interaktion ausgegangen werden, da keine Bindung an die Kontroll-Fragmente detektierbar war. Auch bei dem Phagen 7.5 wurde aufgrund der Aminosäuresequenz (Phenylalanin und Tryptophan) eine starke Bindung an die Ψ - und SL3-RNA vermutet. Die Bindung an die RNA-Fragmente war jedoch sehr schwach. Das Signal lag bei der Ψ - und SL3-RNA nur wenig oberhalb und bei SL1- und SL2-RNA unterhalb des Ausschlußwertes. Der Phage 7.5 hat nicht an die Kontroll-RNA-Fragmente gebunden.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass die Bindung der Ψ -Phagen 12.55 und 12.3 RNA-spezifisch war, da keine Kreuzreaktionen mit den Kontroll-Fragmenten detektiert werden konnten. Herausgestochen durch eine starke Bindung an die Ψ - und SL3 hat der Phage 12.3.

Basierend auf den Ergebnissen des Ψ - und SL3- Biopannings konnten neun Peptidmotive (Tabelle 3-17), die in weiteren Versuchsansätzen auf ihre Affinität zur Ψ -RNA untersucht wurden, identifiziert werden. Bei der Herleitung der Motive wurden nicht nur die Übereinstimmungen der selektionierten Phagenklone untereinander, sondern auch Homologien zu HIV-1-Proteinen, berücksichtigt. Das einzige auf Phagenhomologie basierende Motiv war das HXWPWW, welches durch einen hohen Tryptophananteil sowie ein zentrales Prolin gekennzeichnet war. Die Wahl fiel aus zwei Gründen auf dieses Motiv: einerseits verfügt Tryptophan über interkalierende Eigenschaften, die zur Stabilität und Affinität des Protein-RNA-Komplexes beitragen, andererseits spielt diese AS eine zentrale Rolle bei der Bindung des NCp7-Proteins an die Stammschleife 3 der Ψ -Region (Kap.1.4). Die Position X wurde mit den AS Tryptophan, Prolin, Lysin, Serin, Tryptophan, Histidin belegt. Das zentrale Prolin verursacht einen Knick im hexameren Peptid, wodurch das Peptid die RNA besser umschließen könnte (Seite 126).

Zu den HIV-1-homologen Motiven gehörten TAP- (p24, p6), TTPP- (p6), VPRL- (vif, RT) sowie das APR-Motiv (p7). Zur Bestimmung der Spezifität wurde die Bindung der synthetischen Peptide an Ψ -RNA mittels Peptid-ELISA analysiert (Kap.3.14). Dabei musste bei der Beurteilung der Spezifität nicht nur die Aminosäuresequenz, sondern auch das Motiv als Ganzes betrachtet werden. So verfügen kurze Peptide über die Fähigkeit, unter RNA-Bindung neue Konformationen anzunehmen. Dieser Vorgang wird als adaptive Transition bezeichnet und führt zur Ausbildung eines stabilen Komplexes^{43,44,46}.

Von insgesamt neun getesteten Peptiden, haben vier mit unterschiedlicher Intensität an die Ψ -RNA gebunden. Wurden die Peptide mit der CCR5-Kontroll-RNA inkubiert, so konnte keine Bindung detektiert werden. Somit konnte angenommen werden, dass es sich um eine spezifische Bindung an die Ψ -RNA handelt. Unter den bindenden Peptiden befanden sich zwei tryptophanreiche Motive. Die stärkste Bindung konnte beim HWWPWW-Peptid festgestellt werden, die sich durch das Zusammenspiel der einzelnen Aminosäuren erklären ließ. Durch den hohen Tryptophananteil verfügt das Peptid über interkalierende Eigenschaften, welche die starke Bindung erklären. Zudem wirken sich diese Stapelkräfte stabilisierend auf den Peptid-RNA-Komplex aus. Durch das zentrale Prolin wird ein Knick in das Peptid eingeführt, der die Anpassung und die adaptive Transition erleichtern könnte. Das basische Histidin trägt durch die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem negativen Phosphodiesterückgrad der RNA zur Stärkung der Bindung bei. Diese unspezifischen Interaktionen sind für die Erhöhung der Bindungsstärke von kleinen Liganden an die Ziel-Struktur verantwortlich⁴³. So gesehen müssten alle HXWPWW-Peptide an die Ψ -RNA binden, was jedoch nicht der Fall war. Zwar hat auch das HPWPWW Peptid an die Ψ -RNA gebunden, die Bindung war jedoch deutlich schwächer als die HWWPWW-Bindung. Dies könnte an dem zweiten Prolin, das einen zusätzlichen Knick in das kurze Fragment einführt, liegen. Wie oben erwähnt, benötigen aber kurze Peptide eine gewisse Flexibilität, die es ihnen ermöglicht, sich an die RNA anzupassen. Diese Flexibilität könnte durch das zweite Prolin beeinträchtigt werden. Die restlichen HXWPWW, bei denen die zweite Position durch Serin, Lysin bzw. Histidin besetzt war, haben nicht an die Ψ -RNA gebunden. Somit schien das Tryptophan an der zweiten Position eine wichtige Rolle für die Bindung des Peptids an die RNA zu spielen. Neben den zwei HXWPWW-Peptiden haben auch zwei weitere, mit einer Homologie zu den HIV-1 Proteinen, an die Ψ -RNA gebunden. Zum einen handelte es sich um das

LPPL-Peptid mit einer Rev-Homologie, zum anderen das VPRL-Peptid, das zur Intergrase homolog war. Die Bindung ließ sich jedoch nicht mit dieser Homologie erklären, da beide Proteine nicht an die Ψ -Region der viralen RNA binden¹⁰. Vielmehr basierte die Bindung auf hydrophoben Wechselwirkungen. Erstaunlicherweise hat das DPAPRPR-Peptid (Tabelle 3-15) trotz der Homologie zum NCp7, dem nativen Ψ -Liganden, nicht an die Ψ -RNA gebunden. Anscheinend war die homologe Sequenz von nur 3 Aminosäuren (APR) zu kurz für eine Bindung. Ausserdem sind die APR-Aminosäuren zum N-terminalen Abschnitt des NCp7-Proteins homolog. Dieser ist jedoch für die Stabilisierung der Bindung verantwortlich und nicht in die spezifischen Interaktion involviert³⁸.

Die vier Peptide (HWWPWW, HPWPWW, VRLP, LPPL), die an die Ψ -RNA gebunden haben, wurden anschließend zur weiteren Charakterisierung sowie Ermittlung der Affinität der CD-Spektroskopie unterzogen (Kap.3.17). Zusätzlich konnte auch die Bindung der Peptide an die SL3-RNA untersucht werden, was aufgrund der unzureichenden Länge des Fragments von 20nt mittels des Peptid-ELISA's nicht möglich war. Die Arbeiten wurden bei Prof. Schwalbe im Institut für Organische Chemie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main durchgeführt. Dabei hat sich das HWWPWW-Peptid als dasjenige mit der höchsten Affinität herauskristallisiert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Peptid ebenfalls an das SL3-Fragment bindet, was im Hinblick auf die Entwicklung eines inhibitorischen Moleküls von großer Bedeutung ist (Kap.1.4). Dieses Ergebnis bestätigte die Peptid-ELISA-Ergebnisse, wonach das HWWPWW-Peptid am stärksten an die Ψ -RNA gebunden hat. Die Affinität zur Ψ -RNA lag bei $25 \pm 2\mu\text{M}$ und zur SL3 bei $34 \pm 2\mu\text{M}$ und war somit um den Faktor 1000 niedriger als die Affinität des nativen Ψ -Liganden (NCp7), welche bei $28 \pm 3\text{nM}$ liegt³⁵. Der Grund für die niedrige Affinität könnte vielfältig sein. So stellt sich die Frage, ob ein Peptid von 6 Aminosäuren in der Lage ist, Wechselwirkungen nachzuahmen, die bei der Bindung des nativen Liganden eine essentielle Rolle spielen. Des weiteren bleibt zu klären, ob das Peptid mit gleichen Basen interagiert, die in die Interaktion mit dem nativen Protein involviert sind. Weiterhin müßte geklärt werden, welche Wechselwirkungen neben den Stapelkräften und elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Bindung des HWWPWW-Peptides an die Ψ -RNA eine Rolle spielen.

Eine Möglichkeit für die Selektion von Liganden mit einer höheren Affinität könnte der Einsatz von Zinkfinger Phagen-Banken bieten, die sich als sehr effizient für die Suche nach RNA-Liganden, herausgestellt haben. Wie schon

in früheren Studien gezeigt wurde, kann die Phage-Display-Technologie erfolgreich für die Selektion von Peptidliganden für zelluläre (5 S rRNA) und virale (TAR, RRE) RNA-Strukturen eingesetzt werden. Hierfür wurden jedoch spezielle Phagen-Banken mit bevorzugt basischen oder Zinkfinger-Peptidmotiven eingesetzt. So konnten für das HIV-1 RRE-Element aus einer basischen Phagen-Bank argininreiche Liganden isoliert werden¹⁷¹. Ebenfalls erfolgreich war die Bestimmung der in die Bindung an die 5SrRNA involvierte Aminosäuren des TFIIIA (Transkriptionsfaktor IIIA). Die Zinkfinger exprimierenden Phagen-Banken bestanden jedoch aus Peptidmotiven, die aus dem TFIIIA stammten. So ist es auch nicht verwunderlich, dass so selektierte Liganden eine hohe Affinität zur Zielstruktur hatten, die der Affinität der nativen Liganden sehr nahe kamen¹⁶⁹. Eine Kombination aus speziellen und zufälligen Motiven bot das Biopanning mit Phagen-Banken, deren Peptidmotive sowohl konservierte Zinkfinger motive als auch variable Aminosäure-Positionen enthielten. Das Biopanning lieferte RRE spezifische Liganden, die jedoch keinerlei Homologie zu dem Rev-Protein, dem nativen Liganden, aufwiesen¹⁷⁰. Der Einsatz solcher Phagen-Banken ermöglichte jedoch nur die Selektion sequenzspezifischer Liganden. Da aber in diesem Projekt neben der Sequenzspezifität auch die strukturellen Erkennungsmerkmale im Vordergrund standen, wurden Phagen-Banken mit randomisierten Aminosäuren-Sequenz verwendet. Eine weitere Möglichkeit könnten Phagen-Banken mit einer deutlich höheren Diversität bieten. Wie sich aber bei der Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen herausgestellt hat, führte dies nicht zum gewünschten Erfolg, da immer wieder die gleichen Motive selektiert wurden¹⁵⁸. Ob dies auch für die Untersuchung der RNA-Liganden-Interaktionen gilt, müsste untersucht werden.

Da das HWWPWW-Peptid unter den getesteten Peptiden die höchste Affinität zur Ψ - und SL3-RNA hatte, wurde es im Kompetitions-ELISA eingesetzt. Hierfür wurde das Peptid, wie im Kap.3.15 beschrieben, zunächst mit der Ψ -RNA inkubiert, um anschließend die Bindung mit den nativen Ψ -Liganden p55^{Gag} bzw. NCp7-Protein zu kompetitieren. Zusätzlich wurde als Kompetitor ein irrelevantes RNA-bindendes HIV-1-Protein, der Transaktivator Tat eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit Peptid, aber ohne Protein verwendet. Eine Halbierung der Absorption bedeutete eine 50%-ige Verdrängung des gebundenen Peptids. Aufgrund der niedrigen Affinität des Peptides ($25 \pm 2\mu\text{M}$) zu Ψ -RNA, konnte wie erwartet das Peptid mit dem p55^{Gag}- als auch dem NCp7-Protein kompetitiert werden. Für die Verdrängung

waren jedoch unterschiedliche Konzentrationen der Proteine notwendig. So war eine Halbierung der Absorption schon bei 8,8nM (50ng) des p55^{Gag}-Proteins zu beobachten, wohingegen 20-fach mehr, d.h. 180nM (125ng), NCp7-Proteins benötigt wurden. Eine komplette Verdrängung des Peptids ist bei 22nM (125ng) p55^{Gag} - bzw. 360nM (250ng) NCp7 eingetreten. Dass eine größere Konzentration an NCp7 als p55^{Gag} notwendig war, ist nicht verwunderlich. So ist zwar die NCp7-Domäne des p55^{Gag}-Proteins alleine für die Bindung des Proteins an das Ψ -Verpackungssignal verantwortlich, es gibt jedoch Hinweise, dass das Linkerprotein p2 (C-terminale p55^{Gag}-Domäne, zwischen NCp7 und p6) zur Erkennung der Ψ -Sequenz beiträgt und sich verstärkend auf die Ψ /NCp7-Interaktion auswirkt^{81,84,109}. Da dem hier eingesetzten NCp7-Protein die p2-Domäne fehlte, könnte dies Auswirkungen auf die Affinität haben und die für die Kompetition notwendige NCp7-Proteinmenge erklären. Wie erwartet konnte die Bindung des HWWPWW-Peptids nicht durch das Tat-Protein kompetitiert werden. Dieses Protein bindet zwar die virale RNA, der Bindungsbereich ist jedoch räumlich von der Verpackungssequenz getrennt¹⁰. Auch eine Erhöhung der Tat-Konzentration auf 1 μ g/800nM resultierte nicht in der Verdrängung des Peptids. Zusammenfassend kann man sagen, dass die spezifische Bindung des HWWPWW-Peptids an die Ψ -Region durch die nativen Ψ -Liganden, nicht jedoch durch ein irrelevantes RNA-bindendes Protein kompetitierbar war.

Interessant für die weitere Charakterisierung des HWWPWW-Peptides war auch die Frage, welche Aminosäuren für die Bindung essentiell sind. Zu diesem Zweck wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt, bei der die einzelnen Aminosäure des H¹W²W³P⁴W⁵W⁶-Peptids gegen Alanin (Tabelle 3-18) ausgetauscht wurden. Anschließend wurde die Bindung der mutierten Peptide an die Ψ - und SL3-RNA CD-spektroskopisch analysiert¹⁰⁵. Der Ala-Scan wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Schwalbe im Institut für Organische Chemie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass der Austausch von Tryptophan 2 (W2) bzw. Prolin 4 (P4) in einer höheren Affinität, verglichen mit dem HWWPWW-Peptid, resultierte. Sie lag jedoch weiterhin unter der Affinität des nativen Liganden³⁵. Die Substitution von Histidin 1 (H1), Tryptophan 3 (W3) und Tryptophan 5 (W5) wirkte sich negativ auf die Affinität aus, womit bewiesen wurde, dass diese Aminosäuren essentiell für die Bindung an die Ψ -bzw- SL3-RNA waren. Die Daten belegten, dass die Position der Aminosäure innerhalb des des Motivs eine entscheidende Rolle bei der Affinität und der Bindung spielen. So

konnten mit Hilfe des Ala-Scans zusätzlich zu dem HWWPWW-Peptid zwei weitere, nämlich das HWWAWW- und das HAWPWW-Peptid als potentielle Ψ -Liganden identifiziert werden. Diese drei Peptide sollten in den funktionellen Assays getestet werden.

4.3 Testung spezifischer Peptidliganden auf antivirale Aktivität in der Zellkultur

Im Rahmen des zweiten Abschnitts sollte die antivirale Aktivität der identifizierten Peptide (HWWPWW/ HAWPWW/ HWWAWW) in funktionellen Assays hinsichtlich ihrer inhibitorischen Eigenschaften auf die Verpackung der HIV-1 RNA untersucht werden. In Vorexperimenten wurde in Kooperation mit der AG Stauber (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main) gezeigt, dass das biotinylierte HWWPWW-Peptid nach der Mikroinjektion in 293T-Zellen aufgrund der kleinen Größe innerhalb von 15 Minuten degradierte und nicht mehr detektiertbar war. Somit war das Peptid alleine zu kurzlebig, um seine inhibitorische Wirkung auf die Ψ -NCp7-Interaktion zu entfalten. Aus diesem Grund musste auf ein anderes System zurückgegriffen werden, welches eine hohe Expression und Stabilität des Peptides ermöglichte. Dieses wurde durch die Fusion des Peptides an ein Protein möglich (Kap.3.18). Dabei fiel die Wahl aus zwei Gründen auf das Rfp-Vpr-Protein: zum einen wird durch das Rfp-Protein die Lokalisierung des Fusionproteins erleichtert, zum anderen Verleiht das Vpr-Protein dem Fusionprotein "shuttle"-Eigenschaften, die eine Translokation zwischen Kern und Zytoplasma ermöglichen¹⁰⁶.

Da die Verpackung der viralen RNA über "self assembly" an der Zellmembran stattfindet¹⁰⁷ (Kap.1.4), sollte für eine effektive Inhibition der Ψ -NCp7-Interaktion die Bindung des Peptides an die Ψ -RNA im Zytoplasma bzw. an der Zellmembran erfolgen. Somit war für die erfolgreiche Durchführung der funktionellen Assays, zytoplasmatische bzw. zellmembrannahahe Lokalisation der Peptid-Rfp-Vpr-Fusionproteine entscheidend. Das freie Vpr-Protein ist in infizierten Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern und an der Membran lokalisiert^{114,115}. Durch die Fusion des Vpr-Proteins an ein Markerprotein wird dessen zelluläre Lokalisation jedoch beeinflusst. So führt die N-terminale Kopplung an das Gfp- bzw. Yfp-Protein zu einer Akkumulation des Fusionproteins am Zellkern, die C-terminale Fusion bewirkt dagegen eine Lokalisation im Zellkern¹¹⁰. Wie in der Abbildung 2-9 zu sehen, ist das Vpr-Protein C-terminal an das Rfp-Markerprotein im pF25Rfp-Vpr-Vektor

fusioniert. Wie sich dies auf die Lokalisation des Fusionproteins auswirkt, wurde jedoch noch nicht untersucht. Würde diese Regel auch hier gelten, so müsste das Rfp-Vpr-Fusionprotein im Zellkern vermehrt akkumulieren. Betrachtet man aber die Fluoreszenzaufnahmen der Abbildung 3-18, so fallen schwarze Aussparungen innerhalb der roten Zellen (Rfp-Expression) auf. Es wurde vermutet, dass es sich dabei um Zellkerne handelt, die kein Rfp enthalten und deswegen schwarz erschienen. Da die Rfp-Fluoreszenz aber sehr intensiv war, konnte die genaue Lokalisation des Peptid-Rfp-Vpr-Fusionproteins erst durch eine gezielte Zellkernfärbung (Abbildung 3-19) und Zellmembranfärbung (Abbildung 3-20) bestimmt werden. Die Präparate wurden anschließend im CLSM analysiert. Beim Betrachten der beiden Abbildungen fiel die gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung des Peptid-Rfp-Vpr-Fusionproteins auf. Ein geringer Anteil befand sich aber auch im Zellkern (Abbildung 3-19C), was an der leicht gelblichen Färbung des Areals erkennbar war. Die Fähigkeit der Translokation des Fusionproteins zwischen Zytoplasma und Zellkern ist den "shuttle"-Eigenschaften des Vpr-Proteins zuzuschreiben^{32,106}. Eine Akkumulation direkt an der Zellmembran konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 3-20C). Somit konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Kopplung des Vpr-Proteins an das Rfp-Markerprotein die zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins nicht beeinflusst.

Für die Analyse der antiviralen Eigenschaften in der Zellkultur wurde das 3 Vektoren-System ausgesucht, da es möglichst nah an der Situation in der Zelle ist und sich dennoch leicht handhaben lässt (Kap.2.5.3). Als Testsystem fiel die Wahl auf die HR-YFP-Zelllinie (Kap.2.1.13, AG Grez). Es handelte sich um eine eYfp exprimierende Zelllinie, die von der 293T-Zelllinie abstammt und sich für die Produktion viraler Partikel eignet. Hierfür bedarf es lediglich der transienten Transfektion von zwei Hilfsplasmiden dem pCMV Δ R8.91 (Gag-Pol) und dem pMDG.2 (VSV-G) sowie des Transfergen-Vektors (pF25Peptid-Rfp-Vpr), der das zu untersuchende Peptid enthält (Kap.2.5.3, Kap.3.18). Das Peptid lag als Rfp-Vpr-Fusionprotein vor. Die so produzierten Pseudoviren enthalten das verpackbare Ψ -Yfp-Konstrukt und anteilig das Peptid-Rfp-Vpr-Fusionprotein und können für weitere Untersuchungen genutzt werden. Da in den *in vitro* Experimenten (ELISA Kap.3.14, CD-Spektroskopie Kap.3.17) das GSGSGS-Peptid nicht an die Ψ -RNA gebunden hat, wurde dies auch von dem GSGSGS-Rfp-Vpr-Fusionprotein angenommen. Dementsprechend sollte das GSGSGS-Rfp-Vpr-Fusionprotein die Verpackung der RNA nicht

beeinflussen. Es wurde auch davon ausgegangen, dass auch das Rfp-Vpr-Fusionprotein nicht an die Ψ -RNA bindet und somit keinen Einfluß auf die RNA-Verpackung hat. Somit konnten zur Kontrolle der spezifischen Inhibition das irrelevante GSGSGS- sowie das Rfp-Vpr-Konstrukt eingesetzt werden. Insgesamt wurden sechs verschiedene Pseudoviren, darunter ein Wildtypvirus, zwei Kontrollviren (GS-Rfp-Vpr, Rfp-Vpr) und drei Testviren (HWWPWW, HAWPWW, HWWAWW) generiert (Tabelle 3-19). Der inhibitorische Einfluss der Peptide auf die Verpackung der Ψ -RNA würde dadurch messbar sein, dass Pseudoviren, die in Anwesenheit der HWWPWW/ HAWPWW/ HWWAWW-Rfp-Vpr-Fusionproteine produziert wurden, weniger von dem verpackbaren Ψ -Yfp-Konstrukt enthalten als die gleiche Menge der Kontrollviren (Abbildung 3-17), die in Anwesenheit des GSGSGS-Rfp-Vpr-Kontrollproteins bzw. Rfp-Vpr-Fusionproteins hergestellt wurden. Bei der Herstellung der Test- und Kontrollviren wurden die jeweiligen Transfergen-Vektoren zwischen 1 μ g-7 μ g getitert. Die Konzentration der Hilfsplasmide wurde dabei konstant gehalten (Kap.2.5.4). Anschließend wurde mit Hilfe des Innostest™ HIV Antigen mAb (Innogenetics GmbH, Heiden) die p24-Konzentration, die ein Maß für die generierte Pseudovirusmenge war, bestimmt. Aus den Pseudoviren wurde anschließend die RNA präpariert und deren Konzentration in der Real-time-PCR gemessen.

Bei der Messung der p24-Konzentration (Kap.3.21, Abbildung 3-24) ließen sich jedoch keine Regelmäßigkeiten sowie ein Zusammenhang zwischen der transfizierten Transfergen-Vektormenge und der p24-Konzentration erkennen. Dies wurde am HWWPWW-Ansatz sehr deutlich. So sank zunächst die p24-Konzentration bei der Erhöhung des Transfergen-Vektormenge von 1 μ g auf 2 μ g. Wurde die Transfergen-Vektorkonzentration weiter auf 3 μ g erhöht, so stieg auch die p24-Konzentration. Eine weitere Erhöhung der Transfergen-Vektormenge auf 4 μ g bewirkte eine Reduktion der p24-Menge. Gleiches galt für die HAWPWW-Testviren. Betrachtet man jedoch die p24-Konzentrationen des HWWPWW-Testviren, so war eine leichte Reduzierung der p24-Konzentration bei steigender Konzentration des Transfergen-Vektors zu beobachten. Selbst bei den Kontrollansätzen Rfp-Vpr und GS-Rfp-Vpr wurden unterschiedliche p24-Konzentrationen im Kulturüberstand gemessen. Die p24-Konzentration müsste aber in diesen Ansätzen auch bei steigender Konzentrationen des Transfergen-Vektors gleich bleiben. Da dies jedoch nicht der Fall war und eine Bindung des Fusionproteins an die Ψ -RNA, wie oben bereits erklärt, ausgeschlossen werden konnte, müssen die Gründe andere Ursachen, wie z.B. unterschiedliche Transfektionseffizienz, haben. Somit

lassen diese Ergebnisse keine Rückschlüsse auf die Funktionalität der Peptide zu. Dass man aber nicht schon an der p24-Konzentration den antiviralen Einfluß der Peptide erkennen muss, ist nicht verwunderlich, denn auch in Abwesenheit einer viralen RNA können Viruspartikel produziert werden, was mehrfach gezeigt werden konnte. Dies liegt an der Fähigkeit der NCp7-Domäne des p55^{Gag}-Proteins, andere Nukleinsäuren wie zelluläre mRNA, tRNA oder DNA, falls keine ungepleißte virale RNA vorhanden ist, zu binden und diese zu verpacken^{111,112}. Die so gebildeten Partikel weisen keine morphologischen Unterschiede zu den Wildtyp-Viren auf. Auch konnten leere Viruspartikel beobachtet werden, die dann entstehen wenn keine Nukleinsäure verpackt wird. Sie sind jedoch instabil und zerfallen nach der Freisetzung¹⁰⁸. Ob die im Versuchsansatz generierten Pseudoviren kompakt waren und eine virale oder zelluläre RNA enthielten oder es sich nur um Partikeltrümmer handelte, konnte mit dem p24-Test nicht bestimmt werden, da dieser alle p24-Proteine detektiert. Für die Untersuchung der Morphologie müssten elektronenmikroskopische Aufnahmen herangezogen werden. Für die Bestimmung der RNA-Menge, die in die Pseudoviren verpackt wurde, musste somit auf eine andere Methode, nämlich die Real-time-PCR, zurückgegriffen werden (Kap.2.6). Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung der RNA-Menge. Dabei wurde nur die Menge der Ψ -RNA gemessen. Ob in den Pseudoviren auch zelluläre tRNA oder mRNA verpackt war, wurde nicht untersucht. Der Vergleich der Werte (Testviren) mit einem Referenzwert (Kontrollviren) zeigte, ob die Peptide (inn Form von Fusionproteinen) einen Einfluss auf die Verpackung der Ψ -RNA hatten. Falls die Peptide einen inhibierenden Einfluß auf die Ψ -NCp7-Interaktion und somit die Verpackung der Ψ -RNA hatten, sollte sich dies auf die Konzentration der Ψ -RNA in den Pseudoviren auswirken. Im Falle einer Inhibition, sollte die RNA-Menge in den Testviren geringer sein als die RNA-Menge in den Kontrollviren (Abbildung 3-17). Um Aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, musste für die Präparationen der RNA die gleiche p24-Menge eingesetzt werden. Für die RNA-Präparation wurden 14ng p24 eingesetzt. Die RNA wurde zunächst in cDNA umgeschrieben (Kap.2.6.2) und anschließend in die Real-time-PCR eingesetzt (Kap.2.6.3). Bei der Auswertung wurden die C_T-Werte (threshold cycle, Kap.2.6.4) der Testviren mit Kontrollviren verglichen (Kap.0) und anhand der Gleichung 2 der M-Wert bestimmt. Der M-Wert stand für den Einfluss der Peptide auf die Verpackung der Ψ -RNA, d.h. für die Abnahme der Ψ -RNA-Menge in Vergleich zum (GS-Rfp-Vpr, Rfp-Vpr) Kontrollvirus. Betrachtet man die Ergebnisse der Real-time PCR in der

Abbildung 3-27, so fallen zwei Proben mit einem höheren C_t -Wert auf. Es handelte sich in beiden Fällen um das HWWAWW-Testvirus. Bei dem $1\mu\text{g}$ HWWAWW-Testvirus betrug der C_t -Wert 23,02-Zyklen, was eine Differenz von 6,47-Zyklen im Vergleich zum Rfp-Vpr-Kontrollvirus ($C_t=16,55$) ergab. Bei dem $3\mu\text{g}$ HWWAWW-Testvirus wurde der C_t erst bei dem 28,02-Zyklus durchbrochen, was einer Differenz von 11,85 (Kontrollvirus $C_t=17,35$) entsprach. Somit konnte durch die Erhöhung der Transfergen-Vektormenge von $1\mu\text{g}$ auf $3\mu\text{g}$ die RNA-Menge um 5,6 Zyklen reduziert werden. Der Einfluss des HWWAWW-Peptides auf die Verpackung der Ψ -RNA und somit dessen antiviralen Eigenschaften, wurde aber erst durch den Vergleich der M-Werte deutlich. So konnte eine fast 4000-fache (3691-fache) Reduktion der RNA-Menge in den generierten HWWAWW-Testviren, wenn $3\mu\text{g}$ des Transfergen-Vektors transfiziert wurden, beobachtet werden. Der Einsatz von $1\mu\text{g}$ führte lediglich zu einem M-Wert von 88,64. Dieses Ergebnis bestätigte die CD-spektroskopischen Daten (Kap.3.17), wonach das HWWAWW-Peptid die höchste Affinität zur Ψ -RNA aufwies. Damit stimmen die *in vitro* Ergebnisse mit den Zellkultur-Resultaten überein.

Trotz der niedrigen Affinität des HWWAWW-Peptides zur Ψ -RNA *in vitro* deuten die Real-time-Ergebnisse auf eine spezifische Hemmung der Ψ -NCp7-Interaktion hin, was eine Inhibition der Verpackung der Ψ -RNA zur Folge hatte. D.h. die produzierten Testviren enthielten weniger RNA als die Kontrollviren. Dass es sich um eine gezielte Hemmung handelte, wurde an der RNA-Menge in den Kontrollansätzen (GS-Rfp-Vpr und Rfp-Vpr) noch deutlicher, denn diese ist trotz der Erhöhung der Transfergen-Vektorkonzentration konstant geblieben. Ungewohnt war jedoch die Tatsache, dass keine Hemmung bei dem $2\mu\text{g}$ -Ansatz zu beobachten war. Der Grund hierfür könnte in der Expression des Fusionproteins liegen und müsste nochmals geklärt werden. Eine interessant Beobachtung konnte bei dem HAWPWW-Ansatz gemacht werden. So bewirkte die zunehmende Vektorkonzentration ($2\mu\text{g}$, $3\mu\text{g}$, $6\mu\text{g}$) eine Erhöhung der RNA-Konzentration in den Pseudoviren. Die Klärung dieser Frage steht noch aus. Die Tatsache, dass eine Inhibition trotz der niedrigeren Affinität stattgefunden hat, könnte auf eine Kombination aus spezifischer Bindung und sterischer Hinderung durch das Rfp-Vpr-Fusionprotein zurückzuführen sein. Dies wäre aber nur dann möglich, wenn zuerst das Peptid an die Ψ -Region gebunden hat. War eine Bindung an die Ψ -Region nicht möglich, wie bei den Kontrollviren, so konnte auch keine Inhibition stattfinden.

Basierend auf den hier gezeigten Daten konnte ein Modell zur inhibitorischen Wirkung des HWWAWW-Peptides auf die Ψ -NCp7-Interaktion und somit die Verpackung der viralen RNA aufgestellt werden.

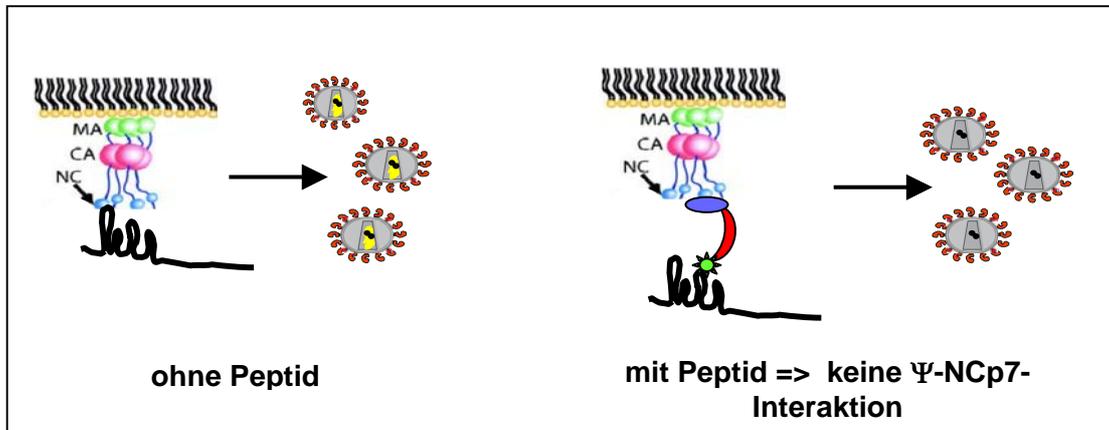


Abbildung 4-1: Mögliches Modell für den Einfluss des HWWAWW-Peptides auf die Ψ -NCp7-Interaktion. Durch den Einsatz des HWWAWW-Rfp-Vpr-Fusionproteins wird die Bindung des NCp7-Proteins an das Ψ -Signal verhindert.

Danach wird durch die Bindung des HWWAWW-Peptids an die Ψ -Sequenz die Ψ -NCp7-Interaktion, die für die Verpackung der viralen RNA entscheidend ist (Kap.1.4), verhindert. Ob die Peptidbindung alleine für die Hemmung verantwortlich ist oder die sterische Hinderung, gegeben durch den Rfp-Vpr-Anteil des Fusionproteins, einen Beitrag leistet, konnte nicht geklärt werden.

4.4 Neue Therapiemöglichkeiten durch Komplementierung der HAART

Die Kontrolle der HIV-1-Replikation durch den Einsatz einer kostengünstigen Wirkstoffen mit minimalen Nebenwirkungen sowie Reduzierung von resistenten Stämmen, ist das langfristige Ziel einer antiviralen Therapie⁴⁰. Die gegenwärtigen Wirkstoffe gehören zu der Klasse der Reverse Transkriptase-, Protease- und Entryinhibitoren und sind in der Lage langfristig die Virusreplikation unter die Nachweisgrenze zu senken^{41,42}. Maximale Erfolge werden durch die Kombinationstherapie (HAART) erzielt, die mehrere voneinander unabhängige Funktionen im Virus angreift^{153,154,155,156}. Dennoch kommt es immer wieder zur Bildung von resistenten Stämmen, die der Therapie entkommen können¹⁵⁷. Somit ist der Bedarf nach neuen Therapieansätzen, die das Problem der Resistenzbildung umgehen, von großer Bedeutung. In der letzten Zeit wurde deshalb verstärkt nach

Substanzen, die sich gegen stark konservierte Strukturen richten, gesucht. Zum einen handelte es sich um das NCp7-Protein, das sich durch zwei Zinkfingerdomänen auszeichnet, zum anderen das Ψ -Signal, das über eine ausgeprägte dreidimensionale Faltung verfügt. Das Zusammenspiel beider Strukturen leitet die Verpackung der viralen RNA in neue Viruspartikel ein³⁸. Somit würden Wirkstoffe, die sich gegen eine der Strukturen richten, eine replikationshemmende Wirkung haben. Dass dies prinzipiell funktioniert, konnte mehrmals gezeigt werden. In einem Fall wurde die virale Replikation durch den Einsatz einer antisense-RNA⁹⁷ bzw. Aminoglycoside^{59,61,62}, die sich gegen die Ψ -Region richteten, unterdrückt werden. Im zweiten Fall konnte die Verpackung der vRNA durch Zinkinhibitoren, die die Zinkfinger motive angreifen, inhibiert werden¹¹⁶. Während die Zinkinhibitoren *in vitro*, im Mausmodell und im Patienten auf ihre Wirkung getestet wurden^{161,172}, konnte die Wirkung der antisense-RNA und der Aminoglycoside nur *in vitro* und Zellkultur bestätigt werden^{162,163}.

Als besonders vielversprechend stellte sich dabei das ADA (Azodicarbonamid), das zur Gruppe der Zinkinhibitoren gehört, heraus. In Kombination mit Reverse Transkriptase- und Proteaseinhibitoren konnte die Viruslast in Patienten, bei denen die konservative HAART-Therapie versagt hat, deutlich reduziert werden. Ein weiterer Erfolg war das Fehlen von Resistenzmutanten, die wohl darauf zurückzuführen war, dass sich der Wirkstoff gegen stark konservierte Regionen richtete. Die Therapie war jedoch mit starken Nebenwirkungen verbunden, die den Einsatz des Wirkstoffes limitieren¹⁶¹. Somit besteht weiterhin ein Bedarf nach neuen Wirkstoffen, deren Nebenwirkungen sich nicht limitierend auf deren Einsatz auswirken. Die niedermolekularen Liganden, die im Projekt vorgestellt wurden (HWWAWW), könnten einen Ausgangspunkt für die Entwicklung von neuen antiviralen Molekülen darstellen. Diese würden natürlich nicht die HAART-Therapie ersetzen können. Sie würden diese aber vielmehr komplementieren und die Bildung von resistenten Stämmen aufgrund der starken Konservierung der Zielstrukturen minimieren. Für das Design eines potentiellen Inhibitors sollte aber die Affinität zur Zielstruktur durch Mutationsanalysen und Filterbindungsstudien sowie weitere Biopanning erhöht werden. Die Aufklärung der molekularen Wechselwirkungen zwischen der Ψ -RNA und ihren Teilelementen SL1-4 und den Liganden über Strukturanalysen sollte zur Optimierung der inhibitorischen Substanzen führen. Zusätzlich sollten die antiviralen Aktivitäten der Liganden als Fusionproteine sowie als Peptid in anderen Testsystemen untersucht werden. Eine Möglichkeit bieten

Peptoide⁴⁶, die aufgrund ihrer Struktur durch die zellulären Enzyme nicht angegriffen werden können und somit langlebiger als kleine Peptide sind.

5 Literaturverzeichnis

1. **Gallo, R. C.** Human retroviruses after 20 years: a perspective from the past and prospects for their future control. *Immunol Rev* 185, 236-65 (2002).
2. **Rowland-Jones, S. L.** Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol* 3, 343-8 (2003).
3. **Barre-Sinoussi, F.** et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-71 (1983).
4. **Gallo, R. C.** et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500-3 (1984).
5. **Weiss, R. A.** Gulliver's travels in HIVland. *Nature* 410, 963-7 (2001).
6. **Hillis, D. M.** AIDS. Origins of HIV. *Science* 288, 1757-9 (2000).
7. **Haseltine, W. A.** Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *Faseb J* 5, 2349-60 (1991).
8. **Turner, B. G. & Summers, M. F.** Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285, 1-32 (1999).
9. **Briggs, J. A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H. G. & Fuller, S. D.** Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J* 22, 1707-15 (2003).
10. **Frankel, A. D. & Young, J. A.** HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67, 1-25 (1998).
- 10a. **Spearman, P., Horton, R., Ratner, L., Kuli-Zade, I.** Membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein in vivo supports a conformational myristyl switch mechanism. *J Virol* 71, 6582-6592 (1997).
11. **Cimarelli, A. & Darlix, J. L.** Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Life Sci* 59, 1166-84 (2002).
12. **Garnier, L., Bowzard, J. B. & Wills, J. W.** Recent advances and remaining problems in HIV assembly. *Aids* 12 Suppl A, S5-16 (1998).
13. **Freed, E. O.** HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26, 13-33 (2001).
14. **Modrow, S.** et al. The gag proteins of human immunodeficiency virus type 1: mechanisms of virus assembly and possibilities for interference. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 183, 177-94 (1994).

15. **Peterlin**, B. M. & Trono, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3, 97-107 (2003).
16. **Huthoff**, H. & Berkhout, B. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA* 7, 143-57 (2001).
17. **Freed**, E. O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251, 1-15 (1998).
18. **Pappalardo**, L., Kerwood, D. J., Pelczer, I. & Borer, P. N. Three-dimensional folding of an RNA hairpin required for packaging HIV-1. *J Mol Biol* 282, 801-18 (1998).
19. **Hamy**, F. et al. An inhibitor of the Tat/TAR RNA interaction that effectively suppresses HIV-1 replication. *PNAS* 94, 3548-53 (1997).
20. **Helga-Maria**, C., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D. An intact TAR element and cytoplasmic localization are necessary for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Virol* 73, 4127-35 (1999).
21. **Das**, A. T., Klaver, B. & Berkhout, B. A hairpin structure in the R region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is instrumental in polyadenylation site selection. *J Virol* 73, 81-91 (1999).
22. **Berkhout**, B., Klaver, B. & Das, A. T. Forced evolution of a regulatory RNA helix in the HIV-1 genome. *Nucleic Acids Res* 25, 940-7 (1997).
23. **Berkowitz**, R., Fisher, J. & Goff, S. P. RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* 214, 177-218 (1996).
24. **Damgaard**, C. K., Dyhr-Mikkelsen, H. & Kjems, J. Mapping the RNA binding sites for human immunodeficiency virus type-1 gag and NC proteins within the complete HIV-1 and -2 untranslated leader regions. *Nucleic Acids Res* 26, 3667-76 (1998).
25. **Remy**, E. et al. The annealing of tRNA^{3Lys} to human immunodeficiency virus type 1 primer binding site is critically dependent on the NCp7 zinc fingers structure. *J Biol Chem* 273, 4819-22 (1998).
26. **Chinen**, J. & Shearer, W. T. Molecular virology and immunology of HIV infection. *J Allergy Clin Immunol* 110, 189-98 (2002).
27. **Gottlinger**, H. G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *PNAS* 86, 5781-5 (1989).

- 27a. **Bryant**, M., Ratner, L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *PNAS* 87, 523-527 (1990).
28. **Hill**, M. K., Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S. M. & Mak, J. Proline residues within spacer peptide p1 are important for human immunodeficiency virus type 1 infectivity, protein processing, and genomic RNA dimer stability. *J Virol* 76, 11245-53 (2002).
29. **Malim**, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V. & Cullen, B. R. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured Ziel sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254-7 (1989).
- 29a **Pollard**, V.W., Malim, M.H. The HIV-1 Rev protein, *Annu.Rev.Microbiol* 52, 491-532 (1998)
30. **Muesing**, M. A., Smith, D. H. & Capon, D. J. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell* 48, 691-701 (1987).
31. **Geyer**, M., Fackler, O. T. & Peterlin, B. M. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep* 2, 580-5 (2001).
32. **Bukrinsky**, M. & Adzhubei, A. Viral protein R of HIV-1. *Rev Med Virol* 9, 39-49 (1999).
33. **Tasara**, T., Hottiger, M. O. & Hubscher, U. Functional genomics in HIV-1 virus replication: protein-protein interactions as a basis for recruiting the host cell machinery for viral propagation. *Biol Chem* 382, 993-9 (2001).
34. **Sodeik**, B. Unchain my heart, baby let me go--the entry and intracellular transport of HIV. *J Cell Biol* 159, 393-5 (2002).
35. **Shubsda**, M. F., Paoletti, A. C., Hudson, B. S. & Borer, P. N. Affinities of packaging domain loops in HIV-1 RNA for the Nukleokapsid protein. *Biochemistry* 41, 5276-82 (2002).
36. **Goldfarb**, D. S. HIV-1 virology. Simply Marvelous nuclear transport. *Curr Biol* 5, 570-3 (1995).
37. **Gottlinger**, H. G. The HIV-1 assembly machine. *AIDS* 15 Suppl 5, S13-20 (2001).
38. **De Guzman**, R. N. et al. Structure of the HIV-1 Nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* 279, 384-8 (1998).

39. **Sonza**, S. et al. Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 15, 17-22 (2001).
40. **Mindel**, A. & Tenant-Flowers, M. ABC of AIDS: Natural history and management of early HIV infection. *BMJ* 322, 1290-3 (2001).
41. **Hildinger**, M. et al. Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J Virol* 75, 3038-42 (2001).
42. **De Clercq**, E. New anti-HIV agents and Ziels. *Med Res Rev* 22, 531-65 (2002).
43. **Chow**, C. S. & Bogdan, F. M. A Structural Basis for RNAMinutenus signLigand Interactions. *Chem Rev* 97, 1489-1514 (1997).
44. **Patel**, D. J. Adaptive recognition in RNA complexes with peptides and protein modules. *Curr Opin Struct Biol* 9, 74-87 (1999).
45. **Hermann**, T. & Patel, D. J. Stitching together RNA tertiary architectures. *J Mol Biol* 294, 829-49 (1999).
46. **Frankel**, A. D. Fitting peptides into the RNA world. *Curr Opin Struct Biol* 10, 332-40 (2000).
47. **Pantopoulos**, K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1012, 1-13 (2004).
48. **Cech**, T. R. Ribozymes, the first 20 years. *Biochem Soc Trans* 30, 1162-6 (2002).
49. **Campisi**, D. M., Calabro, V. & Frankel, A. D. Structure-based design of a dimeric RNA-peptide complex. *Embo J* 20, 178-86 (2001).
50. **Draper**, D. E. Themes in RNA-protein recognition. *J Mol Biol* 293, 255-70 (1999).
51. **Hermann**, T. & Westhof, E. Non-Watson-Crick base pairs in RNA-protein recognition. *Chem Biol* 6, R335-43 (1999).
52. **Murchie**, A. I. et al. Structure-based drug design Zieling an inactive RNA conformation: exploiting the flexibility of HIV-1 TAR RNA. *J Mol Biol* 336, 625-38 (2004).
53. **Schiavone**, N., Donnini, M., Nicolin, A. & Capaccioli, S. Antisense oligonucleotide drug design. *Curr Pharm Des* 10, 769-84 (2004).
54. **Roberts**, R. W. & Szostak, J. W. RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *PNAS* 94, 12297-302 (1997).
55. **Suheck**, S. J. & Wong, C. H. RNA as a Ziel for small molecules. *Curr Opin Chem Biol* 4, 678-86 (2000).
56. **Sullenger**, B. A. & Gilboa, E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature* 418, 252-8 (2002).

57. **Famulok**, M., Mayer, G. & Blind, M. Nucleic acid aptamers-from selection *in vitro* to applications *in vivo*. *Acc Chem Res* 33, 591-9 (2000).
58. **Teunissen**, S. W., Stassen, M. H., Pruijn, G. J., van Venrooij, W. J. & Hoet, R. M. Characterization of an anti-RNA recombinant autoantibody fragment (scFv) isolated from a phage display library and detailed analysis of its binding site on U1 snRNA. *RNA* 4, 1124-33 (1998).
59. **Succheck**, S. J., Greenberg, W. A., Tolbert, T. J. & Wong, C. H. Design of Small Molecules That Recognize RNA: Development of Aminoglycosides as Potential Antitumor Agents That Target Oncogenic RNA Sequences This work was supported by the NIH. We thank Professor Peter Voght for his suggestion of the oncogenic RNA sequences as targets. *Angew Chem Int Ed Engl* 39, 1080-1084 (2000).
60. **Hwang**, S. et al. Inhibition of gene expression in human cells through small molecule-RNA interactions. *PNAS* 96, 12997-3002 (1999).
61. **Hendrix**, M., Priestley, E. S., Joyce, G. F. & Wong, C. H. Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance. *J Am Chem Soc* 119, 3641-8 (1997).
62. **Tor**, Y., Hermann, T. & Westhof, E. Deciphering RNA recognition: aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme. *Chem Biol* 5, R277-83 (1998).
63. **Walter**, F., Vicens, Q. & Westhof, E. Aminoglycoside-RNA interactions. *Curr Opin Chem Biol* 3, 694-704 (1999).
64. **Hermann**, T. Strategies for the Design of Drugs Targeting RNA and RNA-Protein Complexes. *Angew Chem Int Ed Engl* 39, 1890-1904 (2000).
65. **Wang**, S., Huber, P. W., Cui, M., Czarnik, A. W. & Mei, H. Y. Binding of neomycin to the TAR element of HIV-1 RNA induces dissociation of Tat protein by an allosteric mechanism. *Biochemistry* 37, 5549-57 (1998).
66. **Friesen**, W. J. & Darby, M. K. Specific RNA binding by a single C2H2 zinc finger. *J Biol Chem* 276, 1968-73 (2001).
67. **Cimarelli**, A., Sandin, S., Hoglund, S. & Luban, J. Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 Nucleokapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *J Virol* 74, 3046-57 (2000).
68. **Hayashi**, T., Shioda, T., Iwakura, Y. & Shibuta, H. RNA packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 188, 590-9 (1992).
69. **Pornillos**, O., Garrus, J. E. & Sundquist, W. I. Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol* 12, 569-79 (2002).

70. **Amarasinghe**, G. K. et al. Stem-loop SL4 of the HIV-1 psi RNA packaging signal exhibits weak affinity for the Nukleokapsid protein. structural studies and implications for genome recognition. *J Mol Biol* 314, 961-70 (2001).
71. **Clever**, J., Sasseti, C. & Parslow, T. G. RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 69, 2101-9 (1995).
72. **Harrison**, G. P., Miele, G., Hunter, E. & Lever, A. M. Functional analysis of the core human immunodeficiency virus type 1 packaging signal in a permissive cell line. *J Virol* 72, 5886-96 (1998).
73. **Clever**, J. L. & Parslow, T. G. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J Virol* 71, 3407-14 (1997).
74. **Shen**, N., Jette, L., Liang, C., Wainberg, M. A. & Laughrea, M. Impact of human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization on viral infectivity and of stem-loop B on RNA dimerization and reverse transcription and dissociation of dimerization from packaging. *J Virol* 74, 5729-35 (2000).
75. **Amarasinghe**, G. K. et al. NMR structure of the HIV-1 Nukleokapsid protein bound to stem-loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *J Mol Biol* 301, 491-511 (2000).
76. **McBride**, M. S. & Panganiban, A. T. Position dependence of functional hairpins important for human immunodeficiency virus type 1 RNA encapsidation in vivo. *J Virol* 71, 2050-8 (1997).
77. **Paoletti**, A. C., Shubsda, M. F., Hudson, B. S. & Borer, P. N. Affinities of the Nukleokapsid protein for variants of SL3 RNA in HIV-1. *Biochemistry* 41, 15423-8 (2002).
78. **Hagan**, N. & Fabris, D. Direct mass spectrometric determination of the stoichiometry and binding affinity of the complexes between Nukleokapsid protein and RNA stem-loop hairpins of the HIV-1 Psi-recognition element. *Biochemistry* 42, 10736-45 (2003).
79. **Sakuragi**, J., Ueda, S., Iwamoto, A. & Shioda, T. Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus type 1 genome RNA packaging. *J Virol* 77, 4060-9 (2003).
80. **Khandogin**, J., Musier-Forsyth, K. & York, D. M. Insights into the regioselectivity and RNA-binding affinity of HIV-1 Nukleokapsid protein from linear-scaling quantum methods. *J Mol Biol* 330, 993-1004 (2003).

81. **Berkowitz**, R. D., Luban, J. & Goff, S. P. Specific binding of human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein and Nukleokapsid protein to viral RNAs detected by RNA mobility shift assays. *J Virol* 67, 7190-200 (1993).
82. **Turpin**, J. A. et al. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 zinc fingers prevent normal processing of gag precursors and result in the release of noninfectious virus particles. *J Virol* 70, 6180-9 (1996).
83. **Rice**, W. G. et al. Inhibition of multiple phases of human immunodeficiency virus type 1 replication by a dithiane compound that attacks the conserved zinc fingers of retroviral Nukleokapsid proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 419-26 (1997).
84. **Schmalzbauer**, E., Strack, B., Dannull, J., Guehmann, S. & Moelling, K. Mutations of basic amino acids of NCp7 of human immunodeficiency virus type 1 affect RNA binding *in vitro*. *J Virol* 70, 771-7 (1996).
85. **Burniston**, M. T., Cimorelli, A., Colgan, J., Curtis, S. P. & Luban, J. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the Nukleokapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J Virol* 73, 8527-40 (1999).
86. **Vuilleumier**, C. et al. Nucleic acid sequence discrimination by the HIV-1 Nucleocapsid protein NCp7: a fluorescence study. *Biochemistry* 38, 16816-25 (1999).
87. **Zeffman**, A., Hassard, S., Varani, G. & Lever, A. The major HIV-1 packaging signal is an extended bulged stem loop whose structure is altered on interaction with the Gag polyprotein. *J Mol Biol* 297, 877-93 (2000).
88. **Maki**, A. H., Ozarowski, A., Misra, A., Urbaneja, M. A. & Casas-Finet, J. R. Phosphorescence and optically detected magnetic resonance of HIV-1 Nucleocapsid protein complexes with stem-loop sequences of the genomic Psi-recognition element. *Biochemistry* 40, 1403-12 (2001).
89. **Khan**, R. & Giedroc, D. P. Nucleic acid binding properties of recombinant Zn²⁺ HIV-1 Nucleocapsid protein are modulated by COOH-terminal processing. *J Biol Chem* 269, 22538-46 (1994).
90. **Ono**, A., Demirov, D. & Freed, E. O. Relationship between human immunodeficiency virus type 1 Gag multimerization and membrane binding. *J Virol* 74, 5142-50 (2000).

91. **Huang**, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* 69, 6810-8 (1995).
92. **Goila-Gaur**, R., Demirov, D. G., Orenstein, J. M., Ono, A. & Freed, E. O. Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol* 77, 6507-19 (2003).
93. **Demirov**, D. G., Ono, A., Orenstein, J. M. & Freed, E. O. Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *PNAS* 99, 955-60 (2002).
94. **Gottlinger**, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *PNAS* 88, 3195-9 (1991).
95. **Vogt**, V. M. Ubiquitin in retrovirus assembly: actor or bystander? *PNAS* 97, 12945-7 (2000).
96. **Demirov**, D. G., Orenstein, J. M. & Freed, E. O. The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. *J Virol* 76, 105-17 (2002).
97. **Chadwick**, D. R. & Lever, A. M. Antisense RNA sequences targeting the 5' leader packaging signal region of human immunodeficiency virus type-1 inhibits viral replication at post-transcriptional stages of the life cycle. *Gene Ther* 7, 1362-8 (2000).
98. **Konigs**, C. et al. Monoclonal antibody screening of a phage-displayed random peptide library reveals mimotopes of chemokine receptor CCR5: implications for the tertiary structure of the receptor and for an N-terminal binding site for HIV-1 gp120. *Eur J Immunol* 30, 1162-71 (2000).
99. **Agris**, P. F. et al. Experimental models of protein-RNA interaction: isolation and analyses of tRNA(Phe) and U1 snRNA-binding peptides from bacteriophage display libraries. *J Protein Chem* 18, 425-35 (1999).
100. **Hoffmann**, S. & Willbold, D. A selection system to study protein-RNA interactions: functional display of HIV-1 Tat protein on filamentous bacteriophage M13. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 806-11 (1997).
101. **Friesen**, W. J. & Darby, M. K. Phage display of RNA binding zinc fingers from transcription factor IIIA. *J Biol Chem* 272, 10994-7 (1997).

102. **Smith**, G. P. & Scott, J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 217, 228-57 (1993).
103. **Scott**, J. K. Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem Sci* 17, 241-5 (1992).
104. **Smith**, G. P. & Petrenko, V. A. Phage Display. *Chem Rev* 97, 391-410 (1997).
105. **Pustowka**, A., Dietz, J., Ferner, J., Baumann, M., Landersz, M., Königs, C., Schwalbe, H., Dietrich, U. Identification of peptide ligands for Ziel RNA structures derived from the HIV-1 packaging signal psi by screening phage-displayed peptide libraries. *Chembiochem* 4, 1093-7 (2003).
106. **Sherman**, M. P., de Noronha, C. M., Heusch, M. I., Greene, S. & Greene, W. C. Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 75, 1522-32 (2001).
107. **Nguyen**, D. H. & Hildreth, J. E. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* 74, 3264-72 (2000).
108. **Wang**, S. W. & Aldovini, A. RNA incorporation is critical for retroviral particle integrity after cell membrane assembly of Gag complexes. *Virology* 76, 11853-65 (2002).
109. **Kaye**, J. F. & Lever, A. M. Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 RNA: a possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation. *J Virol* 72, 5877-85 (1998).
110. **Waldhuber**, M. G., Bateson, M., Tan, J., Greenway, A. L. & McPhee, D. A. Studies with GFP-Vpr fusion proteins: induction of apoptosis but ablation of cell-cycle arrest despite nuclear membrane or nuclear localization. *Virology* 313, 91-104 (2003).
111. **Aldovini**, A. & Young, R. A. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol* 64, 1920-6 (1990).
112. **Muriaux**, D., Mirro, J., Harvin, D. & Rein, A. RNA is a structural element in retrovirus particles. *PNAS* 98, 5246-51 (2001).
113. **Famulok**, M., Szostak, J.W., Stereospecific recognition of Tryptophane agarose by in-vitro selected RNA. *J Am Chem Soc* 114, 3990- (1992)
114. **Vodicka**, M.A., Koepf, D.M., Silver, P.A. Emerman, M., HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev* 12, 175-185 (1998).

115. **DiMarzio**, P., Choe, S., Ebright, M., Knoblauch, R., Landau, N.R., Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 69, 7909-7916 (1995).
116. **Kim**, M.Y., Joeng, S., Inhibition of the function of the Nukleokapsid protein of human immunodeficiency virus-1 by an RNA aptamer, *Biochem Biophys Res Commun.* 320, 1181-1186 (2004).
117. **Isel**, C., Ehresmann, C., Keith, G., Ehresmann, B. & Marquet, R. Initiation of reverse transcription of HIV-1: secondary structure of the HIV-1 RNA/tRNA(3Lys) (template/primer). *J Mol Biol* 247, 236-50 (1995).
118. **Calnan**, B. J., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D. & Frankel, A. D. Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science* 252, 1167-71 (1991).
119. **Kjems**, J., Calnan, B.J., Frankel, A.D., Sharp, P. A. Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev. *EMBO* 11, 1119-1129 (1992).
120. **Puglisi**, J.D., Tan, R., Calnan, B.J., Frankel, A.D., Williamson, J.R. Conformation of the Tar RNA-arginine complex by NMR. *RNA-Protein Interactions*, 193-220 (1994).
121. **Weiss**, M.A. RNA-mediated signaling in ranscription. *Nat Struct Biol* 5, 329-222 (1998).
122. **Grate**, D. Wilson, C. Role REVersal: understanding how RRE RNA binds its peptide ligand. *Structure* 5, 7-11 (1997).
123. **Telesnitsky**, A., Goff, S.P., Reverse Transcription and the generation of retroviral DNA. *Cold Spring Harbor*, 121-160 (1997).
124. **Miller**, M.D., Farnet, C.M., Bushman, F.D. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71, 5382-5390 (1997).
125. **Chan**, D.C., Fass, D., Berger, J.M. Kim, P.s. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-273 (1997).
126. **Foti**, M., Mangasarian, A., Piguet, V., Lew, D.P., Krause, K.H., Trono, D., Carpentier, J.L. Nef-mediated clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 139. 8263-8269 (1997).
127. **Le Gall**, S., Erdthmann, L., Benichou, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L., Benarous, R., Heard, J.M., Schwartz, O. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC 1 molecules. *Cell* 83, 379-388 (1995).

128. **Margottin**, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K., Benarous, R. A novel human WD protein, h-beta TrCp that interacts with the HIV-1 vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1, 565-574 (1998).
129. **Wei**, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., Jones, K.A. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR-RNA. *Cell* 92, 451-462 (1998).
130. **Reines**, D., Conaway, J.W., Conaway, R.C. The RNA polymerase II general elongation factors. *Biochem Sci* 9, 351-355 (1996).
131. **Malim**, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V., Cullen, B.R., The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254-257 (1989).
132. **Daly**, T. J., Cook, K.S., Gran, G.S., Maione, T.E., Rusche, J.R. Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-response element *in vitro*. *Nature* 342.816-819 (1989).
133. **Brown**, P.O. Integration, in retroviruses vol.1, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 161-203 (1997).
134. **Jacks**, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J., Varmus, H.E., Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331. 280-283 (1988).
135. **Le Grice**, S. F., Naas, T., Wohlgensinger, B. & Schatz, O. Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J* 10, 3905-11 (1991).
136. **Kohlstaedt**, L.A., Wang, J., Rice, P.A., Friedmann, J.M., Steitz, T.A. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256, 1783-1790 (1992).
137. **Hamy**, F., Felder, E.r., Heizmann, G., Lazdins, J., Aboui-Ela, F., Varani, G., Karn, J., Klimkait, T. An inhibitor of the Tat/Tar RNA interaction that effectively suppresses HIV-1 replication. *PNAS* 94, 3548-3553 (1997).
138. **Berkhout**, B., Structure and function Human Immunodeficiency Virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54,1-34 (1996).
139. **Berger**, E.A., Murphy, P.M., Farber, J.M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism and disease, *Ann Rev Immunol* 17,657-700 (1999).

140. **Doms**, R.W., Peiper, S.C. Unwelcomed guests with master keys: How HIV-1 uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 235, 179-190 (1997).
141. **O'Brien**, W.A., Koyanagi, Y., Namazie, A. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be deterMinuted by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* 348, 69-73 (1990).
142. **Freed**, E. O., Martin, M.A. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection, *J Biol Chem* 270, 23883-23886 (1995).
143. **Lu**, M., Blacklow, S.C., Kim, P.S. An trimeric structural domainof the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Natur Struct Biol.* 2, 1075-1082 (1995).
144. **Leonard**, C.K., Spellmann M.W., Riddle,L., Harris, R.J., Thomas, J.N., Gregory, T.J., Assignment of intrachain disulfide bondsand characterization of potetial glyh type 1 recombinant immunodeficiency virus envelope glycosalation sites of the envelope glycoprotein (gp120). *Biol Chem* 265, 10373-10382 (1990).
145. **Debouck**, C., Gorniak, J.G., Strickler, J.E., Meek, T.D., Metcalf, B.W., Rosenberg, M. Human immunodeficiency virus protease expressed in *E.coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *PNAS* 84, 8903-8906 (1987).
146. **Vigna**, E., Naldini, L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental genetransfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2, 1-9 (2000).
147. **Scherr**, M., Eder, M. Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells Using Lentiviral Vectors. *Current Gene Therapy* 2, 45-55 (2002).
148. **Mangeat**, B., Turelli, P., Caron, G., Friedelli, M., Perrin, M.,Trono, D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103 (2003).
149. **Mariani**, R., Chen, D., Schröfelbauer, B., Navarro, F., König,R., Bollman, B., Münk, C., Nymark-McMahon, H., Landau, N. Species-Specific Exclusion of APOBEC3G from HIV-1Virions by Vif, *Cell* 114, 21-31 (2003).
150. **Garber**, M.E., Wie, P., Jones, K.A. HIV-1 Tat interacts with cyclin T1 to direct the P-TEFb CTDkinase complex to TAR RNA. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 63, 371-380 (1998).
151. **Karn**, J. Tracking Tat. *J.Mol.Biol* 293, 235-254 (1999).

152. **Goff**, S. P. Death by Deamination: A Novel Host Restriction System for HIV-1, *Cell* 114, 281-283 8 (9003).
153. **Briggs**, J.A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.G. & Fuller, S.D. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J* 22, 1707-1715 (2003).
154. **Palella**, F. J., Jr. et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338, 853-60 (1998).
155. **Lucas**, G. M., Chaisson, R. E. & Moore, R. D. Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic: risk factors for virologic failure and adverse drug reactions. *Ann Intern Med* 131, 81-7 (1999).
156. **Zhang**, L. et al. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 340, 1605-13 (1999).
157. **Paredes**, R., Clotet, B. New antiretroviral drugs and approaches to HIV treatment. *AIDS* 17, 85-96 (2003).
158. **Sidhu**, S. S., Fairbrother, W.J., Deshayes, K. Exploring protein: Protein Interactions with Phage Display. *ChemBioChem* 4, 14-25 (2003).
159. **Lochrie**, M. A. et al. *In vitro* selection of RNAs that bind to the human immunodeficiency virus type-1 gag polyprotein. *Nucleic Acids Res* 25, 2902-10 (1997).
160. **Berglund**, J. A., Charpentier, B. & Rosbash, M. A high affinity binding site for the HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res* 25, 1042-9 (1997).
161. **Goebel**, F.D., Hemmer, R., Schnit, J-C., Bogner, J.R., de Clerq, E., Witvrouw, M., Pannecouque, C., Valeyev, R., Vandevelde, M., Margery, H., Tassignon, J-P. Phase I/II does escalation and randomized withdrawal study with add-on azodicarbonamid in patients failing on current therapy, *AIDS* 15, 33-45 (2001).
162. **Sullivan**, J. M., Goodisman, J. & Dabrowiak, J. C. Absorption studies on aminoglycoside binding to the packaging region of human immunodeficiency virus type-1. *Bioorg Med Chem Lett* 12, 615-8 (2002)
163. **McPike**, M. P., Goodisman, J. & Dabrowiak, J. C. Footprinting and circular dichroism studies on paromomycin binding to the packaging region of human immunodeficiency virus type-1. *Bioorg Med Chem* 10, 3663-72 (2002).

164. **Berkowitz**, R.D., Ohagen, A., Hoglund, S. & Goff, S. P. Retroviral nucleocapsid domains mediate the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging in vivo. *J Virol* 69, 6445-56 (1995). Ohagen, S., Hoglund, S., Goff, S.P.(1995).
165. **Ottmann**, M., Gabus, C., Darlix, J. The central globular domain of the nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus type 1 is critical for viral structure and infectivity. *J Gen Virol* 69, 1778-1984 (1995).
166. **Luban**, J. & Goff, S. P. Binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA to recombinant HIV-1 gag polyprotein. *J Virol* 65, 3203-12 (1991).
167. **Shubsda**, M. F., Kirk, C. A., Goodisman, J. & Dabrowiak, J. C. Binding of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein to psi-RNA-SL3. *Biophys Chem* 87, 149-65 (2000).
168. **Fisher**, R. J. et al. Sequence-specific binding of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein to short oligonucleotides. *J Virol* 72, 1902-9 (1998).
169. **Friesen**, W.J., Darby, M.K. Phage Display of RNA Binding Zinc Fingers from Transcription Factor IIIA. *J B C* 272, 10994-10997 (1997).
170. **Friesen**, W.J., Darby, M.K. Specific RNA binding proteins constructed from zinc fingers. *Nat Struc Biol* 5, 543-546 (1998).
171. **Harada**,K., Martin, S:S.; Tan,R., Frankel,A.D. Molding a peptide into an RNA site by *in vivo* peptide evolution, *PNAS* 94, 11887-11892 (1997).
172. **Schito**, M.L., Goel, A., Song, Y., Inman, J.K., Fattah, R.J., Rice, W.G., Turpin, J.A., Sher, A., Appela, E. *In vivo* Antiviral Activity of Novel Human Immunodeficiency Virus Type I Zinc finger Inhibitors Nucleocapsid p7 in a Transgenic Murine Model. *AIDS Research and Human Retroviruses* 19, 91-101 (2003).

5.1 Eigene Veröffentlichungen

5.1.1 Publikationen

Pustowka, A., Dietz, J., Ferner, J., Baumann, M., Landersz, M.; Königs, C., Schwalbe, H., Dietrich, U. „ Identification of peptide ligands for Ziel RNA derived from the HIV-1 packaging signal Ψ by screening phage-displayed peptide libraries” CheBioChem 4, 1093-1097 (2003)

5.1.2 Poster

Pustowka, A., Landersz, M., Dietrich, U. „ Identification of peptide ligands for the packaging structure psi of HIV-1“, XIV International AIDS Conference Barcelona 2002

Pustowka, A.; Landersz, M., Dietz, J., Baumann, M., Schwalbe, H., Dietrich, U. „ Identification of peptide ligands für the packaging structure psi ofHIV-1“, Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Hamburg 2003

Pustowka, A., Landersz, M., Dietz, J., Baumann, M., Schwalbe, H., Dietrich, U. “Identification of peptide ligands for RNA elements of the packaging structure psi of HIV-1 using phage display peptide libraries“, Structure , function and dynamics of RNA-protein complexes, Göttingen 2003

Pustowka, A., Dietz, J., Ferner, J., Baumann, M., Landersz, M., Königs, C., Schwalbe, H., Dietrich, U. “Identification of peptide ligands for Ziel RNA structures derived from the HIV-1 packaging signal psi by phage display technology”, RNA Structure, Function and Ligand Interaction Niederursel 2003

Pustowka, A, Dietz, J., Landersz, M., Baumann, M., Ferner, J., Schwalbe, H., Dietrich, U. “Identification of peptideligands for the packaging structure PSI of HIV-1“, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 17-20 März 2004 Tübingen

Pustowka, A., Dietz, J., Landersz, M., Baumann, M., Ferner, J., Schwalbe, H., Dietrich, U. "Identification of peptideligands for the packaging structure PSI of HIV-1", Ninth Annual Meeting of the RNA Society 2004, Madison, USA

Pustowka, A., Dietz, J., Ferner, J., Baumann, M., Landersz, M., Königs, C., Schwalbe, H., Dietrich, U. "Identification of peptideligands for the packaging structure PSI of HIV-1", XV International AIDS Conference Bangkok 2004

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abs	Absorption
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	Acquired Immundeficiency Syndrome
Ampl	Amplifikation
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARM	Arginine rich motifs
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytidin
CA	Kapsidprotein
CD	circular dichroism
cDNA	komplementäre DNA
CLSM	konfokales Leserraster Mikroskop
CMV	Zytomegalievirus
C _t	Threshold cycle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nukleotidtriphosphat
ds	dopplesträngig
<i>E.coli</i>	Escherichia Coli
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Em	Emission
ER	endoplasmatisches Reticulum
G	Guanin
g	Gramm
Gfp	green fluorescence protein
gp	Glycoprotein
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus -1
HRP	horse raddish peroxidase

IN	Integrase
IPTG	Isopropyl- β -Dthiogalactosid
kb	Kilobasen
K_D	Dissoziationskonstante
l	Liter
LB	Luria-Bertrani-Medium
LTR	long terminal repeat
mM	Millimol
MOPS	3-[Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
mut	mutiert
mV	Millivolt
NC	Nukleokapsidprotein
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
p	Plasmid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qPCR	quantitative PCR
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
pM	Pikomol
PSI (Ψ)	HIV-1 Verpackungssignal
R	repeat
Rfp	red fluorescence protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	round per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-time PCR
SD	Spleissdonor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
SL	Stammschleife
snRNP	small nuclear Riboprotein
ss	einzelsträngig

TAE	Trisacetat Puffer
TAR	transactivation response
TBE	Tris-HCl-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered Saline
T _m	Schmelztemperatur
tRNA	transfer-RNA
U	Unit
U	Unique
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volume
WT	Wildtyp
Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indonyl-β-D-galactosid
Yfp	yellow fluorescence protein
ZF	Zinkfinger
Zn	Zink
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

7 Anhang

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Berd Groner für die Möglichkeit diese Arbeit im Georg-Speyer-Haus anfertigen zu können. Ebenso danke ich Prof. Dr. Ludwig für die Übernahme der Betreuung seitens der Fakultät.

Bei Frau Dr. U. Dietrich bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Betreuung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bedanken möchte ich mich bei Margot Landersz für die tolle Zusammenarbeit und unermüdliche Hilfe bei Problemen.

Auch möchte ich mich bei Michael Humbert, Julia Dietz und Sascha Antoni für allzeit gute Atmosphäre und die Kaffeepausen bedanken.

Hana Kunkel danke ich für die kompetente und unermüdliche Hilfe in der Zellkultur.

Vielen herzlichen Dank an meine Familie, besonders meine Eltern, die mich während der gesamten Zeit moralisch unterstützt haben und mir immer Mut gemacht haben wenn es nicht so gut lief.

Ganz besonders möchte ich mich bei Patrick für die schnelle und genaue Durchsicht dieser Arbeit bedanken. Auch wenn Du nicht immer meinen Auführungen folgen konntest, hast Du stets aufmerksam zugehört. Danke.

Lebenslauf

Name: Anette Pustowka

Adresse: Am Grauen Berg 23a, 63571 Gelnhausen
Tel. 06051/968890
e-Mail: anetka28@yahoo.de

geboren: 24.03.1973 Teschen (Polen)

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1980 – 06/1987 Volksschule in Teschen/Polen
08/1987 – 01/1988 Hasselbachschule in Hasselroth
02/1988 – 06/1994 Hohe Landesschule (Gymnasium) in Hanau
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/1994 – 10/1996 Grundstudium der Biologie an der J.W.-Goethe Universität Frankfurt/M.

10/1996 Vordiplom der Biologie

10/1996 – 06/1999 Hauptstudium der Biologie mit dem Hauptfach Biochemie und den Nebenfächern Humangenetik, Mikrobiologie, Zoologie

07/1999 Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Mikrobiologie, Zoologie

08/1999 – 06/2000 Diplomarbeit, Titel: "Gezielte Mutagenese des menschlichen Chemokinrezeptors CCR5 zur Bestätigung von Antikörper-Epitopen"

10/2000 – 09/2004 Doktorarbeit am Georg-Speyer-Haus unter Betreuung von Dr.U. Dietrich, Titel: "Identifizierung von Peptidliganden für funktionelle RNA-Strukturen über Screening von Phage-Display-Banken"

berufsbezogene Tätigkeiten

01/2002 – 03/2002 Macfarlane Burnet Centre for Medical Research Melbourne/ Australia im Rahmen einer Kooperation

Stipendien

01/2002-03/2002 Boehringer Ingelheim Fonds, Travel Allowances
07/2004 AIDS 2004-Interantional Scholarship Program

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main, den 27.09.2004

Anette Pustowka