

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Apotheker Martin Kirst

aus: Schlüchtern

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

**Herstellung und Charakterisierung eines
anti-HIV-Inhibitors
basierend auf modifiziertem Serum Albumin**

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich

Prof. Dr. Herbert Schmitz

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VII
Abstract	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das humane Immundefizienzvirus und AIDS - ein weltweites Problem	1
1.2 Übersicht über die in der HIV-Therapie eingesetzten antiviralen Pharmaka	2
1.3 Pharmakologie der antiviralen Substanzen	4
1.3.1 Reverse-Transkriptase-Inhibitoren	4
1.3.2 Protease-Inhibitoren	5
1.3.3 <i>Entry</i> -Inhibitoren	6
1.4 Neue <i>Entry</i> -Inhibitoren	9
1.5 Probleme bei der HIV-Therapie	12
1.6 Das Myeloperoxidase-System	14
1.7 Ziel dieser Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Reagenzien und Enzyme	18
2.1.2 Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme	20
2.1.3 Verwendete Reaktionssysteme	21
2.1.4 Medien für Zellkultur und Bakterien	21
2.1.5 Lösungen	23
2.1.6 Verwendete Antikörper	26
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.8 Geräte	27
2.1.9 Verwendete Plasmide	28

2.2	Methoden	29
2.2.1	Chemikalische Methoden	29
2.2.1.1	Herstellung der HOCl-modifizierten Proteine	29
2.2.1.2	Konzentrationsbestimmung der Proteine (Smith <i>et al.</i> , 1985)	30
2.2.1.3	Massenspektroskopische Untersuchungen (MALDI-TOF)	30
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.2.1	Kultivierung der Bakterien	31
2.2.2.2	Lagerung der Bakterien	31
2.2.2.3	Herstellung von kompetenten Bakterien	31
2.2.2.4	Transformation von <i>E.coli</i> (Hanahan, 1983)	32
2.2.2.5	Isolierung der Plasmide	32
2.2.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	33
2.2.2.7	DNA-Analyse mittels Restriktionsendonukleasen	33
2.2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.2.9	Elution der DNA	34
2.2.2.10	Sequenzierung der DNA (Sanger <i>et al.</i> , 1977)	34
2.2.2.11	Lagerung der DNA	35
2.2.2.12	Natriumdodecylsulfat-(SDS-)Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.2.2.13	Western-Blot	36
2.2.3	Methoden der Zellkultur	37
2.2.3.1	Kultivierung der Zellen	37
2.2.3.2	Trypsinieren von adhärennten Zellen	37
2.2.3.3	Zellzahlbestimmung und Vitalität der Zellen	38
2.2.3.4	Transfektion der Zellen	38
2.2.3.5	Lyse der Zellen	39
2.2.3.6	Populationsverdopplungstest von HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen	39
2.2.3.7	Anfärben der Zellen	39
2.2.3.6	Lagerung der Zellen	40
2.2.4	Virologische Methoden	41
2.2.4.1	Kultivierung der Viren	41
2.2.4.2	Bestimmung der TCID ₅₀	41
2.2.4.3	p24-Antigen Enzym-gebundener Immunoassay (ELISA)	43
2.2.4.4	<i>Bluecell</i> -Infektionstest	44
2.2.4.5	Lagerung der Viren	44
2.2.5	Methoden zur Toxizitätsuntersuchung	45
2.2.5.1	³ H-Thymidintest	45
2.2.5.2	Hämolyse von Erythrozyten	45

3	Ergebnisse	47
3.1	Herstellung der HOCl-modifizierten Proteine	47
3.2	Massenspektroskopische Analyse der HOCl-modifizierten Proteine	49
3.3	Synzytienbildungstest zur Testung der antiviralen Eigenschaften der HOCl-modifizierten Proteine	51
3.4	Testung der HOCl-modifizierten Proteine auf Inhibition der gp120/gp41-induzierten Synzytienbildung	56
3.4.1	HOCl-modifizierte HSA-Proteine und VEBP	56
3.4.2	HOCl-modifizierte BSA-, MSA- und PSA-Proteine	64
3.4.3	HOCl-modifizierte Transferrin- und β -Galaktosidase-Proteine	66
3.5	Inhibition der HIV-1-induzierten Synzytienbildung durch VEBP	70
3.6	Inhibition der HIV-1-Vermehrung durch VEBP	74
3.7	HIV-1 _{NL-991} -Neutralisationsversuche mit HOCl-modifizierten β -Galaktosidase- und GST-V3-Proteinen	76
3.8	Neutralisation von verschiedenen HIV-1-Subtypen und HIV-2 durch VEBP	78
3.9	Vergleich der VEBP-Sensitivität gegenüber den X4-tropen und R5-tropen Virusstämmen	84
3.10	Vergleich der Nettoladungen der V3-Loop-Sequenzen der verwendeten HIV-Isolate	86
3.11	Toxizitätsuntersuchungen <i>in vitro</i>	88
3.11.1	Populationsverdopplungstest von HeLa-Zellen	88
3.11.2	Lichtmikroskopische Beobachtungen der mit VEBP oder HSA inkubierten Zelllinien	90
3.11.3	³ H-Thymidintest	92
3.11.4	Hämolysetest bei Erythrozyten	94

4	Diskussion	96
4.1	VEBP im Vergleich zu anderen HIV-Inhibitoren	96
4.2	Wirkungsweise der VEBP--HIV-1-Interaktion	99
4.3	Mögliche Resistenzen gegenüber VEBP.....	112
4.4	Vorkommen von VEBP <i>in vivo?</i> - Myeloperoxidase-Defizienz	113
4.5	Andere HOCl-modifizierte Proteine als HIV-Inhibitoren	114
4.6	Ausblick und Anwendungsmöglichkeiten von VEBP	115
5	Literaturverzeichnis	118
6	Anhang	132
Anhang 1:	Abkürzungen und Schreibweisen	132
Anhang 2:	Aminosäuren	134
Anhang 3:	Veröffentlichungen	135
Danksagung	136

Zusammenfassung

Humanes (HSA), Bovines, Murines und Porcines Serum Albumin sowie Transferrin, β -Galaktosidase und Gluthation-S-Transferase-V3-Protein wurden in dieser Arbeit mit hypochloriger Säure modifiziert. Die Proteine wurden mit HOCl in unterschiedlichen molaren Verhältnissen behandelt und anschließend aufgereinigt. Aufgrund der Eigenschaft, dass HOCl-modifiziertes HSA (molares Verhältnis HSA zu HOCl 1:1000) an das HIV-1 gp120 bindet, wurde es VEBP (Virus *Envelope* Bindendes Protein) genannt.

In einem Synzytien-Test wurde die Wirksamkeit des VEBP gegen HIV-1 überprüft. Zellen, die CD4, CXCR4 und CCR5 exprimieren, wurden mit einem gp160-Expressionsvektor transfiziert und die gp120/gp41-induzierte Synzytienbildung beobachtet. Für die Transfektion wurden zwei Expressionsvektoren für ein X4-tropes und ein R5-tropes gp120 (NL4-3, NL-991) eingesetzt. In den beiden Experimenten zeigte VEBP eine vollständige Inhibition der Synzytienbildung bei 20 $\mu\text{g/ml}$ (X4-gp120) bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$ (R5-gp120). Es ergab sich aus den Versuchen eine EC_{50} von etwa 10 $\mu\text{g/ml}$ (150 nM) bzw. $EC_{50} \approx 25 \mu\text{g/ml}$ (370 nM) für das X4-trope bzw. R5-trope gp120.

In einem HIV-1-Infektionsversuch (500 TCID₅₀ je Virus) zeigte VEBP vollständige Inhibition der Virus-induzierten Synzytienbildung. Es ergab sich eine $EC_{50} \approx 3 \mu\text{g/ml}$ (44 nM, NL4-3) und bei einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ VEBP wurde die Vermehrung des R5-tropen Virus NL-991 um 20% inhibiert.

Im weiteren zeigte VEBP bei 13 Virusisolaten der HIV-1 Subtypen A, B, C, D, G, N und O sowie gegen HIV-2 neutralisierende Eigenschaften. Für die Subtypen A (92UG029) und O (mvp2171) ergab sich eine $EC_{50} \approx 6 \mu\text{g/ml}$, für die Subtypen B (Bal, JR-CSF), D (92UG021), G (RU570) eine $EC_{50} \approx 15 \mu\text{g/ml}$, für Subtyp D (ELI) eine $EC_{50} \approx 20 \mu\text{g/ml}$, für die Subtypen C (TZ05, 98BR04), D (92UG035), N (YBF30) eine $EC_{50} \approx 50 \mu\text{g/ml}$, für Subtyp O (mvp8161) und CBL20_{HIV-2} eine $EC_{50} \approx 80 \mu\text{g/ml}$.

Die breite Wirksamkeit gegen die verschiedenen HIV-1 Subtypen und die einfache und günstige Herstellung machen VEBP zu einer aussichtsreichen antiviralen Substanz für den Einsatz als topisches Mikrobizid.

Die Inhibition der Interaktion zwischen gp120 und den zellulären Rezeptoren aufgrund der Bindung von VEBP an gp120 könnte ein neuen Angriffspunkt gegen HIV darstellen.

Abstract

Human serum albumin (HSA), bovine serum albumin, mouse and pig serum albumin, transferrin, β -galactosidase and the protein glutathione-S-transferase-V3 were modified with HOCl. These proteins were treated with HOCl at different molar ratios and were subsequently purified. Because of the property of HOCl-modified HSA (treated with HOCl at a molar ratio of 1:1000) to bind to gp120 of HIV-1, it was designated "VEBP" (virus envelope binding protein).

The activity of VEBP against HIV-1 was tested in a syncytia formation assay. Cells expressing CD4, CXCR4 and CCR5 were transfected with a gp160-expressing vector and the gp120/gp41-induced syncytia formation was observed. Two expression vectors were used for the assay: an X4-tropic and an R5-tropic gp120 (NL4-3, NL-991). In both experiments, VEBP completely inhibited syncytia formation at a concentration of 20 μ g/ml (X4-gp120) and 50 μ g/ml (R5-gp120), respectively. This resulted in an IC_{50} of approximately 10 μ g/ml (150 nM) and an IC_{50} about 25 μ g/ml (370 nM) for X4-tropic and R5-tropic gp120, respectively.

In an HIV-1 infection assay with 500 TCID₅₀, VEBP completely inhibited the virus-induced syncytia formation. The outcome was an IC_{50} of 3 μ g/ml (44 nM, NL4-3); at a concentration of 20 μ g/ml VEBP, the replication of the R5-tropic virus NL-991 was inhibited by 20%.

In addition, the antiviral activity of VEBP was demonstrated by neutralising a panel of 13 viruses including HIV-1 subtypes A, B, C, D, G, N and O and an HIV-2 subtype. For the subtypes A (92UG029) and O (mvp2171), the result was an $IC_{50} \approx 6$ μ g/ml, for subtypes B (Bal and JR-CSF), D (92UG021), G (RU570) an $IC_{50} \approx 15$ μ g/ml, for subtype D (ELI) an $IC_{50} \approx 20$ μ g/ml, for subtypes C (TZ05 and 98BR04), D (92UG035), N (YBF30) an IC_{50} of approximately 50 μ g/ml and for subtypes O (mvp8161) and CBL20_{HIV-2} an $IC_{50} \approx 80$ μ g/ml.

As a result, the strong antiviral activity of VEBP against different HIV-1 subtypes and its easy and inexpensive production make VEBP a very promising antiviral substance for use as a microbicide.

The inhibition of the interaction between gp120 and cellular receptors by VEBP-gp120-binding seems to be a new target in the fight against HIV.

1 Einleitung

1.1 Das humane Immundefizienzvirus und AIDS – ein weltweites Problem

Seit nun mehr 20 Jahren breitet sich das **Humane Immundefizienzvirus (HIV)** epidemieartig in allen Ländern der Erde aus. Weltweit sind über 40 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert. Im Jahre 2003 starben etwa 3 Millionen Menschen vor allem in den armen Ländern Afrikas an den Folgen der Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrom*). Täglich infizieren sich weltweit 14000 Menschen neu mit dem tödlichen Virus (UNAIDS/WHO, 2004). In Deutschland gab es 2003 etwa 2000 HIV-Neuinfektionen, 700 neue Fälle von AIDS-Erkrankungen und 600 Menschen starben an AIDS (Robert-Koch-Institut, 2004).

Somit ist die HIV-Infektion innerhalb von nur 20 Jahren neben Malaria und Tuberkulose zu einer der bedeutendsten Infektionskrankheiten unserer Zeit geworden.

AIDS ist nach wie vor nicht heilbar, aber das Voranschreiten der HIV-Infektion und der Ausbruch von AIDS können durch den Einsatz von antiviralen Substanzen in der Therapie verzögert werden. Diese antiviralen Substanzen können den Erreger jedoch nicht aus dem Körper eliminieren. So besteht ein Therapieziel im Moment darin, die Menge an Virus im Körper langfristig zu reduzieren und somit das Ausbrechen von AIDS hinauszuzögern. Die antiviralen Medikamente müssen daher, wie bei einer chronischen Erkrankung, lebenslang eingenommen werden.

Bei allen in den letzten Jahren entwickelten und zugelassenen antiviralen Substanzen können Resistenzen auftreten (de Mendoza *et al.*, 2002; Shafer 2002a-c, Drug Resistance Mutations Group of the International AIDS Society USA, 2001; Johnson *et al.*, 2003). Deshalb ist es notwendig, neue Angriffspunkte und neue Wirkstoffe gegen das HIV zu finden, um weitere Therapieoptionen bei Therapieversagen zu erhalten.

Ein großes Problem bei dem weltweiten Kampf gegen das HIV besteht auch darin, dass die neu entwickelten Pharmaka sehr teuer sind und deshalb ausschließlich den Erkrankten in reichen Industrienationen zu Verfügung stehen. Die Mehrzahl der Infizierten kann medikamentös nicht adäquat behandelt werden.

1.2 Übersicht über die in der HIV-Therapie eingesetzten antiviralen Pharmaka

Es gibt zurzeit drei verschiedene antivirale Substanzklassen gegen das HIV, die in der Therapie eingesetzt werden und für die Behandlung zugelassen sind:

- Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
- Protease-Inhibitoren
- *Entry*-Inhibitoren

Die Reverse-Transkriptase-Inhibitoren und die Protease-Inhibitoren hemmen die virusspezifischen Enzyme Reverse Transkriptase bzw. Protease und bekämpfen das HIV, nachdem das Virus in die CD4⁺-Zellen eingedrungen ist und diese infiziert hat. Die Vermehrung der Viren wird durch diese Pharmaka verhindert.

Zur Wirkstoffklasse der Reverse-Transkriptase-Inhibitoren zählen zum einen die Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren und Nukleotidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren und zum anderen die Nicht-Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren.

Die *Entry*-Inhibitoren verhindern die Fusion des HIV mit den CD4⁺-Zellen. Sie greifen das Virus im Gegensatz zu den Reverse-Transkriptase- und Protease-Inhibitoren bereits vor Eintritt in die Zellen an. Dadurch wird die Infektion der Zellen mit dem Virus unterbunden.

Seit 1996 werden die Wirkstoffe in Kombinationen zur Therapie eingesetzt, um möglichst viele Angriffspunkte gegen das Virus zu treffen. Bei den vorher angewendeten Monotherapien traten sehr schnell Resistenzen gegenüber den Medikamenten auf. Die Entwicklung von resistenten HIV-Stämmen kann man bei der Kombinationstherapie zwar nicht ausschließen, aber man kann sie entscheidend verzögern. Man nennt diese Kombinationstherapie HAART (**H**och **a**ktive **a**ntiretrovirale **T**herapie).

Tabelle 1 (siehe Seite 3) gibt einen Überblick über die im Moment in Deutschland zugelassenen HIV-Therapeutika (Morck *et al.*, 1997-2004; Stand April 2004).

Tabelle 1: Antivirale Pharmaka gegen HIV**Reverse-Transkriptase-Inhibitoren****A Nukleosidische und Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren**

Substanzname	Abkürzung	Handelsname	Hersteller
Zidovudin (AZT)	AZT	Retrovir [®]	GSK
Didanosin (DDI)	DDI	Videx [®]	BMS
Zalcitabin (DDC)	DDC	HIVID [®]	Roche
Stavudin (D4T)	D4T	Zerit [®]	BMS
Lamivudin (3TC)	3TC	Epivir [®]	GSK
Abacavir	ABC	Ziagen [®]	GSK
Tenofovir ^a	TDF	Viread [®]	Gilead
Emtricitabin	FTC	Emtriva [®]	Gilead

Kombinationspräparate

AZT+3TC		Combivir [®]	GSK
AZT+3TC+ABC		Trizivir [®]	GSK

B Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Nevirapin	NVP	Viramune [®]	Boehringer-Ingelheim
Efavirenz	EFV	Sustiva [®]	BMS

Protease-Inhibitoren

Saquinavir (Softgel)	SQV-FTV	Fortovase [®]	Roche
Saquinavir (Hartgel)	SQV-INV	Invirase [®]	Roche
Ritonavir	RTV	Norvir [®]	Abbott
Indinavir	IDV	Crixivan [®]	MSD
Nelfinavir	NFV	Viracept [®]	Roche
Amprenavir	APV	Agenerase [®]	GSK
Lopinavir/Ritonavir (LPV/r)	LPV	Kaletra [®]	Abbott
Atazanavir	ATV	Reyataz [®]	BMS

Entry-Inhibitoren

Enfuviritid	T-20	Fuzeon [®]	Roche
-------------	------	---------------------	-------

^a Nukleotidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NtRTI)

1.3 Pharmakologie der antiviralen Substanzen

In Abbildung 1 (Seite 7) sind die verschiedenen Angriffspunkte und Wirkmechanismen der antiviralen Wirkstoffe gegen HIV schematisch dargestellt.

1.3.1 Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

a) Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)

Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren sind Nukleosidanaloga, denen das 3'-Hydroxyl-Ende an der Desoxyribose fehlt. Sie konkurrieren während der reversen Transkription von Virus-RNA zu DNA mit den natürlichen Nukleosiden um das aktive Zentrum des HIV-Enzyms Reverse Transkriptase und werden anstelle der natürlichen Nukleoside in die neugebildete DNA als „falscher Baustein“ eingebaut. Da keine 3'-OH-Bindung zur Bildung der Phosphordiesterbindung bei den NRTIs zur Verfügung steht, kommt es zum Abbruch der DNA-Kette. Somit kann das Provirus nicht vollständig durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben und anschließend in das Wirtsgenom integriert werden. Die NRTIs werden von den Zellen unverändert aufgenommen und müssen dort erst durch zelluläre Kinasen in die aktiven Wirkformen (Triphosphatderivate) phosphoryliert werden.

b) Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NtRTIs)

Tenofovir ist der erste nukleotidanaloge Hemmstoff der Reversen Transkriptase. Tenofovir ist wie alle anderen NRTIs ein Prodrug, das allerdings schon monophosphoryliert vorliegt und in den Zellen nur noch diphosphoryliert werden muss.

Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga haben wenige Interaktionen mit anderen Medikamenten und werden meist recht gut vertragen. Als Nebenwirkungen sind Myelotoxizitäten, Laktatazidosen, Polyneuropathien und Pankreatitiden aufzuführen. Häufige Beschwerden sind außerdem Müdigkeit, Kopfschmerzen und gastrointestinale Probleme. Ein großer Teil der Nebenwirkungen ist sehr wahrscheinlich über eine mitochondriale Toxizität zu erklären, die 1999 erstmals beschrieben wurde (Brinkmann *et al.*, 1999).

c) **Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)**

Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren greifen ebenso wie die Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren bzw. Nukleotidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren am virusspezifischen Enzym Reverse Transkriptase an. Sie sind allerdings keine „falschen“ Substrate, sondern binden direkt und nicht-kompetitiv an das Enzym in der Nähe der Substratbindungsstelle für die Nukleoside. Dadurch wird ein Komplex gebildet, durch den eine katalytisch aktive Bindungsstelle der Reversen Transkriptase blockiert wird. Diese kann nun weniger Nukleoside binden und die Polymerisation der Basen wird so deutlich herabgesetzt.

Zurzeit sind die beiden Nicht-Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren Nevirapin und Efavirenz in Deutschland für die Behandlung zugelassen. Bei der Einnahme von Efavirenz kann es zu Nebenwirkungen im ZNS kommen, Nevirapin kann Hepatotoxizitäten verursachen. Die Toxizität und Effektivität der beiden Substanzen korrelieren wahrscheinlich mit den Plasmaspiegeln (Gonzales *et al.*, 2001; Marzolini *et al.*, 2001; Veldkamp *et al.*, 2001). Beide Substanzen werden über das Cytochrom P450-Enzymsystem metabolisiert (Miller *et al.*, 1997).

1.3.2 Protease-Inhibitoren

Protease-Inhibitoren kompetieren mit den viralen Vorläuferproteinen *gag* und *gag/pol* um das aktive Zentrum der viralen Protease. Die HIV-Protease spaltet das *gag-pol*-Polyprotein in seine Untereinheiten auf. Wird die Protease gehemmt, unterbleibt dadurch die proteolytische Spaltung und somit auch die Reifung der Proteine. Es entstehen Viruspartikel, die nicht mehr infektiös sind (Deeks *et al.*, 1997; Sommadossi *et al.*, 1999; Eron *et al.*, 2001).

Als Nebenwirkungen der Protease-Inhibitoren sind vor allem gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen und Durchfall) zu nennen. In der Langzeitbehandlung kann es zu Lipodystrophie und Dyslipidämie kommen (Graham *et al.*, 2000). Ebenso können Veränderungen der Blutfett- und Blutzuckerwerte als Nebenwirkungen auftreten.

Sämtliche Protease-Inhibitoren können das Cytochrom P450-System (CYP3A4) inhibieren und interagieren deshalb mit zahlreichen anderen Medikamenten. Bei Ritonavir nutzt man diese Eigenschaft zur *Boosterung* der anderen Protease-Inhibitoren. Durch Hinzugabe kleiner Dosen Ritonavir werden die Plasmaspiegel fast aller Protease-Inhibitoren deutlich gesteigert (Kempf *et al.*, 1997). Die Anzahl der täglich einzunehmenden Kapseln kann somit reduziert und die Einnahmeschemata für die Patienten vereinfacht werden.

1.3.3 **Entry-Inhibitoren**

Enfuvirtid (Fuzeon[®], T-20) ist der erste Vertreter einer dritten Wirkstoffklasse, der so genannten *Entry*-Inhibitoren. Im Gegensatz zu den Reverse-Transkriptase- und Protease-Inhibitoren greift Enfuvirtid im Infektionszyklus extrazellulär bereits vor Eintritt des Virus in die CD4⁺-Zelle ein.

Enfuvirtid ist ein 36 Aminosäuren langes Peptid, welches an das Transmembranprotein gp41 bindet. Die Fusion von viraler und zellulärer Membran wird verhindert (Wild *et al.*, 1993) und somit kann das Virus nicht mehr in die Wirtszelle eindringen (Kilby *et al.*, 1998).

Enfuvirtid muss als Peptid subkutan als Injektion appliziert werden, was eine leichte Anwendbarkeit ausschließt. Durch den komplizierten und sehr teuren Herstellungsprozess ist die Verfügbarkeit als Therapieoption auf reiche Industrienationen beschränkt.

Der *Virusentry* erfolgt durch mehrere Schritte. Die Adhäsion des Virus an Oberflächenmoleküle der Zellen, die Interaktion des HIV-Oberflächenproteins gp120 mit den zellulären Rezeptoren CD4 bzw. Korezeptoren CXCR4 und CCR5 sowie die Fusion von Virus- und Wirtszellmembran durch gp41 (siehe Abbildung 2, Seite 8). Da der *Entry* der erste und wichtigste Schritt im Infektionszyklus des Virus darstellt, wird intensiv nach weiteren *Entry*-Inhibitoren geforscht (siehe Abschnitt 1.4, Seite 9), um die Erst-Infektion der Zellen und die anschließende Vermehrung und Disseminierung des HIV im Körper zu inhibieren.

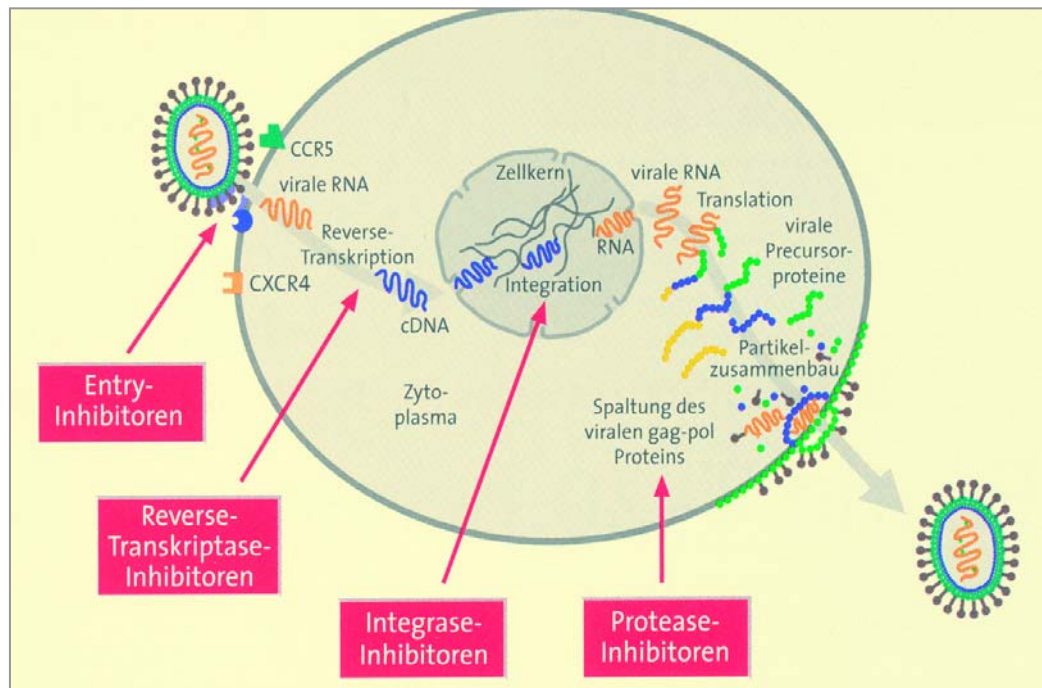


Abb. 1: Angriffspunkte für HIV-Inhibitoren

Die verschiedenen Ansatzpunkte von antiviralen HIV-Medikamenten: *Entry*-Inhibitoren sollen die Fusion des HIV mit den $CD4^+$ -Zellen und somit den Viruseintritt in die Zielzellen verhindern. Reverse-Transkriptase-Inhibitoren blockieren das virale Enzym Reverse-Transkriptase, so dass bei der Reversen Transkription die Virus-RNA (orange) nicht in doppelsträngige DNA (cDNA, blau) umgeschrieben werden kann. Zu den Reverse-Transkriptase-Inhibitoren gehört ebenso die Substanzklasse der Nukleosid- und Nukleotidanaloga. Diese werden anstelle der Nukleoside als „falsche“ Bausteine in die DNA eingebaut, so dass es bei der Transkription von RNA zu DNA zum Kettenabbruch in der neugebildeten DNA kommt. Integrase-Inhibitoren sollen verhindern, dass die virale DNA in das Wirtsgenom als Provirus (blau im grauen Zellkern) integriert wird. Integrase-Inhibitoren befinden sich z.Z. erst in klinischen Studien und sind noch nicht zur Therapie zugelassen. Protease-Inhibitoren blockieren das Enzym Protease und verhindern die Spaltung des viralen Vorläuferproteins *gag-pol* (grün-blau-gelb). Die Aufgabe der Protease besteht darin, das Vorläuferprotein *gag-pol* nach der Translation der viralen RNA in seine Untereinheiten (virale *Precursor*-Proteine) aufzuspalten. Bleibt dieser Schritt aus, können die Viruspartikel nicht mehr richtig zusammengefügt werden und es entstehen Viren, die nicht mehr infektiös sind (nach Morck 2004).

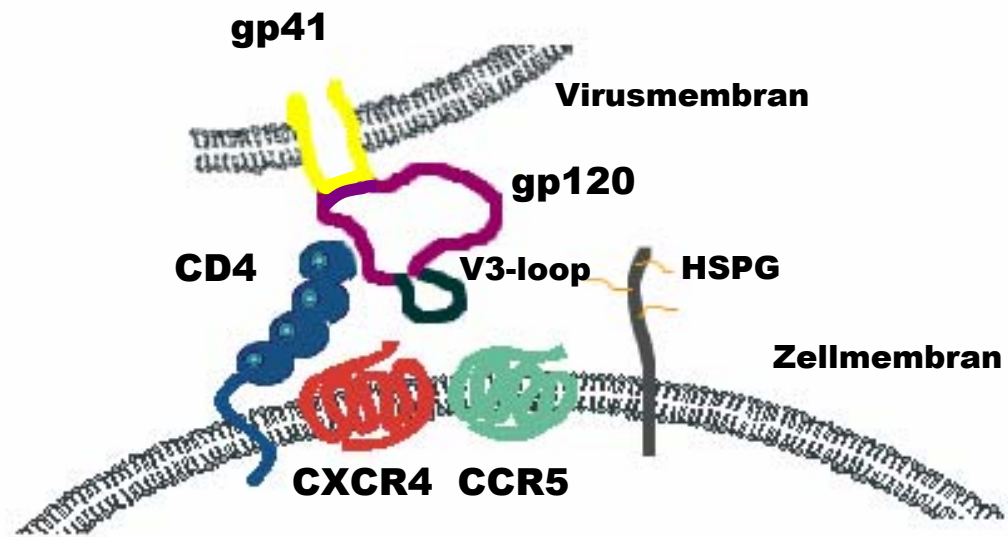


Abb. 2: Beim Virusentry wichtige virale und zelluläre Rezeptoren

Die Adhäsion und Adsorption des Virus an die Zellen wird durch das Oberflächenprotein gp120 des HIV (violett) vermittelt. Dabei bindet das gp120 zuerst an den CD4-Rezeptor (blau). Dieser Rezeptor sitzt in der Membran von T-Helferzellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen. Nach der Bindung kommt es in gp120 zu einer Konformationsänderung und verschiedene Bereiche des gp120 (u.a. der V3-Loop, dunkelgrün) interagieren nun mit einem der Korezeptoren CXCR4 (rot) oder CCR5 (hellgrün). Dabei spielen elektrostatische Wechselwirkungen des positiv geladenen V3-Loops und der Korezeptoren eine Rolle. Nachdem das gp120 an CCR5 oder CXCR4 gebunden hat, verändert sich erneut die Struktur des gp120 und es kommt zum finalen Schritt des Viruseintritts. Das Transmembranprotein gp41 (gelb) des HIV wird freigelegt und Virusmembran und Zellmembran fusionieren mit Hilfe des gp41.

Andere Moleküle spielen bei der Adhäsion ebenfalls eine Rolle. So kann HIV auch die langen anionischen Heparansulfatketten (orange) von Heparansulfatproteoglykanen (HSPG, grau-schwarz) zur Adhäsion an die Zellen benutzen.

1.4 Neue *Entry*-Inhibitoren

Eine ganze Reihe neuer *Entry*-Inhibitoren befindet sich zurzeit in der Entwicklung bzw. in den klinischen Phasen 1 bis 3 (Kilby *et al.*, 2003). Bei Eintritt des HIV in die CD4⁺-Zellen gibt es drei erfolgsversprechende Ansatzpunkte für antivirale Substanzen: Die Bindung des HIV an den CD4-Rezeptor („*Attachment*“- Ansatzpunkt der so genannten *Attachment*- und CD4-Rezeptor-Inhibitoren), die Bindung an die Korezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 (Ansatzpunkt der Chemokinrezeptor-Antagonisten) und schließlich die Fusion von Virus und Zelle (Ansatzpunkt der Membranfusions-Inhibitoren) (siehe Übersicht Tabelle 2, Seite 11).

CD4-Rezeptor-Inhibitoren

CD4-Rezeptor-Inhibitoren sollen verhindern, dass gp120 bzw. das HIV an die Wirtszellen andocken kann. Lösliches rekombinantes CD4 (rsCD4) dient dabei als Inhibitor. Dabei soll das rsCD4 anstelle des membrangebundenen CD4-Rezeptors das gp120 binden und abfangen. Die *in vitro* beschriebene antivirale Aktivität von rsCD4 konnte allerdings *in vivo*-Studien nicht bestätigt werden (Moore *et al.*, 1992; Schacker *et al.*, 1995). Die Weiterentwicklung PRO 542 enthält eine CD4-Domäne, die mit einem IgG-Fragment verbunden ist (Jacobson *et al.*, 2000). Diese Substanz kann ebenfalls die Interaktion zwischen gp120 und CD4 blocken.

Attachment-Inhibitoren

Polyanionen wie Dextransulfat interferieren elektrostatisch mit Teilen des gp120, wie z.B. dem positiv geladenen V3-Loop, und verhindern dadurch die Interaktion des V3-Loops mit den Korezeptoren. Die Nachteile von Dextransulfat und Heparansulfat sind ihre antikoagulierenden Eigenschaften. In hoher Dosis parenteral eingesetzt sind sie toxisch (Flexner *et al.*, 1991). Allerdings könnte Dextransulfat ebenso wie die polyanionische Substanz PRO 2000 und das Cyanovirin-N als topisches Mikrobizid (Definition siehe unten) zur Prophylaxe eingesetzt werden.

PRO 2000 bindet an CD4; das aus einer Alge stammende Cyanovirin-N an gp120. Mit allen drei Substanzen laufen zurzeit klinische Studien zur Anwendung als topische Mikrobizide (Van Damme *et al.*, 2000; Mori & Boyd, 2001).

Unter einem topischen Mikrobizid bezeichnet man die Verwendung einer antiviralen Substanz in einer Arzneistoffformulierung, wie z.B. in einem Gel oder einer Salbe, zur oberflächlichen Anwendung, hier im Sinne der vaginalen Anwendung, zum Schutz vor HIV oder anderen sexuell übertragbaren Krankheiten.

Die antiviralen Mikrobizide gegen HIV sollen vor allem Frauen in afrikanischen Ländern während des Geschlechtsverkehrs mit infizierten Männern schützen. In diesen Ländern wird der Gebrauch von Verhütungsmitteln wie z.B. Kondomen von der männlichen Bevölkerung nicht akzeptiert.

Chemokinrezeptor-Inhibitoren

Chemokinrezeptor-Inhibitoren setzen an den beiden für die HIV-Infektion wichtigen Korezeptoren CXCR4 und CCR5 an. Sie sollen die Korezeptoren blockieren und somit verhindern, dass der gp120-CD4-Komplex mit den Korezeptoren interagieren kann.

Die Substanz SCH-C bindet ähnlich wie der natürliche CCR5-Ligand RANTES als Antagonist an CCR5 (Strizki *et al.*, 2001). Die Blockierung des CCR5 scheint keine negativen Folgen zu haben (Dean *et al.*, 1996).

Die Blockade von CXCR4 könnte problematischer sein, da die Deletion von CXCR4 bei Mäusen zu tödlichen Entwicklungsstörungen des Fötus führt (Zou *et al.*, 1998).

AMD3100 ist eine kationische Substanz und wirkt als CXCR4-Antagonist, besitzt aber keine Signaleigenschaft am Rezeptor. PRO 140 wirkt als monoklonaler Antikörper gegen CCR5 (Trkola *et al.*, 2001).

Membranfusions-Inhibitoren

Der letzte Schritt beim Viruseintritt ist die Interaktion des Transmembranproteins gp41 mit der Zellmembran und die anschließende Fusion von Virus- und Zellmembran. Die Membranfusions-Inhibitoren sollen die Interaktion des gp41 mit der Zellmembran inhibieren.

Das Peptid T-1249 bindet ähnlich wie T-20 (Enfuvirtid) an die gp41-Region und verhindert dadurch die Fusion. Es wirkt *in vitro* auch gegen T-20 resistente Viren. Das T-1249 hat allerdings dieselben Nachteile wie Enfuvirtid. Es muss als Peptid subkutan appliziert werden und es ist durch die komplizierte Herstellung zu teuer und steht deshalb nur reichen Industrienationen zur Verfügung.

Tabelle 2: In der Entwicklung befindliche *Entry*-Inhibitoren

	Ansatzpunkt/Funktionsmechanismus
CD4-Rezeptor-Inhibitoren	CD4-Rezeptor
<i>Recombinant soluble</i> CD4	Bindet kompetitiv an gp120
TNX-355	Monoklonaler Antikörper gegen CD4
PRO 542	Tetrameres CD4 verbunden mit Immunglobulin G
BMS-806	Bindet an gp120
Chemokinrezeptor-Inhibitoren	Korezeptoren CXCR4/CCR5
SCH-C	RANTES Antagonist, bindet kompetitiv an CCR5
PRO 140	Monoklonaler Antikörper gegen CCR5
AMD3100	CXCR4 Inhibitor
Andere <i>Attachment</i>-Inhibitoren	gp120/CD4
Dextransulfat	Interferiert mit gp120 und verhindert CXCR4 Interaktion
PRO 2000	Bindet an CD4 und interferiert mit gp120
Cyanovirin-N	Bindet an gp120 und interferiert mit CD4/CXCR4-Interaktion
Membranfusions-Inhibitoren	Transmembranprotein gp41
T-1249	Nachfolger von T-20, Peptid bindet auch an gp41
„Fünf helix“	Bindet an C-terminalen Ende von gp41 und inhibiert Fusion

1.5 Probleme bei der HIV-Therapie

Ein prinzipielles Problem bei der Entwicklung von antiviralen Wirkstoffen gegen HIV ist dessen große Variabilität. Aufgrund der genetischen Variabilität des HIV haben sich verschiedene Subtypen entwickelt. Zusätzlich entstehen in jedem HIV-Infizierten eine Vielzahl unterschiedlicher Virusvarianten.

So ist die hohe genetische Variabilität des HIV ein Grund für die Resistenzbildung bei der antiviralen Therapie. Nur wenige Mutationen innerhalb des pol-Gens bewirken, dass Protease-Inhibitoren ihre Wirksamkeit verlieren (Johnson *et al.*, 2003). Auch gegen alle Inhibitoren der Reversen Transkriptase und den Entry-Inhibitor Enfurvitid können sich resistente Viren bilden (de Mendoza *et al.*, 2002).

Ein weiteres Phänomen des HIV besteht darin, dass das Virus verschiedene Korezeptoren zum Eintritt in die Wirtszelle benutzen kann. Diese Korezeptoren können verschiedene Chemokine binden, die mit der Virusbindung konkurrieren. So bindet z. B. der Chemokinrezeptor CCR5 die drei Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β . Diese Chemokine können daher auch die Virusinfektion blockieren. Es können sich aber Varianten des HIV entwickeln, die zwar CCR5 benutzen, aber durch MIP-1 α oder RANTES nicht mehr neutralisiert werden können (Maeda *et al.*, 2000). Hier zeigt sich, dass die Blockade einer spezifischen Virus-Rezeptor-Interaktion vom Virus durch seine genetische Variabilität umgangen werden kann.

Zur Bekämpfung von Infektionen besitzt der Mensch die adaptive spezifische Immunabwehr. Die spezifische Abwehr bilden zum einen neutralisierende Antikörper, die von B-Lymphozyten gebildet werden, und zum anderen die T-Lymphozyten, zu denen die CD4-T-Helferzellen und CD8-T-Lymphozyten gehören.

Neutralisierende Antikörper sind gegen viele verschiedene Krankheitserreger eine wirksame Abwehr. Im Falle des HIV-1 werden aber nicht ausreichend genug neutralisierende Antikörper gebildet bzw. das Virus entwickelt immer wieder neue Varianten, die nicht durch die existierenden Antikörper erkannt werden. Im Bereich der PND (prinzipielle Neutralisations-Domäne) des Virus, dem V3-Loop des gp120, beobachtet man eine hohe antigene Variation. Spezifische V3-Loop-Antikörper neutralisieren neue Virusvarianten nicht, sondern können in einzelnen Fällen die Infektion sogar verstärken (Klicks *et al.*, 1993). Ein weiterer Mechanismus für den

„Escape“ vor neutralisierenden Antikörpern ist die Maskierung von Epitopen durch komplexe Zuckerstrukturen. So wird die Bindung neutralisierender Antikörper blockiert und HIV entkommt auch auf diesem Wege der humoralen Immunantwort (Cheng-Mayer *et al.*, 1999; Polzer *et al.*, 2002). Neben Antikörpern spielen auch die cytotoxischen CD8⁺-T-Zelllymphozyten (CTL) eine Rolle in der Abwehr HIV-infizierter Zellen. Auch gegen diese zelluläre Abwehr entwickeln sich *Escape*-Mutanten, die sich dann in der Bevölkerung verbreiten (Furutsuki *et al.*, 2004).

Gerade diese beiden Abwehrmechanismen, deren Grundlage eine sehr virusspezifische und gezielte Erkennung von Epitopen ist, scheitern bei der Kontrolle der HIV-Infektion. Auch hier zeigt sich, wie bei der medikamentösen Therapie, dass eine hoch spezifische Erkennung von Epitopen vom Virus durch seine genetische Variabilität leicht umgangen werden kann.

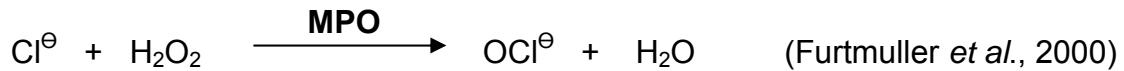
Zur unspezifischen Immunabwehr gehören das Komplementsystem, die Interferone, NK-Zellen sowie die unspezifische zelluläre Abwehr der Phagozyten.

In der Literatur gibt es einige Hinweise, die zeigen, dass aktivierte Phagozyten Produkte ausscheiden oder produzieren, die in der Lage sind, die HIV-Infektion *in vitro* zu hemmen (Klebanoff *et al.*, 1992, Chase *et al.*, 1992). Die Phagozytose von Krankheitserregern durch die Phagozyten gehört zu den wichtigsten Mechanismen der angeborenen Immunabwehr. Zu den Phagozyten zählen die Monozyten bzw. Makrophagen und die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Makrophagen und neutrophile Granulozyten bilden dabei neben dem Komplementsystem und der physikalischen Barriere der Haut die erste „Verteidigungslinie“ gegen Pathogene. Bei der Phagozytose werden zur „Inaktivierung“ des Krankheitskeims gespeicherte Granula in das Phagosom entlassen. Aus diesen Granula wird das Enzym Myeloperoxidase (MPO) freigesetzt. Hier wurde in der Literatur berichtet, dass das MPO-System neben der antibakteriellen auch eine antivirale Wirkung zeigt (Belding *et al.*, 1970; Klebanoff & Belding, 1974). Das MPO-System produziert als Wirkstoff Hypochlorit (HOCl).

Welche Rolle das MPO-System und freies HOCl bei der Abwehr viraler Krankheitserreger spielt, ist bisher nicht ausreichend untersucht worden. Eventuell lassen sich aus den unspezifischen Abwehrmechanismen neue antivirale Wirkstoffe ableiten, die in der Lage sind viele verschiedene HIV-Varianten zu neutralisieren.

1.6 Das Myeloperoxidase-System

Das Enzym Myeloperoxidase (MPO, EC 1.11.1.17) ist Bestandteil einer der unspezifischen Immunabwehrmechanismen des Menschen. Das Enzym katalysiert die Reaktion:



Das Myeloperoxidase-H₂O₂-Halogensystem hat als antimikrobielles System (Klebanoff 1967, 1968, 1974; Winterbourn *et al.*, 2000) sowohl bakterizide als auch viruzide Eigenschaften (Belding *et al.*, 1970; Klebanoff & Belding, 1974).

Das Enzym MPO wird im promyelozytischen Entwicklungsstadium der neutrophilen Granulozyten gebildet und anschließend in azurophilen Granula zwischengespeichert (Hampton *et al.*, 1998). Bei einer Infektion wandern die Granulozyten zum Infektionsort und MPO wird während der Phagozytose in das Phagosom entlassen (Klebanoff *et al.*, 1999) oder in den extrazellulären Raum abgegeben, wenn die Granulozyten durch verschiedene Substanzen (Zytokine, opsonierte Mikroorganismen) stimuliert werden (Klebanoff *et al.*, 1991). Durch das freigesetzte Enzym wird aus den Vorstufen NaCl und H₂O₂ direkt am Infektionsort freies HOCl gebildet und kann dort seine mikrobizide Funktion ausüben (Thomas 1979). Der bisherige Wissenstand war, dass freies HOCl als starkes Toxin und „Desinfektionsmittel“ seine Funktion in „direkter“ Weise ausübt.

Ein erster Hinweis auf eine Beteiligung des MPO-Systems bei der Bekämpfung der HIV-Infektion ergab sich aus Arbeiten von Klebanoff und Mitarbeitern. In diesen Arbeiten wird behauptet, dass die antivirale Wirkung, die von stimulierten PMN (neutrophile polymorphkernige Leukozyten, neutrophile Granulozyten) ausgeht, durch MPO-produziertes HOCl verursacht wird (Chase *et al.*, 1992; Klebanoff *et al.*, 1992). Sie leiten aus den Experimenten eine antivirale Wirkung durch MPO-produziertes HOCl ab, da der „Vorläufer“, das Oxidationsmittel H₂O₂, keine antiviralen Eigenschaften im Testsystem zeigte. Bei Untersuchungen mit PMN von Patienten mit einer MPO-Defizienz wurde beobachtet, dass die antivirale Aktivität im Zellkultursystem durch Zugabe von MPO wiederhergestellt wurde. Auch konnten die Autoren nachweisen, dass die Induktion der antiviralen Aktivität an die Anwesenheit

von Cl^{\ominus} -Ionen gekoppelt ist, da im Chlorid-freien Medium ($\text{Cl}^{\ominus} \rightarrow \text{SO}_4^{2\ominus}$) keine antiviralen Effekte nachzuweisen waren. Aus diesem Grund haben die Autoren die Hypothese aufgestellt, dass HOCl der eigentliche antivirale Wirkstoff ist, der von dem Enzym MPO aus PMN-Zellen freigesetzt wird.

Freies HOCl kann aber auch lösliche Proteine im Serum oxidieren. In letzter Zeit wurde der Nachweis erbracht, dass solche HOCl-oxidierten Proteine (oxidiertes LDL) im Menschen vorhanden sind (Malle *et al.*, 2000; Podrez *et al.*, 1999). Zusätzlich zum Nachweis oxidierter Proteine haben Malle und Mitarbeiter monoklonale Antikörper gegen die oxidierte Form von Proteinen hergestellt. Diese monoklonalen Antikörper erkennen nicht nur die natürlich vorkommenden HOCl-modifizierten Formen der Proteine im Menschen, sondern auch Epitope auf *in vitro* modifizierten Proteinen wie z.B. HOCl-oxidiertem BSA oder LDL. Die nicht-modifizierten Proteine werden durch diese Antikörper *in vivo* und *in vitro* nicht erkannt.

Bisher wurden oxidierte Formen des LDL bei der rheumatoiden Arthritis gefunden (Berliner & Heinecke, 1996). Hier wird angenommen, dass oxidiertes LDL durch das MPO- H_2O_2 -Chlorid-HOCl-System entsteht (Hazell *et al.*, 1993). Oxidiertes LDL wurde immunologisch mit Hilfe von anti-oxLDL-Antikörpern in atherosklerotischen Läsionen (Malle *et al.*, 1995; Daugherty *et al.*, 1994) und auch im Nierengewebe (Malle *et al.*, 1997) sowie durch zirkulierende Antikörper im Blut nachgewiesen (Palinski *et al.*, 1989; Malle *et al.*, 2001). In der Schwangerschaft lassen sich ebenfalls durch das MPO- H_2O_2 -Chlorid-HOCl-System modifizierte Proteine in der Plazenta immunohistochemisch nachweisen (Hammer *et al.*, 2001). Diese Arbeiten zeigen, dass die Freisetzung von HOCl eine Proteinmodifikation bewirkt, die sich *in vivo* nachweisen und *in vitro* nachahmen lässt. Durch die Oxidation der Proteine werden neue Epitope geschaffen, die sich immunologisch nachweisen lassen.

In der Literatur finden sich zu MPO und HIV die folgenden Daten: In Gegenwart frei vorliegender Myeloperoxidase wurde die HIV-Infektion von CEM-T-Zellen und stimulierten PBMC-Zellen (Chochola *et al.*, 1994) sowie die virus-induzierte Synzytienbildung und die Virusvermehrung in SupT1-Reporterzellen (Moguilevsky *et al.*, 1992) inhibiert. Zusätzlich konnte im Speichel von AIDS-Patienten eine erhöhte Konzentration von Myeloperoxidase nachgewiesen werden (Vucicevic-Boras *et al.*, 2003). Auch Klebanoff & Kazazi (1995) postulieren eine antivirale Wirkung des

MPO-Systems. Sie zeigten, dass hohe Konzentrationen des Polyamins Spermin und dessen Vorstufe Spermidin in Anwesenheit eines Aminoxidasystems die Bildung von H_2O_2 zur Folge haben. Damit kann im Sperma ebenfalls aus NaCl und H_2O_2 mittels des MPO-Systems hypochlorige Säure generiert werden. Das Aminoxidase/MPO- H_2O_2 -Halogensystem könnte somit im Sperma einen viruziden und damit anti-HIV Effekt haben.

In den zitierten Arbeiten wird geschildert, dass MPO-produziertes HOCl eine antivirale Wirkung besitzt und dass bei der Freisetzung von HOCl auch Proteine wie das LDL modifiziert werden.

Sowohl am Infektionsort als auch im Zellkulturexperiment ist Serum Albumin im Überschuss vorhanden. (Chase et al., 1992; Klebanoff et al., 1992; Chochola *et al.*, 1994; Moguilevsky *et al.*, 1992). Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch in diesen Experimenten die Serum Albumine durch HOCl oxidiert werden. Es ist sogar wahrscheinlich, dass freies HOCl von einem Überschuss an Serum Albumin sowohl *in vivo* als auch *in vitro* abgefangen wird.

Daher postulieren wir, dass in den zitierten Experimenten nicht die freie hypochlorige Säure die antivirale Wirkung ausgeübt hat, sondern HOCl-modifizierte Proteine. Ob HOCl-modifizierte Proteine bestimmte antivirale oder antibakterielle Eigenschaften besitzen, wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Ein wichtiger Hinweis auf eventuelle antivirale Eigenschaften ergab sich aus Vorarbeiten von Markus Vossman (Vossman 2003, GfV-Tagung Berlin). In der vorgestellten Arbeit berichtete M. Vossman über eine Interaktion von HOCl-modifiziertem HSA mit freiem HIV-1 gp120_{MN} und gp120_{IIIB}. Dabei wurde modifiziertes HSA an einen Biosensor gekoppelt und die Bindung von löslichem gp120 mit Hilfe der Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie nachgewiesen.

Aus den vorgestellten Literaturdaten über das MPO-System und die ersten Studien zur Bindung von HOCl-modifiziertem HSA an gp120 stellte sich zwangsläufig die Frage, ob nicht oxidierte Formen von Serum Proteinen wie z.B. HOCl-modifiziertes HSA den Wirkstoff darstellen, der die eigentliche antivirale Aktivität besitzt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit diese Fragestellung untersucht werden.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Da nicht bekannt ist, ob die mit dem Enzym Myeloperoxidase in Zusammenhang gebrachte antivirale Aktivität gegen HIV nur durch freies HOCl oder auch durch HOCl-modifiziertes Serum Albumin hervorgerufen wird, sollen in der vorliegenden Arbeit die folgenden Proteine mit HOCl modifiziert werden:

- Humanes Serum Albumin
- Bovines Serum Albumin
- Murines Serum Albumin
- Porcines Serum Albumin
- Transferrin
- β -Galaktosidase
- Gluthation-S-Transferase-V3

Nach Behandlung mit HOCl soll im HIV-1-Infektionsmodell die antivirale Eigenschaft der modifizierten Proteine getestet werden.

Die antivirale Eigenschaft der HOCl-modifizierten Proteine soll zuerst mit Hilfe eines einfachen Synzytienbildungstests untersucht werden. In diesem Test sollen HeLa-Zellen ($CD4^+$, $CCR5^+$, $CXCR4^+$) mit zwei gp160-Expressionsvektoren (pgp160_{NL4-3}, pgp160_{NL-911}) transfiziert und die gp120/gp41-induzierte Synzytienbildung in Anwesenheit der HOCl-modifizierten Proteine beobachtet werden.

Für die weiteren Untersuchungen sollen die beiden Viren NL4-3 (X4-trop) und NL-991 (R5-trop) in einem Inhibitions- und Neutralisationstest eingesetzt werden. In diesen Experimenten soll die Virus-induzierte Synzytienbildung in Anwesenheit der HOCl-modifizierten Proteine untersucht werden.

Zusätzlich soll untersucht werden, ob HOCl-modifiziertes Humanes Serum Albumin auch HIV-2, verschiedene HIV-1-Isolate und HIV-1-Subtypen neutralisieren kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Enzyme

Substanz	Bezugsquelle
³ H-Thymidin	Amersham (Braunschweig)
Acrylamid-Gel 30/40	Roth (Karlsruhe)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acetonitril	Merck (Darmstadt)
Agarose	Life Technologies (Karlsruhe)
Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Ampicillin-dinatriumsalz	Serva (Heidelberg)
Ammoniumpersulfat	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
β-Galaktosidase	Sigma (Deisenhofen)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bovines Serum Albumin	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Coomassie Blau-Farbstoff	Biorad (München)
Diethylformamid	Sigma (Deisenhofen)
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol	Sigma (Deisenhofen)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol 96%	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat	Sigma (Deisenhofen)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Formamid	Sigma (Deisenhofen)
Fötale Kälberserum	Biochrom (Gründau)
Glucose	Merck (Darmstadt)
Gluthation-S-Transferase-V3	Markus Voßmann (BNI)

Glycerol	Merck (Darmstadt)
H ₂ O _{aqua ad iniectionabilia}	Baxter (Unterschleißheim)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
Humanes Serum Albumin	Sigma (Deisenhofen)
IPTG	Applichem (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Molekulargewichtstandard, <i>prest. low range</i>	BioRad (München)
Murines Serum Albumin	Sigma (Deisenhofen)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumazid	Sigma (Deisenhofen)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriumhypochlorit, 13% (v/v), NaOCl	Sigma (Deisenhofen)
N, N', N', N'-Tetramethylethyldiamin	Merck (Darmstadt)
Penicillin-Streptomycin	Gibco (Eggenstein)
p24-Antigen-Standard	Med. Research Council (London, UK)
Ponceau S-Farbstoff	Merck (Darmstadt)
Polyprene [®]	Sigma (Deisenhofen)
Porcines Serum Albumin	Sigma (Deisenhofen)
Puromycin	Gibco (Eggenstein)
Salzsäure 37% (v/v)	Merck (Darmstadt)
Silbernitrat	Merck (Darmstadt)
Sinapinsäure	Aldrich (Deisenhofen)
Trifluoressigsäure	Merck (Darmstadt)

Trypsin/EDTA	Life Technologies (Karlsruhe)
Tryptanblau	Merck (Darmstadt)
Transferrin	Roche (Mannheim)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Trypton	Life Technologies (Karlsruhe)
Tween 20	Serva (Heidelberg)
Wasserstoffperoxid 30%	Merck (Darmstadt)
X-Gal	Serva (Heidelberg)
Xylencyanol	Serva (Heidelberg)

Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.a., zur Herstellung von Lösungen und Puffern wurde biionisiertes Wasser verwendet.

2.1.2 Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinie	Charakterisierung	Bezugsquelle	Medium
HeLa-P4-CXCR4-CCR5	Humane Zervixkarzinom Zelllinien	M.Dittmar (Heidelberg)	DMEM
HeLa-TZM-bl13		M.Dittmar (Heidelberg)	DMEM
GHOST/parenteral	Humane Osteosarkom- Zelllinien	Cecilia <i>et al.</i> , 1998	DMEM
GHOST-CCR5 (HI5)			DMEM
GHOST-CXCR4			DMEM
VERO-B4-Zellen	Affennierenzelllinie	Bernhard-Nocht-Institut	Leibovitz L-15
Erythrozyten		M.Schreiber/M.Kirst	RPMI
Bakterienstamm		Bezugsquelle	Medium
<i>E.coli</i> XL-1 Blue		Stratagene (Heidelberg)	LB-Medium

2.1.3 Verwendete Reaktionssysteme

Bezeichnung	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase Substrat Kit	Biorad (München)
BCA <i>Protein Assay Reagent Kit</i>	Pierce (Rockford, USA)
CEQ™ <i>Dye Terminator Cycles Sequencing Kit</i>	Beckman Coulter. (Unterschleiß.)
ECL™-Reagenz	Amersham Pharmacia (UK)
FuGENE®6 Transfektionsreagenz	Roche (Mannheim)
Hemacolor®-Schnellfärbung	Merck (Darmstadt)
<i>NucleoSpin-Extract Kit</i>	Machery-Nagel (Düren)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)

2.1.4 Medien für Zellkultur und Bakterien

a) Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium / LB Agarplatten

1,5% (w/v) Bacto-Trypton
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 0,5% (w/v) NaCl; ggf. Zusatz von Ampicillin 100 µl/ml
 pH 7,0

bei LB-Medium-Agarplatten wurden 1,5% (w/v) Agar dazugesetzt.

YT-Medium

0,8% (w/v) Bacto-Trypton
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 0,5% (w/v) NaCl
 pH 7,0

dYT-Medium

1,6% (w/v) Bacto-Trypton
 1,0% (w/v) Hefeextrakt
 0,5% (w/v) NaCl
 pH 7,0

jeweils ad H₂O_{ad inject.}

Die Medien wurden bei 121°C/1,5 bar für 20 min autoklaviert. Ampicillin wurde nach dem Abkühlen dazugegeben.

SOB-Medium

2% (w/v) Trypton
1% (w/v) Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl

ad H₂O_{ad inject.}, autoklavieren und anschließend

10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄

dazugeben.

SOC-Medium

2% (w/v) Trypton
1% (w/v) Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl

ad H₂O_{ad inject.}, autoklavieren und anschließend

10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
2 mM Glucose

dazugeben.

b) Medien für die Zellkultur**DMEM**

Dulbecco's Modified Eagle's Medium
High Glucose (Gibco, BRL, Eggenstein)

RPMI 1640

Rosewell Park Memorial Institute Medium
(Gibco, BRL, Eggenstein)

L-15

Leibovitz Medium
(Gibco, BRL, Eggenstein)

Einfriermedium

DMEM
20% (v/v) FCS
10% (v/v) DMSO

2.1.5 Lösungen

Als Lösungsmittel wurde biionisiertes H₂O verwendet.

Ammoniumpersulfat (APS)

Stammlösung 10% (w/v)

Ampicillin-Lösung

60 mg/ml Stammlösung

Auftragspuffer (Agarose-Gelelektrophorese), 6-fach

30% (v/v) Glycerin
0,2% (w/v) SDS
0,05% (w/v) Bromphenolblau
0,05% (w/v) Xylencyanol in TAE

Auftragspuffer (SDS-PAGE), 3-fach

1,75 ml Sammelgelpuffer
1,5 ml Glycerin
5 ml SDS (10%)
1,25 ml Bromphenolblau
100 mM DTT

Blockierungspuffer für ELISA/Dot

0,03% Fettarme Milch (Walmart)

Bromphenolblau

Stammlösung 0,1% (w/v) in EtOH

DTT-Lösung

Stammlösung 1M
pH 5,2

Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)

1 M Tris-HCl
0,45% (w/v) Glycerin
0,1% (w/v) SDS
pH 8,8

Ethidiumbromid-Lösung

Stammlösung 10 mg/ml

Natriumacetat-Puffer

3 M NaCH₃CO₂
pH 4,8

Natriumhydrogencarbonatpuffer (Coating)

150 mM NaHCO₃ pH 8,5

PBS-Puffer pH 7,4 / pH 7,2

10 mM Na₂HPO₄
130 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,5 mM KH₂PO₄

Polybrene[®]

Stammlösung 1,6 mg/ml

Sammelgel (SDS-PAGE) 4% (v/v)

3 ml H₂O_{bide}st.
1,25 ml Sammelgelpuffer
0,65 ml Acrylamid (Gel 30)
50 µl SDS (10%)
50 µl APS (10%)
2,5 µl TEMED

Sammelgelpuffer, 4-fach

0,5 M Tris-HCl
pH 6,8

TAE-Puffer, 10fach

890 mM Tris-HCl
5,7% (v/v) Essigsäure
20 mM EDTA
pH 8,0

TBE-Puffer, 5-fach

445 mM Tris-HCl
445 mM Borsäure
10 mM EDTA
pH 8,0

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl
0,5 mM EDTA
pH 8,0

Transferpuffer (Western Blot)

20% (v/v) Methanol
10 mM Tris-HCl
10 mM Glycerin
pH 8,6

Trenngel (SDS-PAGE) 10%

3,71 ml H₂O_{bidest.}
3,5 ml Trenngelpuffer
1,79 ml Acrylamid (Gel 30)
100 µl SDS (10%)
100 µl APS (10%)
7,5 µl TEMED

Trenngelpuffer, 4-fach

1,5 M Tris-HCl
pH 8,8

Trypanblau-Lösung

0,5% (w/v) Trypanblau
0,9% (w/v) Natriumchlorid

Waschpuffer

1% (w/v) Tween-20
1% (w/v) BSA in PBS
pH 7,4

X-Gal-Lösung

Stammlösung 300 mM in Diethylformamid

2.1.6 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
Anti-gp120 (Maus)	Heiner Schaal (Düsseldorf)
Anti-HIV-1-p24, D7320	Biochrom (Berlin)
Anti-HIV-1-p24, Serum (Kaninchen)	H.-G. Kräusslich (Heidelberg)
Anti-HSA (Ziege)	Sigma-Aldrich (München)
Anti-Kaninchen-IgG, alkalisch. Phosphatase (Ziege)	Sigma-Aldrich (München)
Anti-Maus-IgG, Meerrettich-Peroxidase (Ziege)	Amersham (Braunschweig)

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Abdeckfolie	Millipore (Eschborn)
Amicon [®] -Zentrifugen-Röhrchen	Millipore (Eschborn)
Bakterienkulturschalen	Greiner (Solingen)
Blot-Papier	Amersham (Braunschweig)
Cellulose-Membran (³ H-Thymidin)	Pharmacia Amersham (UK)
Dispensertips, div.	Eppendorf (Hamburg)
Einmalspritzen, div.	Braun (Melsungen)
Einwegpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner (Solingen)
Gewebekulturplatten 6-, 48-, 96- <i>well</i>	Nunc (Wiesbaden)
Gewebekulturplatte MAXIsorb, 96- <i>well</i>	Nunc (Wiesbaden)
Gewebekulturschale Ø 5 cm, 10 cm	Nunc (Wiesbaden)
Falcon-Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner (Solingen)
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Parafilm	American National Can TM (USA)
Pipettenspitzen, gestopft 10µl, 20µl, 100µl, 1000µl	Biozym (Hess.Oldendorf)
Pipettenspitzen 100 µl	Roth (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym (Hess.Oldendorf)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf (Hamburg)
Schraubdeckelröhrchen 1,8 ml	Nunc (Wiesbaden)
Sephadex [®] -Elutionssäule	Amersham Pharmacia (UK)

Skalpell, Cutfix® 15	Braun (Tuttlingen)
Sterilfilter 0,2 µm, 0,45 µm	Satorius (Göttingen)
Tiefgefrieröhrchen	Nunc (Wiesbaden)
Zellkulturflaschen 25 cm ³ , 75 cm ³	IBS (Fernwald)
Zellschaber	Greiner (Solingen)

2.1.8 Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
β-Counter (Wallac MicroBeta® TriLux)	PerkinElmer (Rodgau)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Canon EOS D30	Canon (Deutschland)
Canon EOS D10	Canon (Deutschland)
Elektrophoreseanlage Miniprotean	BioRad (München)
Elektrophoreseanlage HORIZON 58	BLR (Bethesda, USA)
Neubauer-Zählkammer; Tiefe 0,1 mm	Brand (Wertheim)
Laborwaage	Satorius (Göttingen)
Lichtmikroskop	Leitz (Wetzlar)
Magnetrührer	Ikamag (Staufen)
Milli-Q-Plus	Millipore (Eschborn)
pH-Meter, CG840	Schott (Mainz)
Photometer Lambda E	MWG-Biotech (Ebersberg)
Quarzküvetten	Hellma (Jena)
Spektrophotometer UV-160A	Shimadzu (Hamburg)
UV-Geldokumentationsgerät	Kodak Deutschland
Videodokumentation UP-895 CE	Sony Deutschland
Wasserbad GFL	GFL (Burgwedel)
Zell-Harvester	Inotech (Dottikon, Schweiz)
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge ROTANTA/R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Superfuge 22	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)

2.1.9 Verwendete Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pNL4-3	Svenja Polzer, BNI
pNL-991	Svenja Polzer, BNI
pgp160 _{NL4-3}	Heiner Schaal, Düsseldorf
pgp160 _{NL-991}	Heiner Schaal, Düsseldorf
pgp160 _{NL-952}	Heiner Schaal, Düsseldorf
pgp160 _{NL-952-g15}	Heiner Schaal, Düsseldorf

Die oben aufgeführten Plasmide pNL4-3 und pNL-991 dienen zur Herstellung rekombinanter HIV-1 Viruspartikel. Das Plasmid pNL4-3 codiert den X4-tropen HIV-1 Stamm NL4-3. Bei pNL-991 wurde der V3-loop des NL4-3 Virus gegen den V3-loop eines Patientenisolats PI-991 ausgetauscht, wodurch auch der Tropismus des Patientenisolats übernommen wurde. PI-991 ist ein R5-tropes Virus, das CCR5 als Korezeptor benutzt (Polzer *et al.*, 2002).

Die Plasmide pgp160_{NL4-3} und pgp160_{NL-991} dienen zur Expression des gp120/gp41 in den HeLa-P4-CXC4-CCR5-Zellen. Das Plasmid pgp160_{NL4-3} codiert für das gp160 (gp120/gp41) des X4-tropen HIV-1 Virus NL4-3, pgp160_{NL-991} codiert für das gp160 (gp120/gp41) des R5-tropen Virus NL-991. Das Plasmid pgp160_{NL-952} codiert für das gp160 des dualtropen (R5-/X4-trop) Virus NL-952. Der NL-952-Variante NL-952-g15 fehlt die Zuckerstruktur an Position 15 im V3-Loop des gp120.

2.2 Methoden

2.2.1 Chemikalische Methoden

2.2.1.1 Herstellung der HOCl-modifizierten Proteine

Die folgenden Proteine **H**umanes **S**erum **A**lbumin (HSA), **B**ovines **S**erum **A**lbumin (BSA), **M**urines **S**erum **A**lbumin (MSA), **P**orcines **S**erum **A**lbumin (PSA), Transferrin, β -Galaktosidase und Gluthation-S-Transferase-V3 (GST-V3) wurden mit hypochloriger Säure modifiziert.

Die Proteine (Konzentration 1 mg/ml) wurden in PBS pH 7,4 gelöst und mit unterschiedlichen Mengen von frisch hergestellter HOCl-Lösung pH 7,4 (Natriumhypochlorit (NaOCl); Sigma, verdünnt mit PBS pH 7,4 1:100) in einem Becherglas versetzt und 30 min auf Eis gerührt. Die NaOCl-Stammlösung (Konzentration an hypochloriger Säure etwa 13%, nach Angaben des Herstellers Sigma) musste mit PBS pH 7,4 verdünnt werden, da sonst die Konzentrationsmessung mit dem UV-Meter nicht möglich gewesen wäre. Die HOCl-Lösung wurde bei jedem Reaktionsansatz frisch hergestellt, da es bei längerer Lagerung der Lösung zur Disproportionierung von Hypochlorit zu Chlor und Chlorid und deshalb zu erheblichen Schwankungen des pH-Wertes und der Konzentration an HOCl kommt.

Bei pH 7,4 liegen $\text{HOCl}/\text{OCl}^\ominus$ im Gleichgewicht vor (Morris 1966). Die HOCl-Konzentration wurde mit dem UV-Meter bei einer Wellenlänge von $\lambda = 292 \text{ nm}$ nach folgender Formel berechnet:

$$c_{[\text{OCl}^\ominus]} = E / 350 \text{ mol x l}^{-1}$$

E = Absorption bei $\lambda = 292 \text{ nm}$ (Absorptionskoeffizient $\epsilon_{292\text{nm}}=350 \text{ l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$)

Anschließend wurde das Protein-Säure-Gemisch über eine Kationensäule (Sephadex PD-10, Amersham Pharmacia) gegeben, um überschüssige hypochlorige Säure durch die Gelfiltration abzufangen. Die modifizierten Proteine wurden mit PBS pH 7,4 eluiert und dem Protokoll des Herstellers folgend mit 50 mM PBS pH 7,4 resuspendiert.

Das Eluat wurde anschließend in Amicon[®]-Zentrifugen-Röhrchen (Amicon[®] Ultra-15, Millipore) ultrazentrifugiert und so aufkonzentriert (Zentrifugation 20 min bei 4°C und 4000^{-min}, Eppendorf 5804R). Abschließend wurde die Konzentration der HOCl-modifizierten Proteine bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.1.2), die Protein-Lösung steril filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine (Smith *et al.*, 1985)

Die Konzentration der Proteinlösungen wurde durch den BCA-Test bestimmt. Proteine bilden in alkalischer Lösung mit Kupferionen (Cu²⁺) einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu²⁺-Ionen des Komplexes werden wahrscheinlich zu Cu⁺-Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Komplex bilden (Wiechermann *et al.*, 1988). Die Konzentrationsbestimmung wurde mit den Reagenzien des Herstellers Pierce (BCA Protein Assay Reagent Kit) durchgeführt. 25 µl der jeweils zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 200 µl der frisch hergestellten Färbelösung auf einer 96-well Mikrotiterplatte versetzt, mit einer Abdeckfolie verschlossen und 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Proben im UV-Meter ($\lambda = 560 \text{ nm}$, Photometer Lambda E) ausgewertet und die Konzentration gegen einen BSA-Standard bestimmt.

2.2.1.3 Massenspektroskopische Untersuchungen (MALDI-TOF)

Für die MALDI-TOF-Messungen wurde das Reflektor-Flugzeitmassenspektrometer ReflexTM mit Scout-Ionenquelle, 2-Bereichs-Ionenreflektor und 1 Ghz Digitalisierungsboard der Firma Bruker-Franzen-Analytik GmbH Bremen im linearen Modus benutzt. Die PSD-Spektren wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 28,5 kV mit einer 500 MHz-Sampling Rate erhalten. Für die MALDI-TOF-Probenpräparation wurde eine gesättigte Lösung von Sinapinsäure (Aldrich) in 39% Aceton, 60% Methanol und 1% TFA (v/v) als Basislayer verwendet. Von dieser Lösung wurden 2 µl auf dem Probenträger eingedunstet. 1 µl der Probe wurde mit einer zweiten Lösung von Sinapinsäure in 30% Acetonitril, 20% Methanol und 50% Wasser (v/v) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf den Basislayer aufgetragen. Nach Verdunsten des Lösungsmittels wurde mit der Messung begonnen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung der Bakterien

Bakterien wurden in flüssigem LB-Medium oder auf LB-Agarplatten (ggf. Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml)) kultiviert.

Die Bakterien wurden im gefrorenen Zustand (siehe Abschnitt 2.2.2.2) auf eine LB-Platte gestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert und vereinzelt. Am folgenden Tag wurde eine Einzel-Kolonie der Bakterien in 3 ml flüssiges LB-Medium überführt und 16 h lang in einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension stand nun für weitere Versuche oder Anzucht größerer Mengen an Bakterien in größeren Volumina zur Verfügung.

2.2.2.2 Lagerung der Bakterien

Zur Lagerung von Bakterien wurden 812 µl einer 3 ml Bakteriensuspension (siehe Abschnitt 2.2.2.1) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 188 µl 80% (v/v) Glycerin gemischt. Das Gefäß wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Zur kurzfristigen Lagerung wurde eine mit Parafilm verschlossene LB-Agarplatte im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.3 Herstellung von kompetenten Bakterien

Die meisten Bakterien sind nicht in der Lage, fremde DNA aufzunehmen. Aus diesem Grund werden Bakterien für die Aufnahme fremder DNA kompetent gemacht (Inoue *et al.*, 1990).

Eine Einzelkolonie des Bakterienstammes *Escherichia coli XL1-blue* wurde in 5 ml LB-Medium übertragen und 16 h lang in einem Schüttler bei 37°C inkubiert (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Nach 24 h wurden 2,5 ml dieser Vorkultur in 250 ml vorgewärmtes SOB-Medium gegeben und in einem Schüttler bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend absedimentiert (2500 min⁻¹, 10 min, 4°C, Suprafuge 22, Rotor HFA 14.290, Heraeus), vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien

wurden anschließend erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert (2500 min^{-1} , 10 min, 4°C , Suprafuge 22, Rotor HFA 14.290, Heraeus), der Überstand abgenommen und in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Abschließend wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% (v/v) dazugegeben und 10 min lang auf Eis inkubiert.

Zur Lagerung wurden $400 \mu\text{l}$ der Bakteriensuspension in sterile $0,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäße überführt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2.4 Transformation von *E.coli* (Hanahan, 1983)

Unter Transformation versteht man das Einbringen von fremder DNA in Bakterien. Zu $100 \mu\text{l}$ einer Zellsuspension kompetenter Bakterien (siehe Abschnitt 2.2.2.3, Seite 31) wurde die zu transformierende Plasmid-DNA (1 - 100 ng) gegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Hitzeschockreaktion (1,5 min bei 42°C) - in dieser Zeit wurde die fremde DNA in die kompetenten Zellen aufgenommen - wurden die Bakterien mit $500 \mu\text{l}$ LB-Medium versetzt und 45 min zur Ausbildung der Resistenz bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 30 s bei 13000 min^{-1} zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus), der Überstand abgenommen und die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Diese wurden auf eine YT-Agarplatte ($100 \mu\text{l/ml}$ Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.2.5 Isolierung der Plasmide

Die Gewinnung und Isolierung von Plasmiden aus den Bakterien (*Escherichia coli* XL-1 blue) erfolgte modifiziert nach dem Verfahren der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Die Plasmid-DNA wurde aus einer LB-Bakterienkultur (250 ml) (siehe Abschnitt 2.2.2.1, Seite 31) isoliert. Hierzu wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen dem Protokoll des Herstellers folgend verwendet.

2.2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Plasmid-DNA Konzentration und auch die Qualität der Probe wurde spektroskopisch mit dem UV-Meter bestimmt. Bei der Messung wurde die Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen. DNA hat bei einer Wellenlänge von 260 nm ein charakteristisches Absorptionsspektrum, Proteine bei 280 nm. Eine Extinktion von 1,0 bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$, einer ssDNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ und einer RNA-Konzentration von 33 $\mu\text{g/ml}$. Durch den Quotienten der OD $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ lässt sich die Reinheit einer DNA-Probe bestimmen. Eine saubere DNA-Probe sollte einen Quotienten $> 1,8$ besitzen. Die DNA-Probe wurde 1:100 mit TE-Puffer verdünnt und in einer Quarzküvette bei beiden Wellenlängen mit dem UV-Meter (Spektrophotometer UV-160A, Shimadzu) gemessen.

2.2.2.7 DNA-Analyse mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen innerhalb einer dsDNA und spalten diese hydrolytisch. Zum Nachweis der Plasmide wurde die dsDNA mit bestimmten Restriktionsenzymen versetzt und hydrolytisch geschnitten. Die entstandenen Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.2.8, Seite 34).

Für einen üblichen Ansatz (10 μl) wurden folgende Reagenzien verwendet:

- 1 μl 10x Puffer (für das jeweilige Enzym vom Hersteller vorgegeben)
- 1-2 μg DNA
- 2 Units Restriktionsenzym/ μg DNA
- ad 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{ad inject.}}$

Der Reaktionsansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert (Biofuge pico) und bei der für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionstemperatur (meist 37°C) 1 - 2 h inkubiert.

2.2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von verschiedenen DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe.

Die Trennung der Fragmente aus dem Enzymverdau erfolgte in horizontalen 0,8 - 2,5%-Agarosegelen. Dazu wurde 0,8 - 2,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen der Lösung 5 μ l Ethidiumbromid-Lösung dazugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert (orange) bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm). Dadurch wird die DNA im Gel sichtbar gemacht. Die noch flüssige Lösung wurde in eine vorbereitete Gelelektrophoresekammer mit aufgesetztem Kamm gefüllt und ausgehärtet. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen Auftragspuffer versetzt und in die Auftragstaschen des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung wurden jeweils 3 μ l eines Molekulargewichtsmarkers verwendet. Bei einer angelegten Spannung von 60 - 100 Volt (45 min) wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese auf einem UV-Tisch bestrahlt ($\lambda = 254$ nm) und mit einer Videokamera dokumentiert und anschließend ausgewertet.

2.2.2.9 Elution der DNA

Um die DNA aus einem Agarosegel (siehe Abschnitt 2.2.2.8) zu eluieren, wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) sichtbar gemacht und die DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die DNA wurde mit dem *NucleoSpin-Extract Kit* (Machery-Nagel) aus dem Gel eluiert (modifiziert nach Blin *et al.*, 1975) und anschließend sequenziert (siehe 2.2.2.10).

2.2.2.10 Sequenzierung der DNA (Sanger *et al.*, 1977)

Die Durchführung der Sequenzierung von DNA beruht auf der Didesoxymethode von Sanger (1977).

Die Sequenzierung erfolgte hier in einem Thermocycler mit dem CEQ™ *Dye Terminato Cycles Sequencing Kit* den Angaben des Herstellers folgend und wurde anschließend mit dem CEQ™2000 DNA Analyse System ausgewertet.

2.2.2.11 Lagerung der DNA

Zu 10 µg DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 100 µl H₂O_{bidest.} gegeben und anschließend 1/10 Volumenanteile 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 Volumenanteile Ethanol (96%) hinzugefügt. Die Lösung wurde gut gemischt und bei -20°C gelagert. Zur Wiederverwendung der DNA wurde die Lösung 15 min bei 4°C mit 13000 min⁻¹ zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus) und mit 200 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit TE-Puffer gelöst.

2.2.2.12 Natriumdodecylsulfat-(SDS-)Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Größenauftrennung von Proteinen. Die SDS-PAGE wurde hier modifiziert nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Zur besseren Trennung der Proteine wurde eine Kombination aus einem 4% (v/v) Sammelgel und einem 10% (v/v) Trenngel gewählt.

Die Gelelektrophoreseanlage wurde vorbereitet und das Trenngel nach der Zugabe von N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin und Ammoniumpersulfat luftblasenfrei zwischen die beiden Glasscheiben gefüllt. Zur Bildung einer glatten Oberfläche wurde das Trenngel mit H₂O_{bidest.} überschichtet und nach der Polymerisierung des Gels wieder entfernt. Danach wurde das Sammelgel luftblasenfrei auf das Trenngel aufgefüllt und der Kamm für die Bildung der Auftragstaschen aufgesteckt. Nach der Polymerisierung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer (Biorad) eingebaut. Die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer befüllt und die vorbereiteten Proben in die Auftragstaschen gefüllt. Das Gel lief bei einem Strom von 30 mA (bei Verwendung von zwei Gelen), wobei die Spannung von 80 V auf 200 V stieg. Erreichte die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Gels, wurde die Elektrophorese gestoppt.

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend im Polyacrylamidgel mit Coomassie Blau-Färbung sichtbar gemacht oder mit Hilfe eines Western-Blots (siehe Abschnitt 2.2.2.13, Seite 36) auf eine Membran transferiert und auf dieser detektiert.

2.2.2.13 Western-Blot

Der Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) wird im Anschluss an eine SDS-PAGE durchgeführt, um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Antikörper oder Färbemethoden nachzuweisen. Die Proteine werden dabei aus einem Gel elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran übertragen.

Das Polyacrylamidgel (siehe Abschnitt 2.2.2.12, Seite 35) wurde vorsichtig auf eine mit Transferpuffer angefeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt und mit jeweils drei Schichten mit Transferpuffer durchdrängten Filterpapiers ummantelt. Dieser Komplex wurde in die ebenfalls mit Transferpuffer gefüllte Blotanlage gespannt und bei 90 mA über einen Zeitraum von 90 min bei eingeschalteter Kühlung geblottet. Beim Blotten wurde darauf geachtet, dass sich die Nitrocellulosemembran zwischen dem Gel und der Kathode befindet.

Die transferierten Proteine wurden anschließend angefärbt (Silberfärbung oder Ponceau S-Färbung) oder mit Enzym-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen und sichtbar gemacht. Bei Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde die Membran über Nacht mit Blockierungspuffer inkubiert und am folgenden Tag dreimal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Danach wurden für 30 min die entsprechenden Antikörper (geeignete Arbeitskonzentration) auf die Membran gegeben und anschließend wieder dreimal kurz mit PBS pH 7,4 abgewaschen. Um den Antikörper zu detektieren, wurde ein anti-Antikörper gekoppelt mit alkalischer Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase eingesetzt.

Die Proteine wurden auch nicht-elektrophoretisch auf die Nitrocellulose-Membran aufgetragen. Dabei wurde die Proteinlösung (in PBS pH 7,4) auf die Membran mit der Pipette aufgetropft und anschließend durch Antikörper nachgewiesen (*dot-blotting*).

2.2.3 Methoden der Zellkultur

Die Kultivierung und das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen erfordert ein hohes Maß an Reinheit und Sterilität. Die Medien, Geräte und hitzebeständigen Lösungen wurden hierfür autoklaviert, nicht-hitzebeständige Lösungen steril filtriert.

2.2.3.1 Kultivierung der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen (siehe Abschnitt 2.2.3.8, Seite 40) wurden durch Handwärme aufgetaut und unter der Sterilbank in mit 10 ml DMEM (+ 20% (v/v) FCS und Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml)) gefüllten 25 cm³-Zellkulturflaschen überführt. Nach 4 - 8 h wurde das Medium durch frisches, erwärmtes Medium (+ 10% FCS (v/v)) ersetzt.

Die beiden HeLa-Zelllinien (siehe Abschnitt 2.1.2, Seite 20) wurden in DMEM + 10% (v/v) FCS und Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml) kultiviert, die humanen Osteosarcoma-Zellen (GHOST/parenteral, GHOST-HI5, CHOST-CXCR4) in DMEM + 10% (v/v) FCS. Die Korezeptor-tragenden Zellen wurden in Abständen von 12 Wochen mit Puromycin (1 µg/ml) selektiert. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und H₂O-gesättigter, 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Vero-B4-Zellen wurden in Leibovitz L-15 Medium (+ 10% (v/v) FCS und Penicillin-Streptomycin 50 µg/ml) in einem Brutschrank bei 37°C ohne CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.2.3.2 Trypsinieren von adhärennten Zellen

Adhärennt wachsende Zelllinien bedecken nach einiger Zeit die gesamte Oberfläche der Zellkulturflasche, wodurch die Eigenschaften der Zellen beeinflusst werden können. Deshalb wurden die Zellen etwa zweimal pro Woche mit Trypsin abgelöst, mit Medium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt.

Das Medium der Zellen wurde entfernt und die Zellen zweimal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Anschließend wurden 1 - 3 ml Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben und für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit Medium verdünnt (1:4 bis 1:8) und in neue Zellkulturflaschen pipettiert.

2.2.3.3 Zellzahlbestimmung und Vitalität der Zellen

Um die Anzahl der Zellen in einer Kulturflasche zu bestimmen, wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst (siehe Abschnitt 2.2.3.2, Seite 37) und mit DMEM oder Leibovitz-Medium je nach Zelldichte verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden 20 μl entnommen und in 80 μl Trypanblaulösung gegeben (Verdünnung 1:5). Danach wurden 10 μl dieser gefärbten Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert (Tiefe 0,1 mm) und die Zellen in vier Großquadraten mit dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen pro ml in der DMEM-Suspension/Leibovitz-Suspension ergibt sich aus folgender Formel:

$$\frac{\text{Ausgezählte Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} \times 5 (\text{Verdünnung}) \times 10^4 = \text{Zellen} \times \text{ml}^{-1}$$

Mit dieser Methode wurde ebenfalls der Zustand (Vitalität) der Zellen kontrolliert. Dabei wird zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden. Lebendige Zellen sind in der Lage den Farbstoff Trypanblau aus der Zelle zu entfernen, abgestorbene Zellen resorbieren den Farbstoff und erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau. Das Verhältnis Ungefärbte Zellen / Blaue Zellen gibt also den Zustand der Zellkultur wieder.

2.2.3.4 Transfektion der Zellen

Für die Transfektion von Zellen mit DNA wurde das FuGENE[®]6-Transfektionsreagenz der Firma Roche den Angaben des Herstellers folgend verwendet.

Zur Transfektion wurden 2×10^4 HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen pro *well* in 96-*well*-Kulturplatten ausgesät ($1 - 3 \times 10^5$ Zellen pro 6-*well*-Zellkulturplatten). Am folgenden Tag wurden jeweils 5 μl des Transfektionsansatzes (94 μl DMEM mit 6 μl FuGENE[®]6-Reagenz wurden bei Raumtemperatur 5 min inkubiert und mit 1 - 3 μg einzubringender DNA gemischt) tropfenweise auf die Zellen (pro *well*) pipettiert und danach mit 100 μl Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.3.5 Lyse der Zellen

Die mit den Plasmiden transfizierten Zellen wurden mit 1 ml Lyse-Puffer überschichtet und 30 min auf Eis lysiert. Die Zellen wurden alle 5 min geschwenkt. Das Lysat wurde 30 min bei 4°C mit 13000 min^{-1} (Biofuge pico, Hamburg) zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.3.6 Populationsverdopplungstest von HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen

Es wurden jeweils 2×10^5 HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen in 1 ml Medium pro *well* in zwei 24-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde *pro well* HSA auf die eine und auf die zweite Platte HOCl-modifiziertes HSA-Protein (Konzentrationen jeweils 200 µg/ml) zu den Zellen gegeben und eine Woche lang im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle 24 h wurden in jeweils drei *wells* die Zellen durch Trypsin/EDTA (0,2 - 0,4 ml) abgelöst und anschließend die Zellzahl ohne Anfärben mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.3.7 Anfärben der Zellen

Zum Anfärben wurden jeweils 2×10^4 HeLa-P4-CXCR4-CCR5- oder GHOST-Zellen (GHOST-CXCR4, GHOST-HI5) in 96-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und nach 24 h HSA oder HOCl-modifiziertes HSA-Protein in verschiedenen Konzentrationen (Konzentrationen von 1 µg/ml bis 200 µg/ml) dazugegeben. Nach 56 h Inkubation der Zellen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden die Zellen einmal mit PBS pH 7,2 gewaschen und danach 1 min mit Methanol oder Lösung 1 der Hemacolor®-Schnellfärbung fixiert. Anschließend wurden 100 µl Lösung 2 der Hemacolor®-Schnellfärbung *pro well* zu den Zellen pipettiert, die Lösung nach 30 s abgetropft und 100 µl Lösung 3 der Hemacolor®-Schnellfärbung für weitere 30 s auf die Zellen gegeben. Nach diesem Arbeitsschritt wurden die Zellen mehrmals mit destilliertem H₂O ausgewaschen und abschließend mit PBS pH 7,2 gespült. Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop beobachtet und bildtechnisch dokumentiert.

2.2.3.8 Lagerung der Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA in einer dichtgewachsenen Zellkultur abgelöst (siehe Abschnitt 2.2.3.2, Seite 37), die erhaltene Zellsuspension durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 500 min⁻¹, Zentrifuge 5804R, Eppendorf), der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellpellets wurden mit Einfriermedium (Verhältnis Zellpellets:Einfriermedium 1:5) resuspendiert. Diese Suspension wurde in *Nunc*-Röhrchen (1,8 ml) pipettiert, wieder zentrifugiert und der Überstand bis zur 1 ml-Markierung abgenommen und verworfen. Die 1 ml *Aliquots* wurden im Kühlschrank erst vorgekühlt (4°C) und dann in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.4 Virologische Methoden

HIV-1 wird in die Risikogruppe 3 eingestuft (§ 5 Abs. 6 GenTSV). Alle Arbeiten mit aktiven Viren oder Organismen, die ein vollständiges Genom von HIV-1 tragen, wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe L3/S3 am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg oder in einem L3/S3-Labor am Hygieneinstitut in Heidelberg durchgeführt.

2.2.4.1 Kultivierung der Viren

Für die Kultivierung der Viren wurde die entsprechende Vektor-DNA (siehe Abschnitt 2.1.9, Seite 28) in Hela-P4-CXCR4-CCR5-Zellen transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.3.4, Seite 38) und die Kultur vier Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Während dieser Zeit produzierten die transfizierten Zellen Viren, die ihrerseits wieder andere Zellen infizieren und einen neuen Replikationszyklus beginnen können. Nach der Inkubation wurde der Zellüberstand abgenommen, zentrifugiert (5 min, 1200 min⁻¹, Rotantar/R, Rotor 5094A) und der nun virushaltige, zellfreie Überstand in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert (siehe Abschnitt 2.2.4.4, Seite 44). Die Viruskonzentration des Überstandes wurde mit Hilfe des p24-Immunoassay (siehe Abschnitt 2.2.4.3, Seite 43) bestimmt und die gewünschte Viruskonzentration für die Infektionsversuche (siehe Abschnitt 3.6, Seite 74) mit Medium eingestellt.

2.2.4.1 Bestimmung der TCID₅₀

Die TCID₅₀ (*tissue culture infective dose*) gibt an, welches Volumen eines Virusüberstandes benötigt wird, um mit 50%iger Wahrscheinlichkeit eine Zellkultur zu infizieren.

Für jeden Virusüberstand wurde in einer sechsfachen Verdünnungsreihe die Verdünnung bestimmt, bei der eine Infektion der jeweiligen Zellkultur nach 48 h nachzuweisen war. Die Berechnung wird an folgendem Beispiel erläutert:

Ansatz	Verdünnung				
	5^{-4}	5^{-5}	5^{-6}	5^{-7}	5^{-8}
1	x	x	x	-	-
2	x	x	x	-	-
3	x	x	x	-	-
4	x	x	x	x	-
5	x	x	x	x	-
6	x	x	x	-	-

x = Infektion - = keine Infektion

Bis zu einer Verdünnung des Virusüberstandes von 5^{-6} ist in allen sechs Ansätzen ein Infektion zu detektieren, bei 5^{-7} ist in zwei Ansätzen eine Infektion zu sehen, bei 5^{-8} in keinem der Ansätze. Die Berechnung der $TCID_{50}$ erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$$\log TCID_{50} = \log 1,0 - \log \text{int } x (S - 0,5)$$

$\log 1,0$ = \log der höchsten Verdünnung mit $R = 1,0$ R = Reaktionsrate

$\log \text{int}$ = \log des Verdünnungsintervalls

S = Summe der Reaktionsraten

Die Reaktionsraten geben den Anteil der infizierten Ansätze einer Verdünnungsstufe von der Gesamtzahl der Ansätze an. In obigem Beispiel sind die Reaktionsraten $R = 1,0$ (6/6) für die Verdünnung 5^{-6} , $R = 0,33$ (2/6) für die Verdünnung 5^{-7} und für 5^{-8} ergibt sich $R = 0$ (0/6). Die Summe der Reaktionsraten S beträgt somit $S = 1,33$. Der Wert für $\log 1,0$ beträgt $\log 5^{-6} = -4,19$, der Wert für $\log \text{int}$ beträgt für den gewählten Verdünnungsfaktor 5 $\log 5 = 0,699$.

Durch Einsetzen in die obige Formel wird folgendes Ergebnis erhalten:

$$\log TCID_{50} = -4,19 - 0,699 \times (1,33 - 0,5)$$

$$\log TCID_{50} = -4,77$$

$$TCID_{50} = 1,70 \times 10^{-5}$$

Die $TCID_{50}$ des Virusüberstandes aus diesem Beispiel beträgt damit $1,7 \times 10^{-5}$.

2.2.4.3 p24-Antigen Enzym-gebundener Immunoassay (ELISA)

Der p24-Antigen Nachweis dient der Quantifizierung der HI-Viruspartikel in einer Kultur. Als Indikator wird hierbei das HIV-Capsidprotein p24 verwendet. Die Menge der Viren in einer Viruskultur ist proportional zur Menge des Capsidproteins p24 (p24-Antigen Äquivalent).

Eine 96-*well*-Mikrotiterplatte (MAXIsorb) wurde mit je 100 µl eines anti-HIV-p24-Antikörpers (10 µg/ml Natriumhydrogencarbonat-Puffer) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und zum Blockieren der restlichen Oberfläche mit je 300 µl Blockierungspuffer/*well* befüllt. Nach 2 h Inkubation bei 4°C wurde die Platte einmal mit Waschpuffer gewaschen, mit je 100 µl der zu untersuchenden Kulturüberstände befüllt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Bindung des p24-Antigens des Überstandes an den an die Platte gebundenen Antikörper wurde die Mikrotiterplatte wieder sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl eines anti-HIV-Kaninchenserums (1:2000 Verdünnung mit Blockierungspuffer) pro *well* dazugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten sechs weitere Waschschriffe mit Waschpuffer. Danach wurden die *wells* 1 h lang bei Raumtemperatur mit je 100 µl einer Verdünnung (1:2000 in Blockierungspuffer) eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-Kaninchen IgG Antikörpers versetzt. Anschließend wurde dreimal mit Waschpuffer und dreimal mit H₂O_{bidest.} gewaschen.

Zum Nachweis des gebundenen p24-Antigens wurden je 100 µl p-Nitrophenylphosphat-Substratlösung nach Angaben des Herstellers (*Alkaline Phosphatase Substrate Kit*) in die *wells* gegeben und die Reaktion (gelbe Färbung) nach 5 - 10 min durch Zugabe von 100 µl 0,4 M NaOH-Lösung gestoppt. Die Menge an umgesetztem Substrat, die mit der Menge an gebundenem p24-Antigen korreliert, wurde mit einem UV-Meter bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm gemessen. Die Menge an p24-Antigen einer Viruskultur wurde durch den Vergleich mit einem Standard (standardisiertes p24-Protein (200 ng/ml)), der in einer halblogarithmischen Verdünnung bei der Bestimmung zusätzlich aufgetragen wurde, bestimmt.

2.2.4.4 Bluecell-Infektionstest

An Tag Null wurden $2,5 \times 10^3$ HeLa-TZM-bl-Indikator-Zellen (Wie *et al.*, 2002) pro *well* in 96-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Nach 24 h wurden die Zellen mit 500 infektiösen Einheiten der verschiedenen HIV-Stämme infiziert, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von HOCl-modifiziertem HSA-Protein (Konzentrationsbereich von 0 µg bis 100 µg) eine Stunde vorinkubiert wurden. Danach wurden die infizierten Zellen mit Medium wiederum bei 37°C und 5% CO₂ für drei Tage bebrütet.

Um 500 infektiöse Einheiten pro *well* zu erhalten, wurden die verschiedenen HIV-Stämme vorher austitriert. An Tag 4 wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Danach wurde für 20 min X-Gal-Lösung zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde wieder mit PBS gewaschen und die infizierten Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die Zellen enthalten als Reportergene Luciferase und β-Galaktosidase. Werden die HeLa-TZM-bl-Indikator-Zellen infiziert, färben sich diese durch die X-Gal-Lösung blau.

Diese Versuche wurden während eines Aufenthalts am Hygiene-Institut in Heidelberg durchgeführt.

2.2.4.5 Lagerung der Viren

Um die Viren langfristig zu lagern, wurde der zellfreie Virusüberstand einer Viruskultur (siehe Abschnitt 2.2.4.1, Seite 41) als 100 - 400 µl *Aliquots* in 1,8 ml Tiefgefrieröhrchen pipettiert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.5 Methoden zur Toxizitätsuntersuchung

2.2.5.1 ³H-Thymidintest

In 96-*well*-Zellkulturplatten wurden 2×10^4 Zellen (HeLa P4-CXCR4-CCR5-, GHOST/parenteral-, GHOST-HI5-, GHOST-CXCR4- und Vero-Zellen (1×10^4 Zellen)) ausgesät und 24 h später HSA sowie die HOCl-modifizierte Proteine in verschiedenen Konzentrationen (Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 200 $\mu\text{g/ml}$) dazugegeben. Nach 48 h Inkubation der Zellen mit der Testsubstanz wurden 20 μl der verdünnten ³H-Thymidinlösung (1:10 Verdünnung mit Medium, entspricht 100 $\mu\text{Ci/ml}$) zu den Zellen (entspricht einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{Ci/ml}$) pipettiert. Nach weiteren 8 h Wachstum im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ (bei Vero-B4-Zellen 12 h und ohne CO₂-Zufuhr) wertete man die Einbaurrate des ³H-Thymidintest mit einem β -Counter (Wallac MicroBeta[®] TriLux, PerkinElmer) aus. Dazu wurden die Zellen mit einem Zell-Harvester (Inotech) auf eine spezielle Cellulose-Membran (Amersham Pharmacia) gesaugt und dreimal mit Wasser gewaschen. Der radioaktive Überstand wurde entsprechend entsorgt. Anschließend wurden die Membranen in einer Mikrowelle getrocknet, in Plastikfolie eingeschlagen, mit Szintillationsflüssigkeit getränkt und eingeschweißt. Die eingeschweißte Membran wurde danach in eine spezielle Schiene eingespannt, um die Membran bzw. die einzelnen *wells* mit den jeweiligen Zellen im β -Counter messen zu können. Die Einbaurrate wurde anschließend mit dem β -Counter (Messdauer 20 s) analysiert und ausgewertet.

2.2.5.2 Hämolyse von Erythrozyten

Menschliches Blut wurde von gesunden Spendern (M. Schreiber; M. Kirst) frisch erhalten, die Erythrozyten durch Zentrifugation (4000 min^{-1} , 5 min, Eppendorf 4578) abgetrennt und das Plasma vorsichtig mit einer Glaspipette aus dem Überstand entfernt. Anschließend wurden die roten Blutzellen mit PBS pH 7,2 solange gewaschen, bis der Überstand klar wurde. In RPMI 1640-Medium wurden die Erythrozyten bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Um zu untersuchen, ob die Erythrozyten durch zytotoxische Stoffe lysiert werden, wurden 20 μl -Zellpellets in 100 μl PBS pH 7,4 aufgenommen, anschließend 100 μl der zu untersuchenden Probe dazugegeben und mit der Pipette vermischt. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (Tischzentrifuge Biofuge pico, 30 sec, 4000 min^{-1}). Kommt es zur Lyse der roten Blutkörperchen, färbt sich der Überstand rot. Verantwortlich für die rote Färbung ist der Austritt des Hämoglobins aus den zerstörten Erythrozyten.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der HOCl-modifizierten Proteine

Die HOCl-modifizierten Proteine wurden wie unter 2.2.1.1 (siehe Seite 29) beschrieben hergestellt und aufgereinigt. Die Umsetzung der Proteine mit HOCl erfolgte in einem Becherglas. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei einer Temperatur von 4°C gerührt. Die Reaktion wurde zur Versuchsabänderung auch bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierdurch kam es zu keinerlei Veränderungen hinsichtlich der in dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaften der HOCl-modifizierten Proteine.

Es wurde jeweils ein 10 ml-Ansatz durchgeführt, d.h. zu 10 ml der Proteinlösungen (1 mg/ml) wurden verschiedene Mengen an frisch hergestellter HOCl-Lösung hinzugefügt. Damit wurden für die Umsetzung unterschiedliche molare Verhältnisse von Protein zu HOCl benutzt. Die Proteine wurden im molaren Verhältnis von 1:10 (Protein:HOCl), 1:20, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 und 1:10000 umgesetzt.

Die aufgereinigten HOCl-modifizierten Proteine wurden anschließend mit Hilfe der Ultrafiltration bis zu einer Konzentration von etwa 1000 bis 4000 µg/ml aufkonzentriert (siehe Abschnitt 2.2.1.1, Seite 29).

In Tabelle 3 (siehe Seite 48) sind die in dieser Arbeit hergestellten HOCl-modifizierten Proteine aufgelistet.

Aufgrund der Eigenschaft des HOCl-modifizierten HSA-Proteins, welches im molaren Verhältnis von 1:1000 mit HOCl umgesetzt wurde, an das Oberflächenprotein gp120 des HIV-1 zu binden (siehe Diskussion), wurde für dieses modifizierte Protein die Bezeichnung **Virus Envelope Bindendes Protein** (VEBP) ausgewählt.

Im folgenden wird daher das im molaren Verhältnis von 1:1000 mit HOCl umgesetzte HSA-Protein als VEBP bezeichnet.

Tabelle 3: Übersicht über die hergestellten HOCl-modifizierten Proteine

Proteine	Konzentration ^a	Hinzugefügte HOCl-Konzentration	Molares Verhältnis Protein : HOCl	Bezeichnung
HSA	147 nM	1,47 µM	1:10	mHSA _{1:10}
HSA	147 nM	2,9 µM	1:20	mHSA _{1:20}
HSA	147 nM	14,7 µM	1:100	mHSA _{1:100}
HSA	147 nM	29 µM	1:200	mHSA _{1:200}
HSA	147 nM	74 µM	1:500	mHSA _{1:500}
HSA	147 nM	147 µM	1:1000	VEBP
HSA	147 nM	1,47 mM	1:10000	mHSA _{1:10000}
BSA	147 nM	74 µM	1:500	mBSA _{1:500}
BSA	147 nM	147 µM	1:1000	mBSA _{1:1000}
MSA	147 nM	74 µM	1:500	mMSA _{1:500}
MSA	147 nM	147 µM	1:1000	mMSA _{1:1000}
PSA	147 nM	74 µM	1:500	mPSA _{1:500}
PSA	147 nM	147 µM	1:1000	mPSA _{1:1000}
Transferrin	125 nM	63 µM	1:500	mTF _{1:500}
Transferrin	125 nM	125 µM	1:1000	mTF _{1:1000}
GST-V3	333 nM	66 µM	1:200	mGST-V3 _{1:200}
β-Galaktosidase	86 nM	43 µM	1:500	mβGal _{1:500}
β-Galaktosidase	86 nM	86 µM	1:1000	mβGal _{1:1000}
β-Galaktosidase	86 nM	862 µM	1:10000	mβGal _{1:10000}

^a Konzentration der Proteine in einer 10 ml-Lösung (1 mg/ml in PBS pH 7,4)

3.2 Massenspektroskopische Analyse der HOCl-modifizierten Proteine

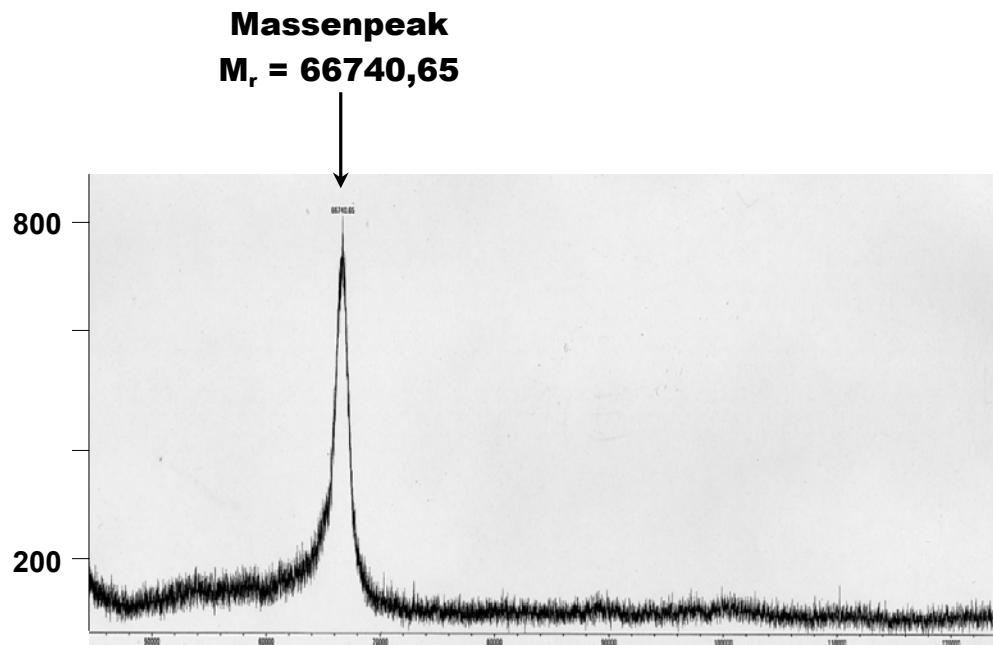
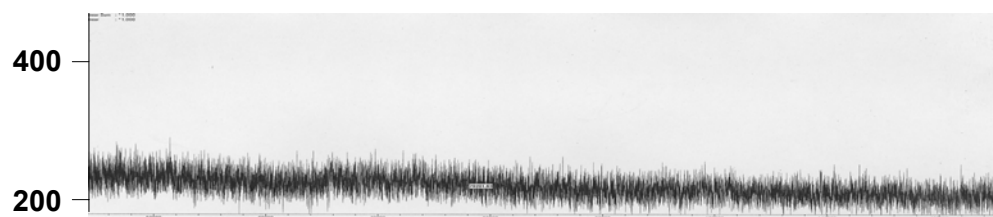
Zur Charakterisierung der HOCl-modifizierten Proteine wurden die unter 3.1 hergestellten Proteine massenspektroskopisch mit Hilfe der MALDI-TOF-Analyse (siehe Abschnitt 2.2.1.3, Seite 30) untersucht.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse wurden exemplarisch anhand der MALDI-TOF-Spektren von zwei unterschiedlich HOCl-modifizierten HSA-Proteinen in Abbildung 3 (Seite 50) dargestellt:

Im MALDI-TOF-Spektrum des HOCl-modifizierten HSA-Proteins mHSA_{1:10}, welches im molaren Verhältnis von 1:10 mit HOCl umgesetzt wurde, wurde ein scharfer Massenpeak (66740,65) beobachtet (siehe Abb. 3 A; Seite 50). Dieser entspricht annähernd dem Massenpeak, der für HSA zu erwarten ist.

Die massenspektroskopische Untersuchung des VEBP lieferte im Gegensatz dazu keine erkennbaren Massenpeaks im MALDI-TOF-Spektrum (siehe Abb. 3 B; Seite 50). Im Bereich des HSA-Molekulargewichts wurde zudem auch kein HSA-Peak beobachtet. Das in dieser Messung erhaltene Grundrauschen war in etwa gleich stark ausgeprägt wie das Grundrauschen bei der Messung des mHSA_{1:10} (siehe Abb. 3 A).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass sich die HOCl-modifizierten HSA-Proteine mHSA_{1:200}, mHSA_{1:500}, VEBP und mHSA_{1:10000} nicht mit der MALDI-TOF-Spektroskopie analysieren lassen. Dabei korreliert die Nichtdetektierbarkeit der HOCl-modifizierten Proteine, d.h. die Proteine können für die Messung nicht ionisiert werden, mit ihrer in dieser Arbeit beschriebenen antiviralen Aktivität. Die Masse des nichtaktiven HOCl-modifizierten HSA-Proteins mHSA_{1:10} hingegen konnte durch die MALDI-TOF-Spektroskopie bestimmt werden und betrug 66740,65 Da. Vergleicht man diese Masse mit dem Ergebnis der MALDI-TOF-Analyse für HSA (66774,24), so ergibt sich ein Unterschied von 3,59 Da. Dieser Unterschied könnte durch HOCl-bedingte Veränderungen am mHSA_{1:10}, wie z.B. Oxidation, zustande kommen.

A mHSA_{1:10}**B VEBP****Abb. 3: MALDI-TOF-Analyse von HOCl-modifizierten HSA-Proteinen**

Die beiden HOCl-modifizierten HSA-Proteine mHSA_{1:10} (Umsetzung Protein:HOCl im molaren Verhältnis 1:10) und VEBP wurden massenspektroskopisch mit Hilfe der MALDI-TOF-Analyse wie unter 2.2.1.3 (siehe Seite 30) beschrieben untersucht.

Abbildung **A** zeigt das MALDI-TOF-Spektrum von mHSA_{1:10}, Abbildung **B** das MALDI-TOF-Spektrum von VEBP.

3.3 Synzytienbildungstest zur Testung der antiviralen Eigenschaften der HOCl-modifizierten Proteine

Um die HOCl-modifizierten Proteine auf antivirale Eigenschaften zu testen, wurde ein Synzytienbildungstest etabliert.

Mit diesem Test wird der Viruseintritt in die Zellen untersucht (Schema des Testes siehe Abbildung 4, Seite 53). HeLa-Zellen, die stabil die Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 exprimieren, wurden entweder mit dem Expressionsvektor $\text{pgp160}_{\text{NL4-3}}$ oder $\text{pgp160}_{\text{NL-991}}$ transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.3.4, Seite 38). Diese beiden Vektoren exprimieren das gp120/gp41 des X4-tropen Virus NL4-3 bzw. des R5-tropen Virus NL-991. Das exprimierte gp120 unterscheidet sich nur im V3-Loop-Bereich.

Zur Kontrolle der gp120-Expression wurde ein Immunoblot der Zellen angefertigt. Die mit den Plasmiden transfizierten HeLa-Zellen wurden nach 3 Tagen lysiert (siehe Abschnitt 2.2.3.5, Seite 39). Anschließend wurden die Proteinbanden mit einer Gelelektrophorese aufgetrennt und ein Western-Blot durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.2.13, Seite 36).

Zum Nachweis der gp120-Bande wurde ein gp120-Antikörper (von Heiner Schaal, Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt) in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Dieser wurde durch einen mit Meerettich-Peroxidase gekoppelten anti-gp120-Detektionsantikörper (anti-Maus IgG, Verdünnung 1:1000) durch Chemilumineszenz-Detektion (Amersham) sichtbar gemacht (siehe Abbildung 5, Seite 54).

Der Immunoblot zeigte, dass das gp120 des Virus NL4-3 (siehe Abb. 5 E) und das gp120 des NL-991 (siehe Abb. 5 B) in den transfizierten HeLa-Zellen exprimiert wurde. Durch den gp120-Antikörper wurde auch die gp160-Bande der Expressionsvektoren sichtbar. Als Kontrolle wurden die HeLa-Zellen mit dem Plasmid pSVATGrev transfiziert (siehe Abb. 5 A).

Zur Ergänzung des Versuches wurden die HeLa-Zellen mit den Plasmiden $\text{pgp160}_{\text{NL-952}}$ und $\text{pgp160}_{\text{NL-952-g15}}$ transfiziert. Bei $\text{pgp160}_{\text{NL-952}}$ wurde das gp120/gp41 des dualtropen (X4/R5-trop) NL-952-Virus exprimiert (siehe Abb. 5 C). Das Virus NL-952-g15 (siehe Abb. 5 D) ist eine Variante des Virus NL-952, welcher an der Zuckerposition 15 im gp120 deglycolysiert ist und nur noch CXCR4 als Korezeptor benutzen kann.

Damit wurde gezeigt, dass die mit den Plasmiden pgp160_{NL4-3} oder pgp160_{NL-991} transfizierten HeLa-Zellen das entsprechende gp120 des X4-tropen Virus NL4-3 bzw. des R5-tropen Virus NL-991 exprimieren.

Nach der erfolgten Transfektion der HeLa-Zellen mit pgp160_{NL4-3} oder pgp160_{NL-991} wurden innerhalb eines Zeitraumes von 28 h Synzytien induziert.

Die Synzytienbildung ist in Abbildung 6 (Seite 55) dargestellt. Das von den HeLa-Zellen exprimierte gp120/gp41 des NL4-3 oder NL-991 interagiert mit dem Rezeptor CD4 und den Korezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 der umgebenden HeLa-Zellen. Die Zellen fusionierten untereinander und nach etwa 20 bis 28 h kam es zur Entstehung von Synzytien.

Die mit dem Plasmid pgp160_{NL4-3} transfizierten Zellen zeigten nach 28 h unter dem Lichtmikroskop (Phasenkontrastmikroskopie) in diesem repräsentativen Ausschnitt des Zellrasens zwei riesige Synzytien, die durch die Verschmelzung fast sämtlicher Zellen entstanden sind (siehe Abb. 6 A). Die beiden Synzytien weisen nach Zählung etwa 100 - 120 Zellkerne auf (siehe Vergrößerung Abb. 6 C).

Im Unterschied dazu bildeten die mit dem Plasmid pgp160_{NL-991} transfizierten Zellen nach 28 h sehr viele kleinere Synzytien aus (siehe Abb. 6 B, Seite 55). In diesem Abschnitt des Zellrasens wurden unter dem Lichtmikroskop etwa 10 kleine Synzytien mit etwa 15 - 20 Zellkernen beobachtet.

Die Transfektion der HeLa-P4-Zellen mit dem Plasmid pgp160_{NL4-3} induzierte somit innerhalb eines Zeitraums von 28 h in einem Verhältnis von etwa 1:10 größere Synzytien als die Transfektion der Zellen mit dem Plasmid pgp160_{NL-991}. Somit scheint das Plasmid pgp160_{NL4-3} innerhalb des Zeitraumes von 28 h hinsichtlich der Synzytienbildung effizienter als das pgp160_{NL-991} zu sein.

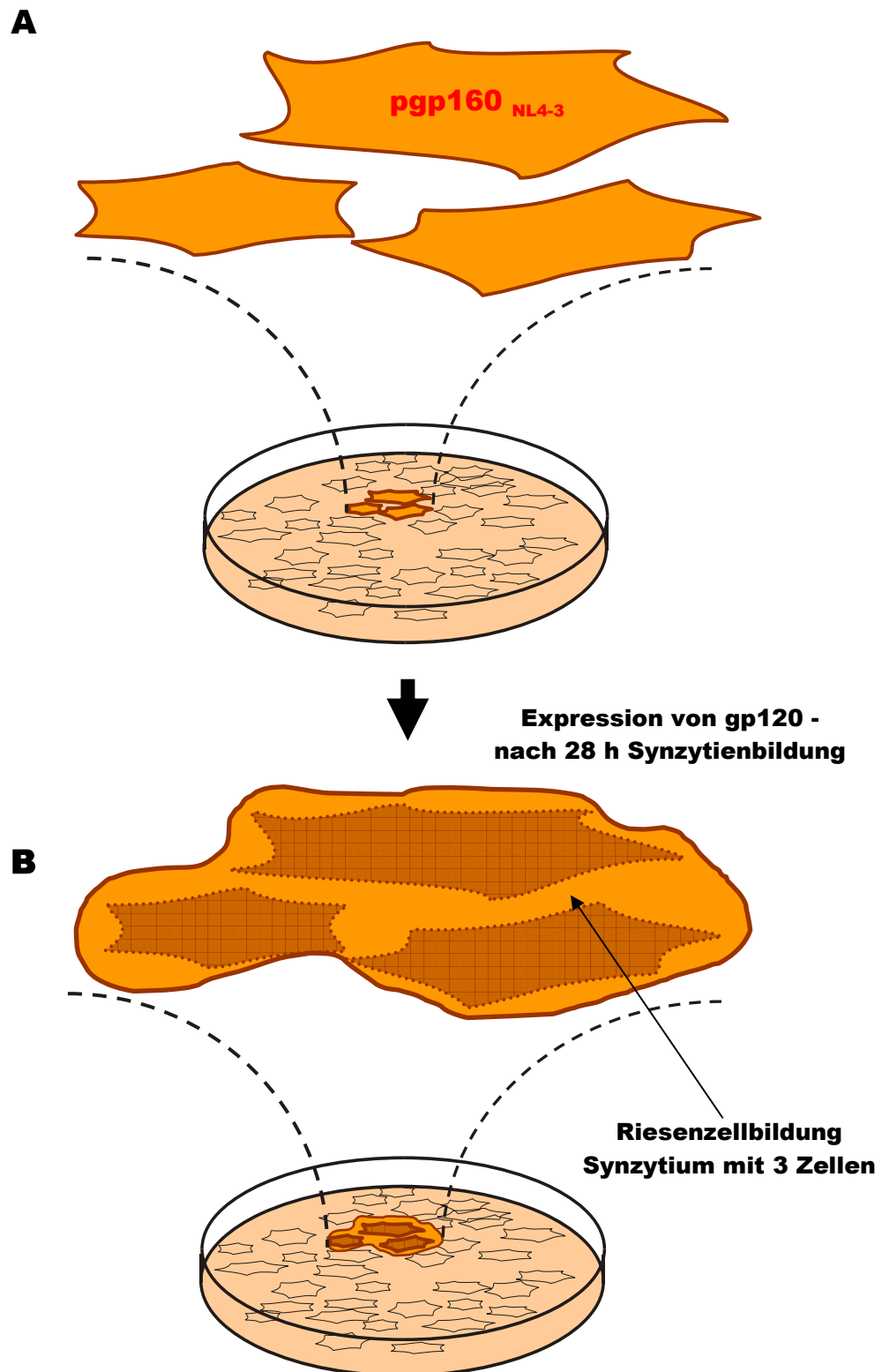


Abb. 4: Schema des gp120/gp41-induzierten Synzytienbildungstestes

Schematische Darstellung der gp120/gp41-induzierten Synzytienbildung: HeLa-P4-Zellen ($CD4^+$, $CXCR4^+$, $CCR5^+$) wurden mit dem Plasmid $pgp160_{NL4-3}$ (rot) oder $pgp160_{NL-991}$ transfiziert (A).

Innerhalb eines Zeitraumes von 28 h entsteht aus den einzelnen Zellen eine Riesenzelle (B).

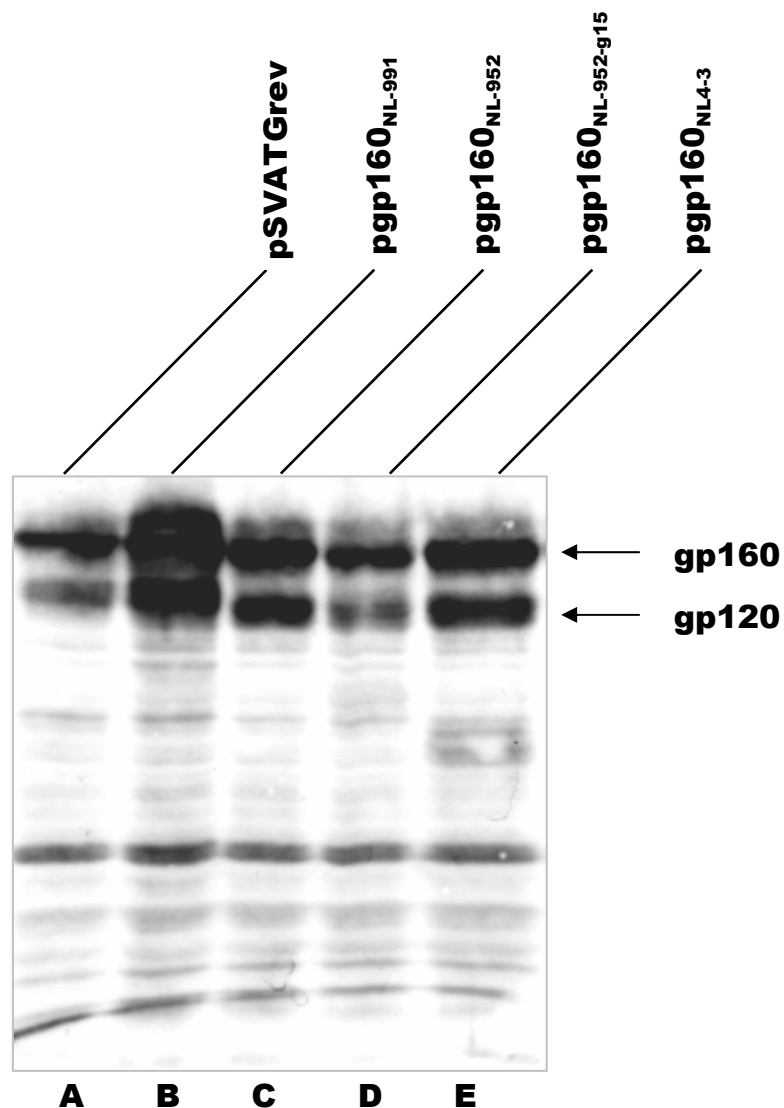


Abb. 5: Immunoblot zum Nachweis von gp120 in HeLa-Zellen

HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen wurden mit den Plasmiden pgp160_{NL4-3} (E), pgp160_{NL-991} (B), pgp160_{NL952} (C) und pgp160_{NL952-g15} (D), die gp120 von verschiedenen Virusvarianten exprimieren, transfiziert. Als Kontrolle wurden die HeLa-Zellen mit dem Plasmid pSVATGrev transfiziert (A).

Die Zellen wurden nach 2 Tagen lysiert, die Proteine des Lysats mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Exprimiertes gp160/gp120 wurde mit einem Maus-gp120-Antikörper detektiert.

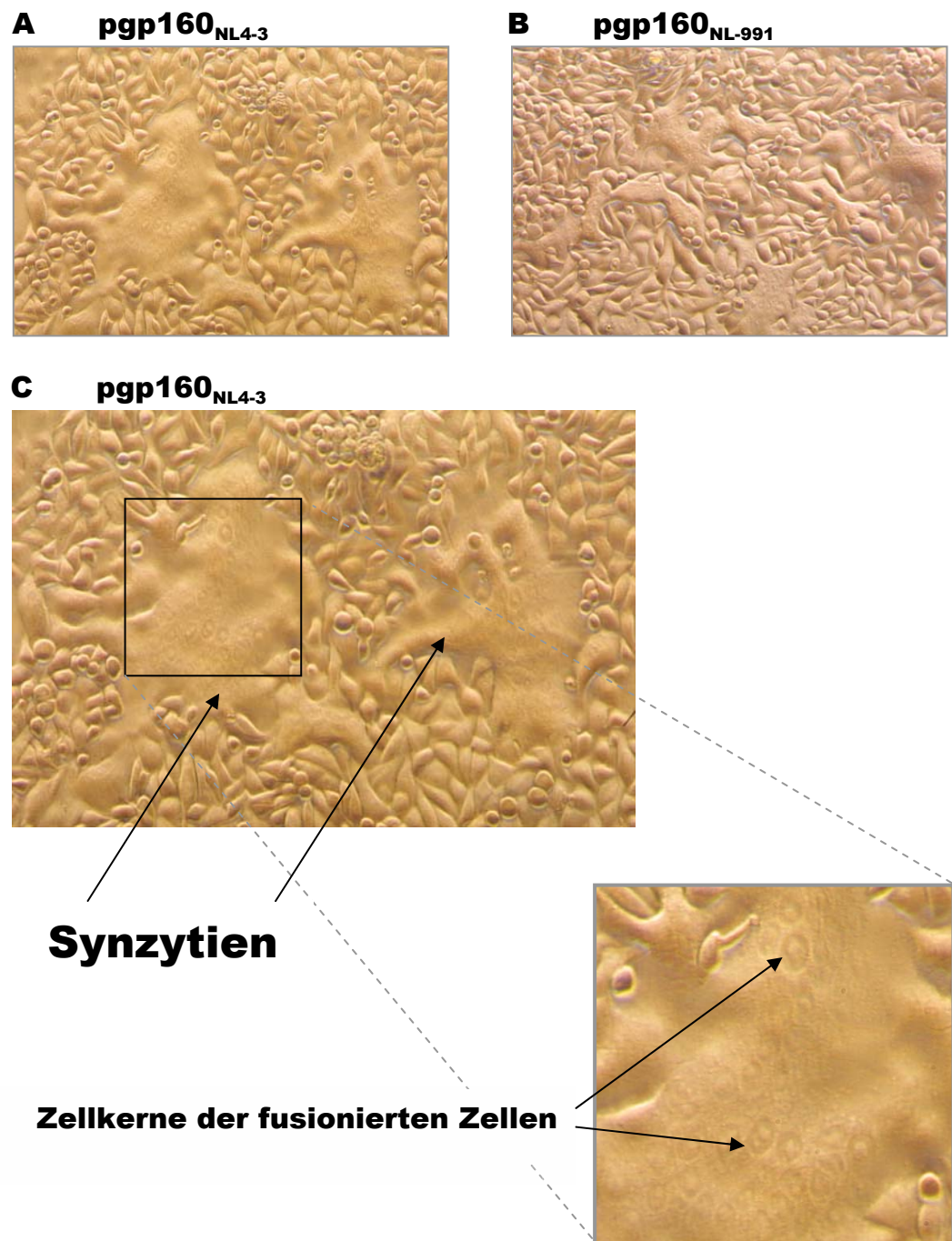


Abb. 6: Lichtmikroskopische Beobachtung der gp120/gp41-induzierten Synzytienbildung

HeLa-P4-CXCR4-CCR5 Zellen (2×10^4) wurden in 96well-Zellkulturplatten mit den Expressionsvektoren pgp160_{NL4-3} (**A** und **C**) oder pgp160_{NL-991} (**B**) mit FuGene[®] transfiziert. Nach 28 h entstanden in (**A**) zwei große Synzytien mit ca. 80 - 120 Zellkernen, in (**B**) zahlreiche kleinere Synzytien mit 10 - 15 Zellkernen. In Abbildung (**C**) wurde Abbildung (**A**) vergrößert dargestellt, um die einzelnen Zellkerne der fusionierten Zellen sichtbar zu machen. Die Bilder wurden mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie aufgenommen.

3.4 Testung der HOCl-modifizierten Proteine auf Inhibition der gp120/gp41-induzierten Synzytienbildung

Der Synzytienbildungstest (siehe Abschnitt 3.3, Seite 51) ahmt die Interaktion von Virus- und Zellmembran nach. Durch die Ausbildung des gp120/gp41 Komplexes in der Membran der HeLa-CD4⁺CXCR4⁺CCR5⁺-Zellen werden Synzytien induziert.

Dieser einfache und nicht-infektiöse Test wurde nun verwendet, um die HOCl-modifizierten Proteine auf potentielle inhibitorische Eigenschaften bei der gp120/gp41-induzierten Synzytienbildung zu testen.

3.4.1 HOCl-modifizierte HSA-Proteine und VEBP

Die entweder mit pgp160_{NL4-3} oder pgp160_{NL-991} transfizierten HeLa-P4-Zellen wurden 15 min nach der erfolgten Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 20 und 50 µg/ml) der HOCl-modifizierten HSA-Proteine mHSA_{1:10}, mHSA_{1:20}, mHSA_{1:100}, mHSA_{1:200}, mHSA_{1:500}, VEBP oder mHSA_{1:10000} (siehe Abschnitt 3.1 und Tabelle 3, Seite 48) und zur Kontrolle mit unbehandeltem HSA mit entsprechend gleichen Konzentrationen (1, 5, 10, 20 und 50 µg/ml) inkubiert.

Die HOCl-modifizierten HSA-Proteine mHSA_{1:10}, mHSA_{1:20} und mHSA_{1:100} zeigten keinen Effekt auf die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung der mit dem Plasmid pgp160_{NL4-3} transfizierten Zellen.

Bei Testung des mHSA_{1:200} wurde konzentrationsabhängig ein erster sichtbarer inhibitorischer Effekt auf die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung beobachtet. Bei Inkubation der transfizierten Zellen mit 20 µg/ml mHSA_{1:200} wurden in den 96er-wells weniger Synzytien, verglichen mit nicht-inkubierten transfizierten Zellen, innerhalb des Zeitraumes von 28 h gebildet (eigene Beobachtung).

In Abbildung 7 (siehe Seite 60) werden pgp160_{NL4-3}-transfizierte HeLa-P4-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen (20 µg/ml und 50 µg/ml) an VEBP oder HSA inkubiert wurden, und unbehandelte Zellen gezeigt. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Ausschnitte von 96er-wells.

VEBP inhibierte bei einer Konzentration von 20 µg/ml (siehe Abb. 7 D) vollständig die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung der transfizierten Zellen.

Bei transfizierten HeLa-Zellen, die mit 20 µg/ml (siehe Abb. 7 C) oder 50 µg/ml HSA (siehe Abb. 7 E) inkubiert wurden, zeigte sich keine inhibitorische Wirkung. In Abbildung 7 C sieht man im Ausschnitt ein sehr großes und ein kleineres Synzytium. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml HSA entstanden ähnlich große Synzytien wie in Abschnitt 3.3 (Seite 51) beschrieben. Die Inkubation der Zellen mit 50 µg/ml VEBP (siehe Abb. 7 F) zeigte im Vergleich zur Inkubation mit 20 µg/ml VEBP (siehe Abb. 7 D) keinen Unterschied. Die Synzytienbildung wurde ebenfalls zu 100% inhibiert. Abbildung 7 A zeigt als Kontrolle die Synzytienbildung der mit $\text{pgp160}_{\text{NL4-3}}$ transfizierten Zellen ohne Inkubation mit VEBP oder HSA. Hier entstand ein sehr großes Synzytium mit etwa 200 Zellkernen. In Abbildung 7 B sieht man unbehandelte HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen.

Unter dem Lichtmikroskop wurde kein sichtbarer Unterschied im Aussehen der mit VEBP inkubierten Zellen (siehe Abb. 7 D/F) und der unbehandelten Zellen (siehe Abb. 7 B), welcher eventuell auf zelltoxische Wirkungen des VEBP oder negative Auswirkungen von VEBP auf das Zellwachstum schließen würde, beobachtet.

In Abbildung 8 (siehe Seite 61) werden $\text{pgp160}_{\text{NL-991}}$ -transfizierte HeLa-P4-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen (20 µg/ml und 50 µg/ml) an VEBP oder HSA inkubiert wurden, und unbehandelte Zellen gezeigt. Das Plasmid $\text{pgp160}_{\text{NL-991}}$ codiert im Gegensatz zu $\text{pgp160}_{\text{NL4-3}}$ (X4-trop) für ein R5-tropes gp120.

Hier wurde im Gegensatz zu den $\text{pgp160}_{\text{NL4-3}}$ -transfizierten Zellen die gp120/gp41-induzierte Synzytienbildung bei einer Konzentration von 20 µg/ml VEBP nicht vollständig inhibiert. Es wurden noch vereinzelte Synzytien mit 2 - 3 Zellkernen beobachtet (siehe Abb. 8 C).

Bei einer Konzentration von 50 µg/ml VEBP wurde die gp120/gp41_{NL-991}-induzierte Synzytienbildung ebenfalls zu 100% inhibiert (siehe Abb. 8 F).

Die Inkubation mit 20 µg/ml (siehe Abb. 8 C) bzw. 50 µg/ml (siehe Abb. 8 E) HSA zeigte auch hier keinen inhibitorischen Effekt auf die gp120/gp41-induzierte Synzytienbildung. Es entstanden kleinere Synzytien mit 15 - 20 Zellkernen.

Abbildung 8 A zeigt als Kontrolle die Synzytienbildung der $\text{pgp160}_{\text{NL-991}}$ transfizierten Zellen. Hier entstanden nach 28 h, wie in Abschnitt 3.3 (siehe Seite 51) beschrieben, kleine Synzytien mit 15 - 20 Zellkernen.

Unter dem Lichtmikroskop wurden in diesem Versuch wiederum keine sichtbaren Unterschiede im Aussehen der mit VEBP inkubierten HeLa-Zellen (siehe Abb. 8 D/F)

und der unbehandelten Zellen (siehe Abb. 8 B) beobachtet. Diese Ergebnisse zeigten, dass für die vollständige Inhibition der gp120/gp41_{NL-991}-induzierten Synzytienbildung eine größere Menge an VEBP verglichen mit der VEBP-Inhibitionsmenge für die gp120/gp41_{NL-4-3}-induzierte Synzytienbildung notwendig ist.

Um nun zu untersuchen, ob HOCl-modifizierte HSA-Proteine, die im molaren Verhältnis von >1:1000 mit HOCl umgesetzt wurden, eine bessere Effektivität auf die Inhibition der Synzytienbildung zeigen, wurden ppg160_{NL4-3}-transfizierte HeLa-P4-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an mHSA_{1:10000} inkubiert (siehe Abbildung 9, Seite 62).

In diesem Versuch führte die Inkubation mit HOCl-modifiziertem HSA-Protein mHSA_{1:10000} zu keiner Verbesserung hinsichtlich der Effektivität der Inhibitionswirkung auf die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung.

Auch hier wurde eine 100%ige-Inhibition der Synzytienbildung bei einer Konzentration von 20 µg/ml mHSA_{1:10000} erreicht (siehe Abb. 9 D).

Bei Inkubation der transfizierten Zellen mit einer Konzentration von 10 µg/ml mHSA_{1:10000} entstanden vereinzelte Synzytien (siehe Abb. 9 C). Bei einer Konzentration von 5 µg/ml mHSA_{1:10000} wurden unter dem Lichtmikroskop größere Synzytien mit bis zu 100 Zellkernen beobachtet (siehe Abb. 9 B).

Die Inkubation mit 50 µg/ml HSA zeigte, wie zu erwarten, keine Inhibitionswirkung auf die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung (siehe Abb. 9 E). Es entstand ein riesiges Synzytium, welches den gesamten Ausschnitt des Zellrasens ausfüllte. Es wurden nur noch vereinzelte nicht-fusionierte Zellen beobachtet.

Als Kontrolle zeigt Abbildung 9 A die ppg160_{NL4-3}-transfizierten HeLa-P4-Zellen. Hier wurde nach 28 h ein sehr großes Synzytium, welches fast den gesamten Bildausschnitt ausfüllt, beobachtet. Die vereinzelten, nicht-fusionierten Zellen heben sich stecknadelförmig ab. Als Kontrolle zeigt Abbildung 9 F unbehandelte Zellen.

Zwischen unbehandelten HeLa-Zellen (siehe Abb. 9 F) und mit mHSA_{1:10000} inkubierten Zellen (siehe Abb. 9 D) wurde unter dem Lichtmikroskop wiederum kein Unterschied im Aussehen der Zellen festgestellt.

Damit ergibt sich aus diesen Versuchen ein Zusammenhang zwischen der Inhibitionsaktivität der unterschiedlichen HOCl-modifizierten HSA-Proteine auf die Synzytienbildung und dem molaren Verhältnis von HSA zu HOCl bei der Oxidation des HSA.

In Tabelle 4 (siehe Seite 63) wird der Zusammenhang zwischen dem molaren Verhältnis von HSA zu HOCl und der inhibitorischen Aktivität dargestellt. Die Versuche zeigten, dass bestimmte HOCl-modifizierte HSA-Proteine die gp120/gp41_{NL4-3}- und gp120/gp41_{NL-991}-induzierte Synzytienbildung inhibieren. VEBP zeigte dabei die beste Effektivität bei der inhibitorischen Wirkung auf die Synzytienbildung. Bei einer Konzentration von 20 bzw. 50 µg/ml VEBP wurde die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte bzw. gp120/gp41_{NL-991}-induzierte Synzytienbildung der mit pgp160_{NL4-3} bzw. pgp160_{NL-991} transfizierten HeLa-P4-Zellen zu 100% inhibiert.

VEBP zeigte somit eine bessere inhibitorische Wirkung auf das X4-trope gp120_{NL4-3}. Die gp120/gp41_{NL-991}-induzierte Synzytienbildung des R5-tropen gp120_{NL-991} wurde schlechter durch VEBP inhibiert. HSA zeigte in den Experimenten keine inhibitorische Wirkung auf die gp120/gp41-induzierte Synzytienbildung

Aus diesen Versuchen lässt sich für VEBP ein EC₅₀-Wert im Bereich von etwa 10 - 15 µg/ml (150 nM - 220 nM) bzw. ein EC₅₀-Wert im Bereich von 20 - 25 µg/ml (290 nM - 370 nM) für das X4-trope bzw. R5-trope gp120 abschätzen.

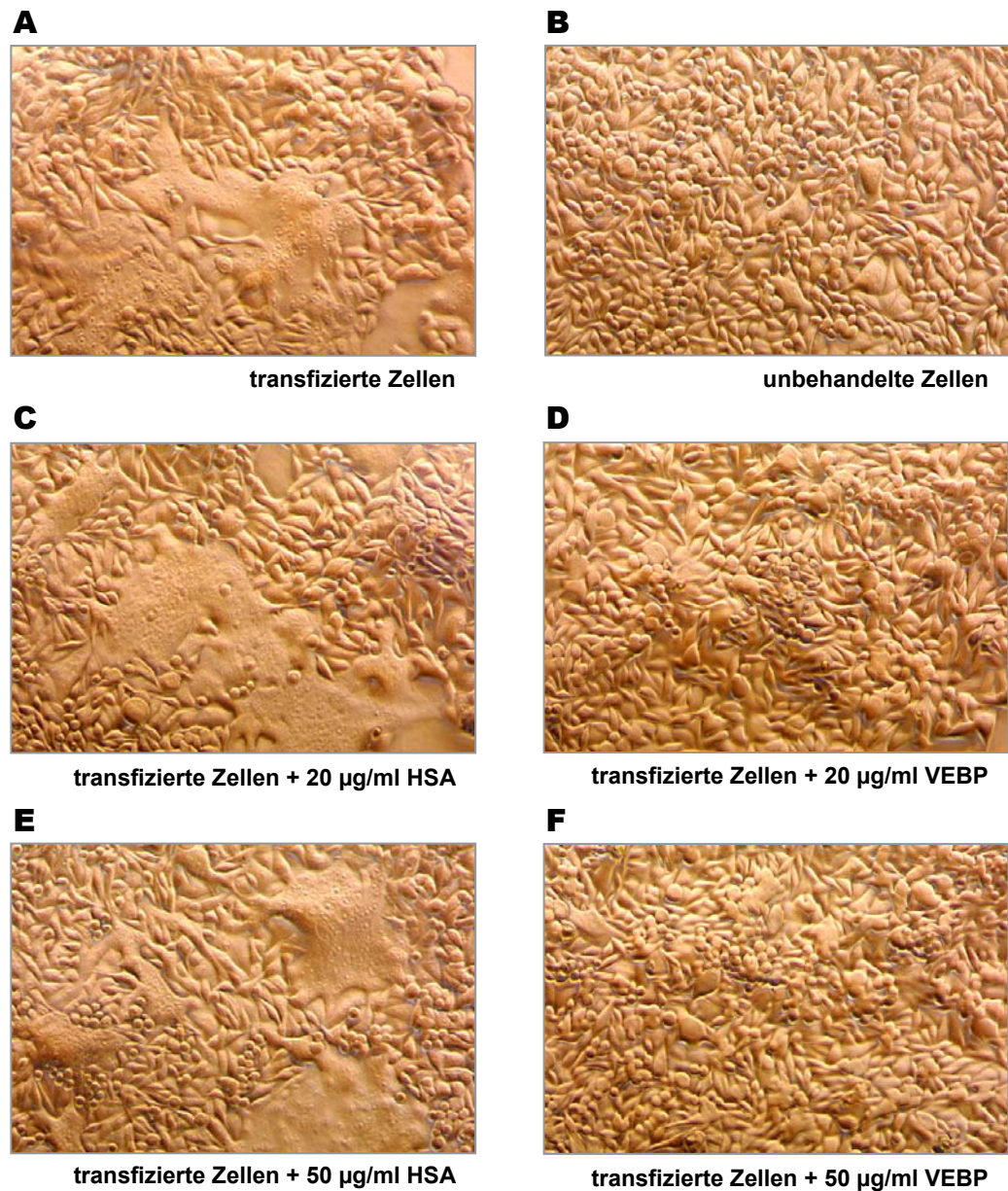


Abb. 7: Inhibition der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung durch das HOCl-modifizierte HSA-Protein VEBP

HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen wurden mit dem Plasmid pgp160_{NL4-3} transfiziert und die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an VEBP oder HSA inkubiert. Nach 28 h wurde die Synzytienbildung mittels Phasenkontrastmikroskopie ausgewertet und bildgebend dokumentiert.

- A** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen;
- B** unbehandelte Zellen;
- C** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml HSA;
- D** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml VEBP;
- E** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 50 µg/ml HSA;
- F** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 50 µg/ml VEBP.

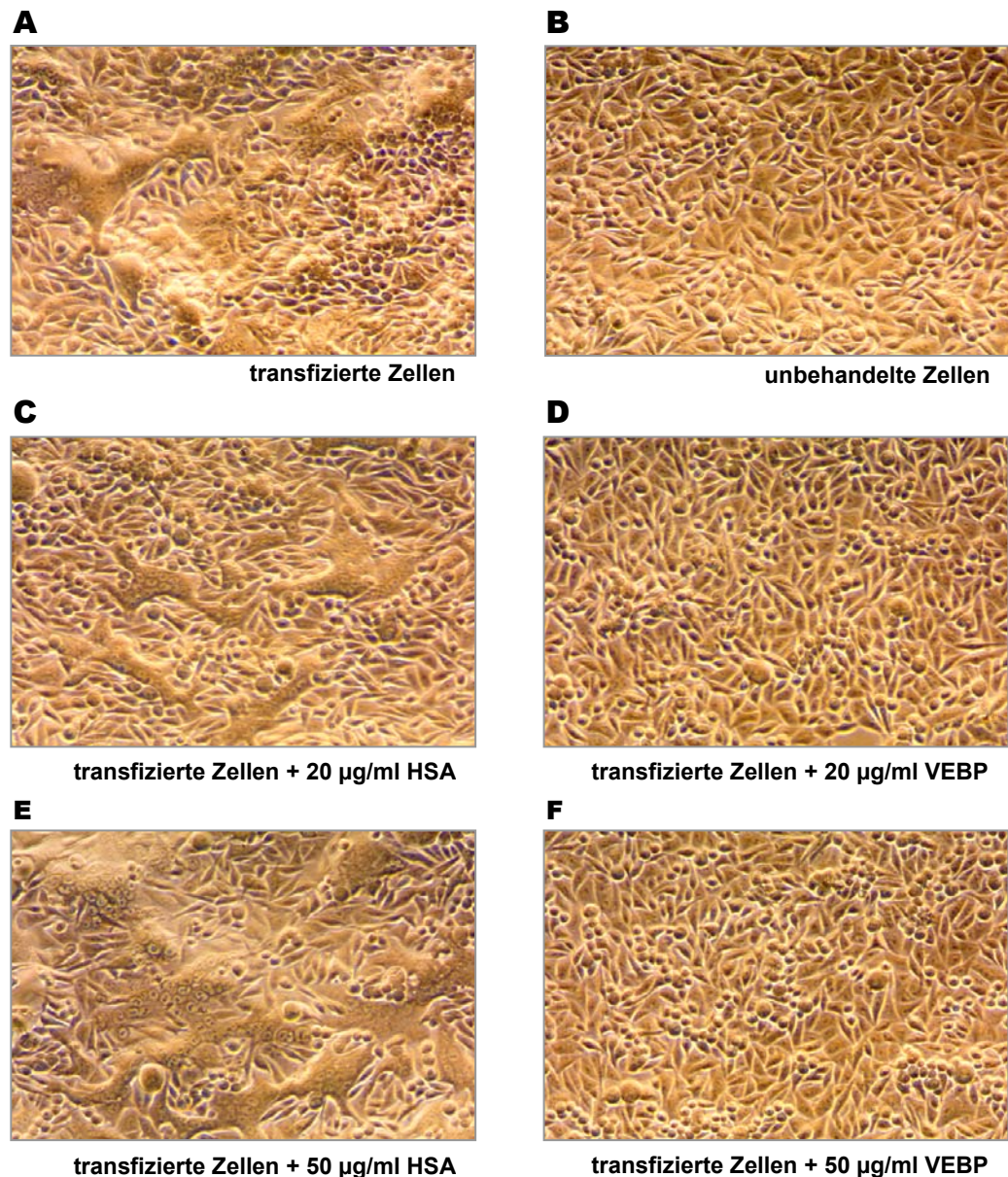


Abb. 8: Inhibition der gp120/gp41_{NL-991}-induzierten Synzytienbildung durch das HOCl-modifizierte HSA-Protein VEBP

HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen wurden mit dem Plasmid pgp160_{NL-991} transfiziert und die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an VEBP oder HSA inkubiert. Nach 28 h wurde die Synzytienbildung mittels Phasenkontrastmikroskopie ausgewertet und bildgebend dokumentiert.

- A** mit pgp160_{NL-991} transfizierte Zellen;
- B** unbehandelte Zellen;
- C** mit pgp160_{NL-991} transfizierte Zellen + 20 µg/ml HSA;
- D** mit pgp160_{NL-991} transfizierte Zellen + 50 µg/ml HSA;
- E** mit pgp160_{NL-991} transfizierte Zellen + 20 µg/ml VEBP;
- F** mit pgp160_{NL-991} transfizierte Zellen + 50 µg/ml VEBP.

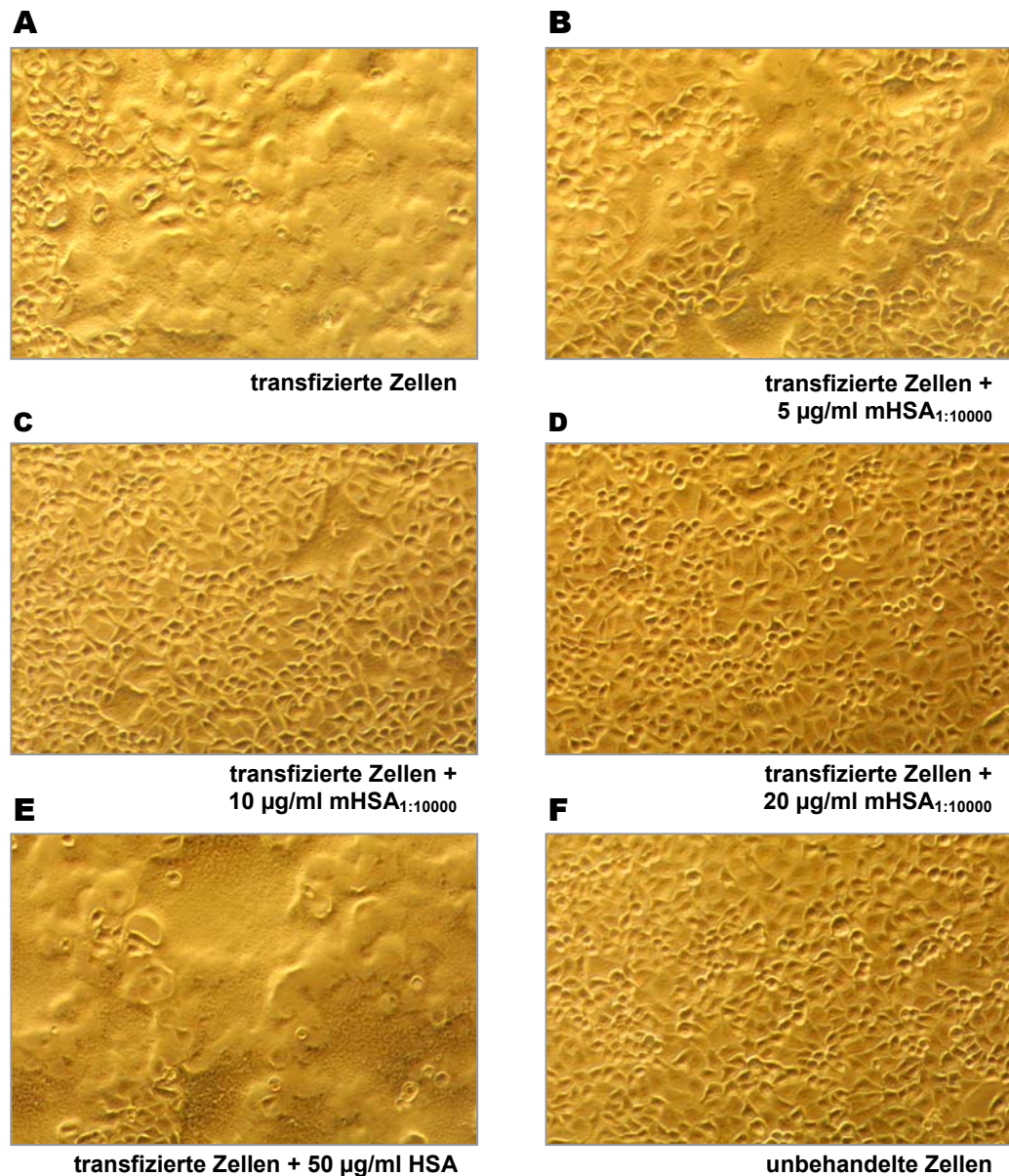


Abb. 9: Inhibition der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung durch das HOCl-modifizierte HSA-Protein mHSA_{1:10000}

HeLa-P4-Zellen wurden mit dem Plasmid pgp160_{NL4-3} transfiziert und die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an mHSA_{1:10000} oder HSA inkubiert. Nach 28 h wurde die Synzytienbildung mittels Phasenkontrastmikroskopie ausgewertet.

- A** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen;
- B** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 5 µg/ml mHSA_{1:10000};
- C** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 10 µg/ml mHSA_{1:10000};
- D** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml mHSA_{1:10000};
- E** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 50 µg/ml HSA;
- F** unbehandelte Zellen.

Tabelle 4: Antivirale Aktivität von HOCl-modifizierten HSA-Proteinen

Molares Verhältnis HSA-Protein:Hypochlorige Säure	Inhibition der gp120/gp41-induzierten ^a Synzytienbildung Proteinkonzentration 20 µg/ml
1:10	-
1:20	-
1:100	-
1:200	-/+
1:500	+
1:1000	++
1:10000	++

^a HeLa-Zellen transfiziert mit pgp160_{NL4-3}

- (-) keine Inhibition der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung;
- (-/+) geringere Anzahl von Synzytien;
- (+) vollständige Inhibition der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung;
- (++) vollständige Inhibition der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung;
bei einer Konzentration von 20 µg/ml HOCl-modifiziertem Protein.

3.4.2 HOCl-modifizierte BSA-, MSA- und PSA-Proteine

Da gezeigt wurde, dass VEBP die gp120/gp41_{NL4-3}- und gp120/gp41_{NL-991}-induzierte Synzytienbildung inhibiert (siehe Abschnitt 3.4.1, Seite 56), wurden anschließend die HOCl-modifizierten Serum Albumine mBSA_{1:1000}, mMSA_{1:1000} und mPSA_{1:1000} auf ihre inhibitorischen Eigenschaften bei der Synzytienbildung getestet.

Die HeLa-P4-Zellen wurden in diesem Versuch mit dem Plasmid pgp160_{NL4-3} transfiziert und entweder mit 20 µg/ml mBSA_{1:1000}, mMSA_{1:1000} und mPSA_{1:1000} oder 20 µg/ml unbehandeltem BSA, MSA oder PSA inkubiert. Nach 28 h wurde wieder die Synzytienbildung unter dem Lichtmikroskop beobachtet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 (Seite 65) dargestellt. Die unmodifizierten Proteine BSA, PSA und MSA zeigten bei einer Konzentration von 20 µg/ml keine Inhibition der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung (siehe Abb. 10 A, 10 C, 10 F). Bei Inkubation mit 20 µg/ml BSA wurde im repräsentativen Ausschnitt des 96er-wells ein sehr großes Synzytium (etwa 150 Zellkerne) und ein kleineres Synzytium mit 30 bis 40 Zellkernen nach 28 h beobachtet (siehe Abb. 10 A). Bei Inkubation mit 20 µg/ml PSA und MSA (siehe Abb. 10 C, 10 F) sieht man ein riesiges Synzytium, das den gesamten Bildausschnitt ausfüllt.

Die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung wurde in diesem Versuch vollständig bei Inkubation der transfizierten Zellen mit 20 µg/ml mBSA_{1:1000}, (siehe Abb. 10 B), mPSA_{1:1000} (siehe Abb. 10 D) und mMSA_{1:1000} (siehe Abb. 10 F) inhibiert. Nach 28 h wurde bei allen drei Versuchsansätzen kein Synzytium mehr beobachtet.

Es wurde wieder kein Unterschied im Aussehen der mit 20 µg/ml mBSA_{1:1000}, mMSA_{1:1000} oder mPSA_{1:1000} inkubierten HeLa-P4-Zellen und der unbehandelten Zellen (Bild nicht gezeigt) unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Somit scheinen die HOCl-modifizierten Proteine keinen negativen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen zu haben.

Die HOCl-modifizierten Serum Albumine mBSA_{1:1000}, mMSA_{1:1000} und mPSA_{1:1000} inhibierten somit in diesem Versuch genauso wie VEBP bei einer Konzentration von 20 µg/ml die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung der mit dem Plasmid pgp160_{NL4-3} transfizierten HeLa-P4-Zellen. Auch hier zeigten die unmodifizierten Serum Albumine BSA, MSA und PSA keine inhibitorische Aktivität.

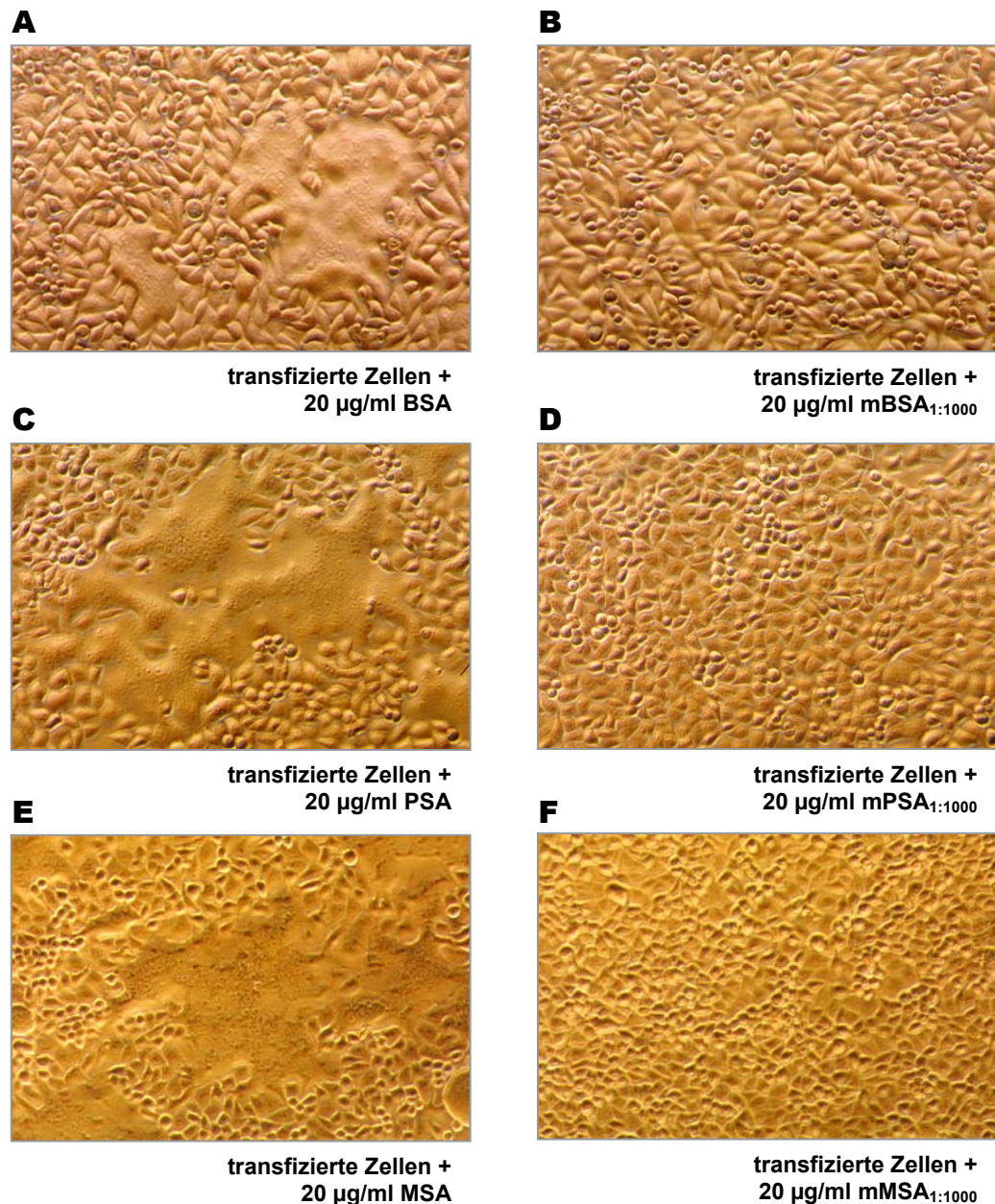


Abb. 10: Inhibition der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung durch mBSA_{1:1000}, mPSA_{1:1000} und mMSA_{1:1000}

HeLa-Zellen wurden mit dem Plasmid ppg160_{NL4-3} transfiziert und mit 20 µg/ml mBSA_{1:1000}, mPSA_{1:1000}, sowie mMSA_{1:1000} oder 20 µg/ml unbehandelten Proteinen inkubiert. Nach 28 h wurde die Synzytienbildung beobachtet.

- A** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml BSA;
- B** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml mBSA_{1:1000};
- C** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml PSA;
- D** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml mPSA_{1:1000};
- E** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml MSA;
- F** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml mMSA_{1:1000}.

3.4.3 HOCl-modifizierte Transferrin- und β -Galaktosidase-Proteine

Es wurde gezeigt, dass VEBP und die HOCl-modifizierten Serum Albumine mBSA_{1:1000}, mMSA_{1:1000} und mPSA_{1:1000} die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung inhibieren (siehe Abschnitt 3.4.1 und 3.4.2, Seite 56 - 65). Um zu untersuchen, ob die beobachtete Aktivität auf die Synzytienbildung Serum Albumin-spezifisch ist oder auch bei anderen HOCl-modifizierten Proteinen auftreten kann, wurden die HOCl-modifizierten Transferrin- und β -Galaktosidase-Proteine getestet.

Die HeLa-P4-Zellen wurden in diesen Versuchen wieder mit dem Plasmid pgp160_{NL4-3} transfiziert, welches für das X4-trope gp120 von NL4-3 codiert.

In Abbildung 11 (siehe Seite 68) sieht man pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen an m β Gal_{1:1000} oder m β Gal_{1:10000} inkubiert wurden.

In dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung bei einer Konzentration von 50 μ g/ml mGal_{1:1000} nicht vollständig inhibiert wurde (siehe Abb. 11 C). Nach 28 h wurden in diesem Ausschnitt der Zellen zwei kleine Synzytien mit 10 - 20 Zellkernen beobachtet.

Wurden die Zellen mit m β Gal_{1:10000} inkubiert, zeigte sich bei einer Konzentration von 50 μ g/ml m β Gal_{1:10000} keine Synzytienbildung mehr (siehe Abb. 11 E).

Zur Kontrolle wurden die Zellen mit pgp160_{NL4-3} transfiziert (siehe Abb. 11 A). Nach 28 h wurde ein sehr großes Synzytium, welches sich über den gesamten Bildausschnitt ausdehnt (mit > 500 Zellkerne), beobachtet. Als Kontrolle zeigt Abbildung 10 B unbehandelte HeLa-P4-Zellen.

Es wurde wieder kein Unterschied im Aussehen der mit 50 μ g/ml m β Gal_{1:10000} inkubierten HeLa-P4-Zellen (siehe Abb. 11 E) und der unbehandelten Zellen (siehe Abb. 11 B) unter dem Lichtmikroskop beobachtet.

In gleicher Weise wurden die mit dem Plasmid pgp160_{NL4-3} transfizierten HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an mTF_{1:1000} oder unbehandeltem Transferrin inkubiert. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 12 (siehe Seite 69) dargestellt.

Die gp120/gp41_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung wurde bei einer Konzentration von 20 μ g/ml mTF_{1:1000} vollständig inhibiert (siehe Abb. 12 D). Nach 28 h wurden keine

Synzytien beobachtet. Bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ $\text{mTF}_{1:1000}$ wurden in diesem Ausschnitt des 96er-*wells* noch zwei große Synzytien (30 - 40 Zellkerne) und mehrere kleinere Synzytien beobachtet (siehe Abb. 12 C).

Die Inkubation mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin zeigte keine Inhibition der Synzytienbildung (siehe Abb. 11 F). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem Plasmid $\text{pgp160}_{\text{NL4-3}}$ transfiziert (Abb. 11 A). Nach 28 h wurde ein riesiges Synzytium, welches sich über den gesamten Abschnitt ausdehnt, beobachtet. In Abbildung 11 B sieht man unbehandelte HeLa-P4-Zellen nach 28 h.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die $\text{gp120/gp41}_{\text{NL4-3}}$ -induzierte Synzytienbildung der mit dem mit Plasmid $\text{pgp160}_{\text{NL4-3}}$ transfizierten HeLa-Zellen durch die Inkubation mit 50 $\mu\text{g/ml}$ $\text{m}\beta\text{Gal}_{1:10000}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ $\text{mTF}_{1:1000}$ inhibiert wird. Unmodifiziertes Transferrin und unmodifizierte β -Galaktosidase zeigten keine inhibitorische Aktivität.

Bei dem Protein β -Galaktosidase waren bei der Modifikation somit hohe Dosen an HOCl erforderlich, um eine ähnliche Aktivität wie VEBP und Transferrin bei der Inhibition der $\text{gp120/gp41}_{\text{NL4-3}}$ -induzierten Synzytienbildung zu erreichen. Daher scheint das Protein inerte als die Serum Albumine und Transferrin gegen die HOCl-Modifikation zu sein. Bei diesen Proteinen wurde die Aktivität gegen die $\text{gp120/gp41}_{\text{NL4-3}}$ -induzierte Synzytienbildung bei niedrigeren Dosen an HOCl erreicht.

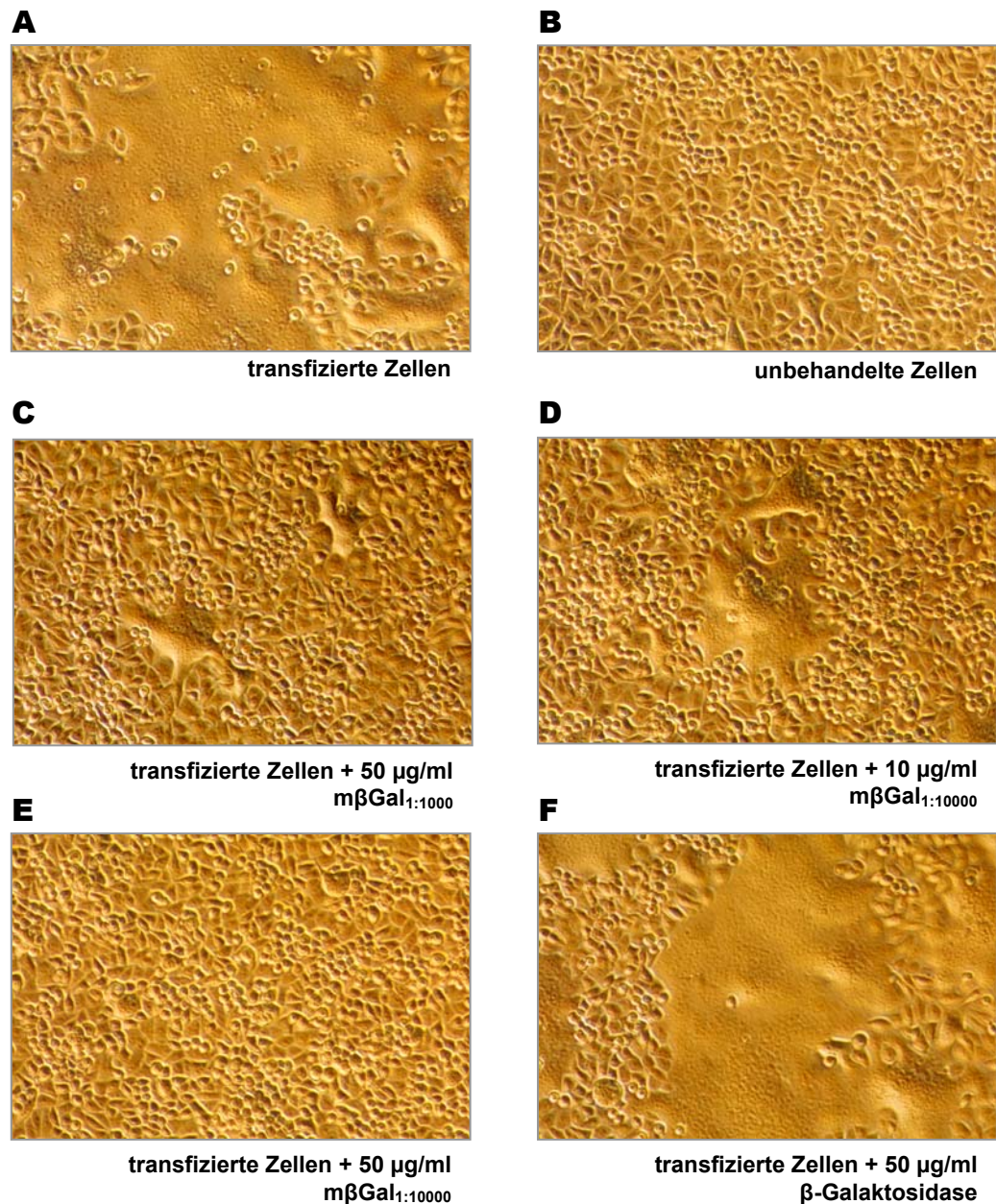


Abb. 11: Inhibition der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung durch HOCl-modifiziertes mβGal_{1:10000}

HeLa-P4-Zellen wurden mit dem Plasmid pgp160_{NL4-3} transfiziert und die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an mβGal_{1:1000}, mβGal_{1:10000} oder β-Galaktosidase inkubiert. Nach 28 h wurde die Synzytienbildung beobachtet.

- A** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen;
- B** unbehandelte Zellen;
- C** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 50 µg/ml mβGal_{1:1000};
- D** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 10 µg/ml mβGal_{1:10000};
- E** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 50 µg/ml mβGal_{1:10000};
- F** mit pgp160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 50 µg/ml β-Galaktosidase.

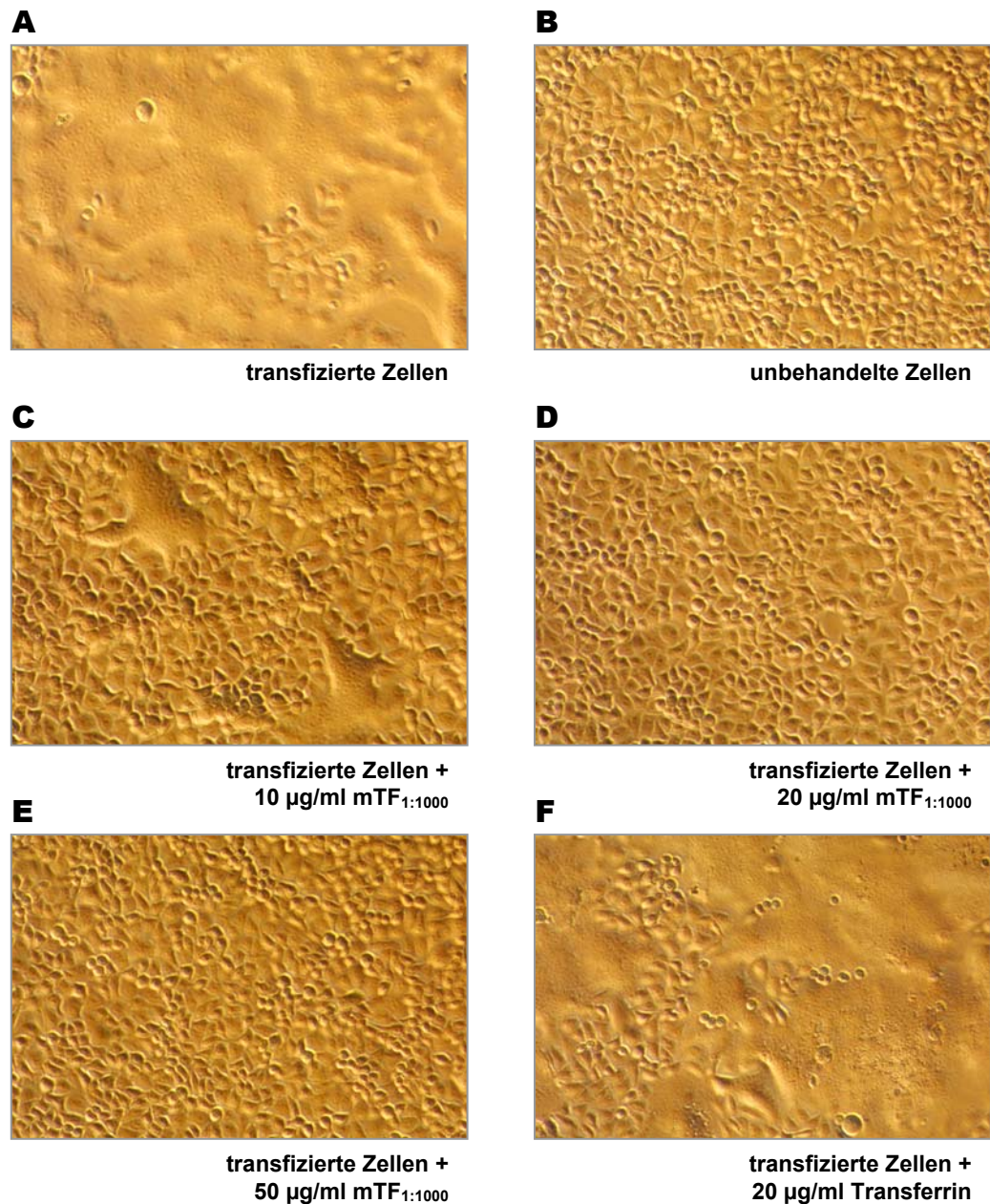


Abb. 12: Inhibition der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung durch HOCl-modifiziertes mTF_{1:1000}

Mit dem Plasmid ppg160_{NL4-3} transfizierte HeLa-P4-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an mTF_{1:1000} oder Transferrin inkubiert. Nach 28 h wurde die Synzytienbildung mittels Phasenkontrastmikroskopie ausgewertet und bildgebend dokumentiert.

- A** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen;
- B** unbehandelte Zellen;
- C** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 10 µg/ml mTF_{1:1000};
- D** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml mTF_{1:1000};
- E** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 50 µg/ml mTF_{1:1000};
- F** mit ppg160_{NL4-3} transfizierte Zellen + 20 µg/ml Transferrin.

3.5 Inhibition der HIV-1 induzierten Synzytienbildung durch VEBP

Da gezeigt wurde, dass VEBP die gp120/gp41_{NL4-3}- und gp120/gp41_{NL-991}-induzierte Synzytienbildung inhibiert, wurde die antivirale Aktivität von VEBP in einem HIV-1-Infektionstest untersucht.

Dafür wurden der Virus-Stämme NL4-3 und NL-991 verwendet, die sich nur im V3-Loop-Bereich unterscheiden. NL4-3 ist ein X4-tropes Virus, NL-991 ist ein R5-tropes Virus (siehe Abschnitt 2.1.9, Seite 28).

Die Indikatorzelllinien GHOST-CXCR4 oder GHOST-HI5 wurden jeweils mit 500 TCID₅₀ (siehe Abschnitt 2.2.4.1, Seite 41) des Virusisolates NL4-3 (siehe Abbildung 13, Seite 72) bzw. des NL-991 infiziert (siehe Abbildung 14, Seite 73).

Um die antivirale Aktivität von VEBP zu testen, wurden die beiden Virusstämme 1 h lang mit verschiedenen Konzentrationen an VEBP (0, 2, 5, 10 oder 20 µg/ml) vorinkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit Hemocolor[®] Standardfärbelösung angefärbt (siehe Abschnitt 2.2.3.7, Seite 39).

Abbildung 13 A zeigt einen repräsentativen Ausschnitt eines 96er-wells mit GHOST-CXCR4-Zellen, welche mit 500 TCID₅₀ des Virus NL4-3 infiziert wurden. In diesem Ausschnitt sieht man zwei große Synzytien mit 15 - 20 Zellkernen und mehrere kleinere Synzytien mit 2 - 3 Zellkernen. Ein großer Teil der Synzytien wurde bedingt durch die Fixierung mit Methanol abgelöst. Die Fixierung mit Methanol bewirkt das Ablösen der Synzytien von der Oberfläche der Mikrotiterplatten. Der zerstörte Zellrasen (abgelöste Synzytien) ist ein Indiz für die starke HIV-Vermehrung. Die Fixierung mit Methanol und damit die Inaktivierung der Viren ist die einzige Möglichkeit, um die mit HIV infizierten Zellen außerhalb des L3-Sicherheitslabors zu färben und bildgebend zu dokumentieren.

Vergleicht man Abb. 13 A mit Abb. 13 B, so zeigt sich ein inhibitorischer Effekt auf die HIV-1_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung bei den Zellen, die mit 2 µg/ml VEBP inkubiert wurden. Es wurden zwar große Synzytien mit 15 - 20 Zellkernen und mehrere kleinere Synzytien beobachtet, aber es wurden mehr nicht-infizierte, intakte Zellen beobachtet als in Abb. 13 A. Der inhibitorische Effekt war konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml (siehe Abb. 13 C) und

10 µg/ml (siehe Abb. 13 D) wurde der inhibitorische Effekt verbessert. Bei einer Konzentration von 20 µg/ml VEBP wurde die vollständige Inhibition der HIV-1_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung beobachtet (siehe Abb. 13 E). Nach 5 Tagen waren keine Synzytien zu sehen.

Zur Kontrolle wurden uninfizierte GHOST-HI5-Zellen nach 5 Tagen Wachstum angefärbt (Abb. 13 F). Es wurde kein Unterschied im Aussehen zwischen den mit 20 µg/ml (siehe Abb. 13 E) VEBP inkubierten GHOST-Zellen und den uninfizierten Zellen (siehe Abb. 13 F) nach 5 Tagen Wachstum unter dem Lichtmikroskop beobachtet.

In Abbildung 14 A (siehe Seite 73) werden die mit 500 TCID₅₀ NL-991 (R5-trop) infizierten GHOST-HI-Zellen nach 5 Tagen gezeigt. In diesem Abschnitt des 96er-wells wurden zwei große Synzytien mit 15 - 20 Zellkernen beobachtet. Nach der Methanolfixierung zeigten sich auch hier große Lücken, die durch abgelöste Synzytien hervorgerufen wurden.

Im Vergleich dazu zeigten Zellen, die mit 2 µg/ml VEBP inkubiert (siehe Abb. 14 B) wurden, weniger Synzytien. Man sieht im Ausschnitt ein großes Synzytium mit bis zu 100 Zellkernen und zwei große Synzytien. Größere Synzytien wurden auch hier durch die Fixierung abgelöst. Auch hier war die inhibitorische Wirkung des VEBP konzentrationsabhängig. Bei Inkubation mit 5 µg/ml VEBP waren nur noch kleinere Synzytien mit 10 -15 Zellkernen zu sehen (siehe Abb. 14 C). Bei einer Konzentration von 10 µg/ml VEBP wurden nach 5 Tagen nur noch vereinzelte Synzytien mit 10 - 15 Zellkernen beobachtet (siehe Abb. 14 D).

Bei einer Konzentration von 20 µg/ml VEBP war eine fast vollständige Inhibition der HIV-1_{NL-991}-induzierten Synzytienbildung zu sehen (siehe Abb. 14 E). Nach 5 Tagen war ein einziges Synzytium mit 5 - 10 Zellkernen entstanden. Als Kontrolle zeigt Abbildung 14 F gefärbte, uninfizierte GHOST-HI5-Zellen.

In diesen Versuchen zeigte sich, dass VEBP die HIV-1_{NL4-3}-induzierte Synzytienbildung zu 100% und die HIV-1_{NL-991}-induzierte Synzytienbildung fast vollständig in GHOST-CXCR4- bzw. GHOST-HI5-Zellen bei einer Konzentration von 20 µg/ml inhibiert. Aus den Versuchen ergab sich hierbei ein ungefährer EC₅₀-Wert von 10 µg VEBP/ml (150 nM) für die Inhibition der HIV-1_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung bzw. für die Inhibition der HIV-1_{NL-991}-induzierten Synzytienbildung.

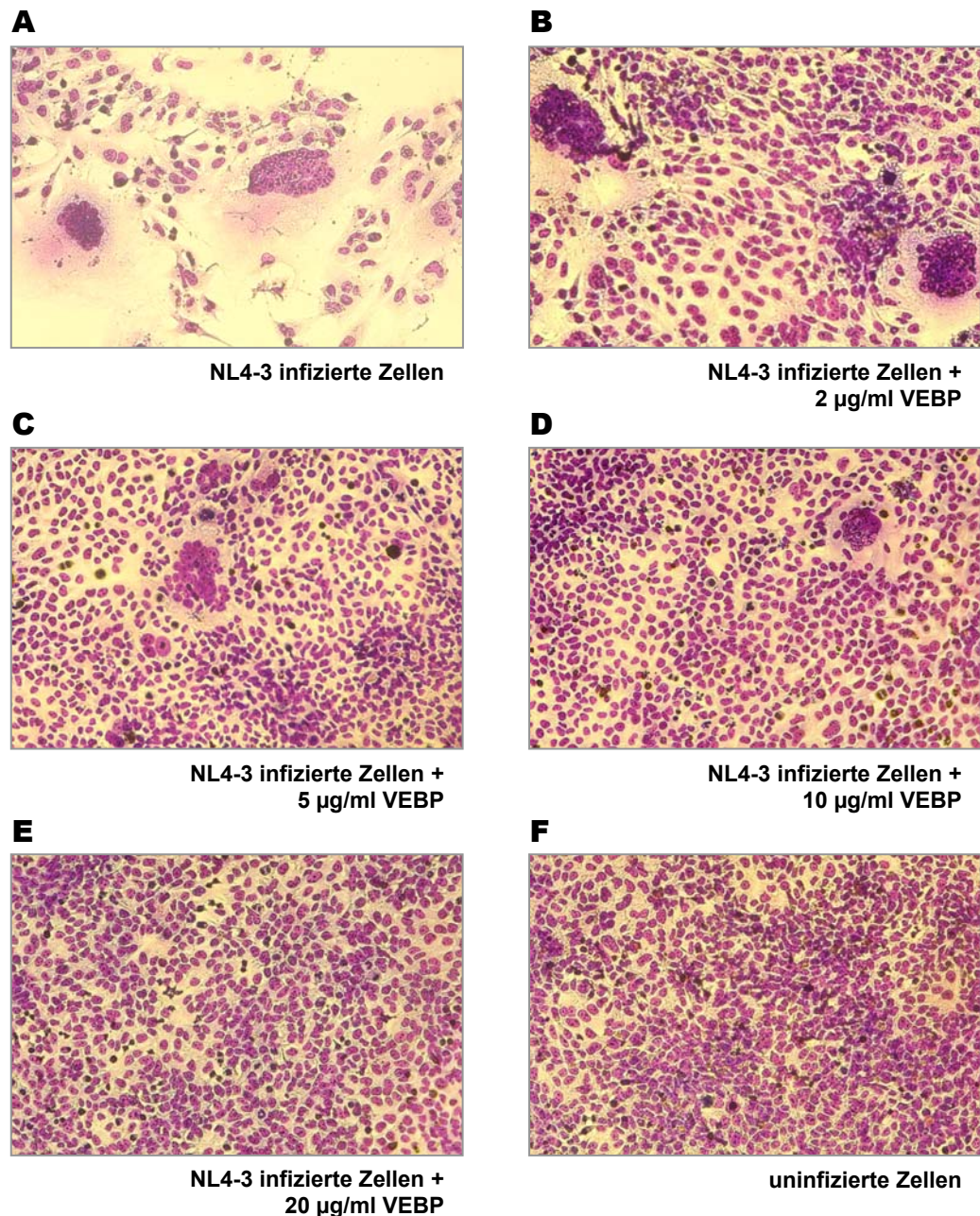


Abb. 13: Inhibition der HIV-1_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung durch VEBP

GHOST-CXCR4-Zellen wurden mit 500 TCID₅₀ des HIV1-Stammes **NL4-3** (X4-trop) infiziert und mit VEBP in verschiedenen Konzentrationen (0, 2, 5, 10 und 20 µg/ml) inkubiert. An Tag 5 wurden die Zellen fixiert, mit Hemacolor[®] angefärbt und unter dem Mikroskop die Synzytienbildung ausgewertet.

- A** mit **NL4-3** infizierte Zellen;
- B** mit **NL4-3** infizierte Zellen + 2 µg/ml VEBP;
- C** mit **NL4-3** infizierte Zellen + 5 µg/ml VEBP;
- D** mit **NL4-3** infizierte Zellen + 10 µg/ml VEBP;
- E** mit **NL4-3** infizierte Zellen + 20 µg/ml VEBP;
- F** uninfizierte Zellen.

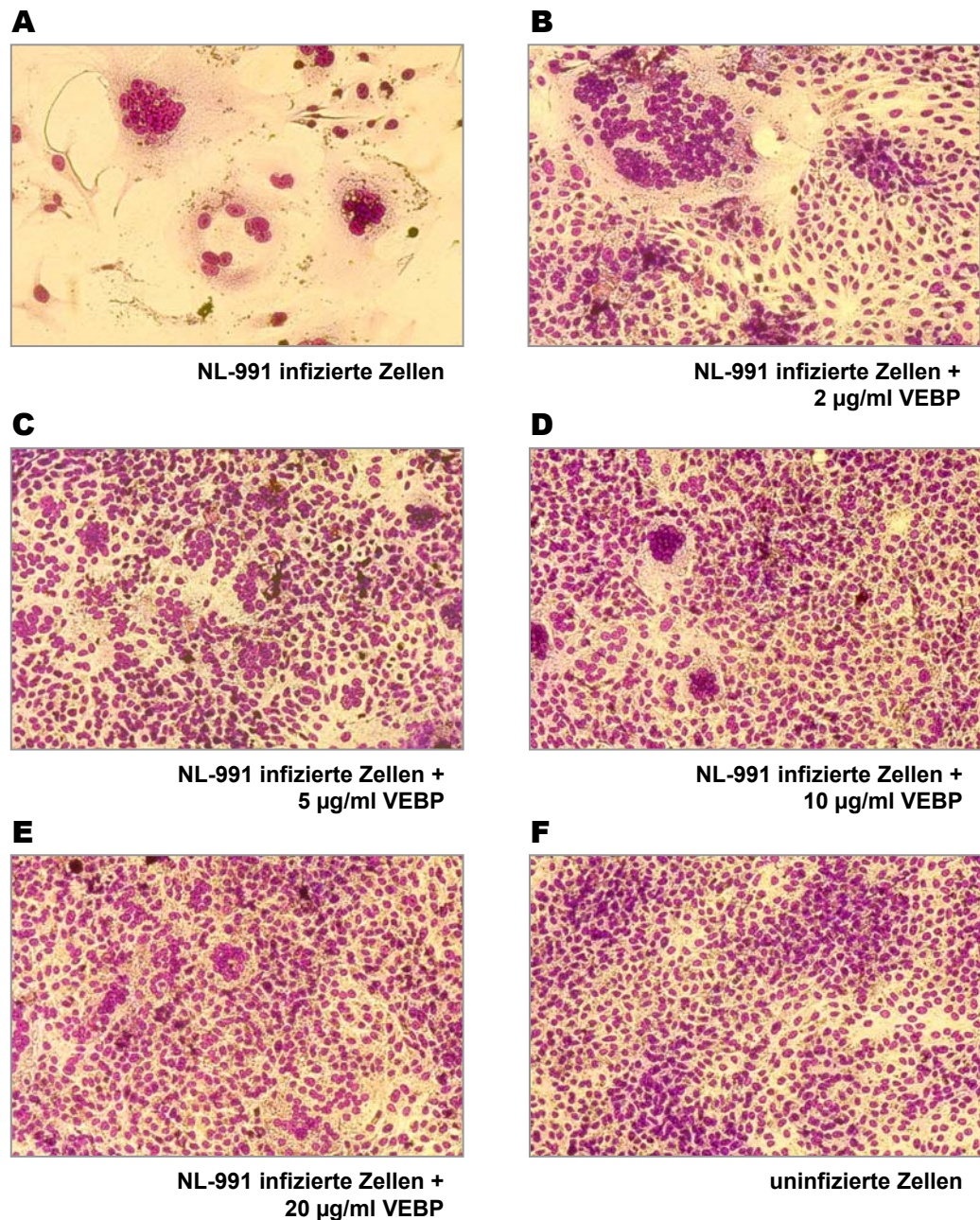


Abb. 14: Inhibition der HIV-1_{NL-991}-induzierten Synzytienbildung durch VEBP
 GHOST-CCR5-Zellen wurden mit 500 TCID₅₀ des Virusstammes **NL-991** (R5-trop) infiziert und mit VEBP in verschiedenen Konzentrationen (0, 2, 5, 10 und 20 µg/ml) inkubiert. An Tag 5 wurden die Zellen fixiert, mit Hemacolor[®] angefärbt und unter dem Mikroskop die Synzytienbildung ausgewertet.

- A** mit **NL-991** infizierte Zellen;
- B** mit **NL-991** infizierte Zellen + 2 µg/ml VEBP;
- C** mit **NL-991** infizierte Zellen + 5 µg/ml VEBP;
- D** mit **NL-991** infizierte Zellen + 10 µg/ml VEBP;
- E** mit **NL-991** infizierte Zellen + 20 µg/ml VEBP;
- F** uninfizierte Zellen.

3.6 Inhibition der HIV-1-Vermehrung durch VEBP

Zum Nachweis einer HIV-Infektion wurde in dem HIV-1-Infektionstest (siehe Abschnitt 3.5, Seite 70) auch der Gehalt des HIV-Capsidproteins p24 bestimmt. Die Menge der produzierten Viren ist in diesem Test proportional zur Menge des Capsidproteins p24.

Die Indikatorzelllinien GHOST-CXCR4 bzw. GHOST-HI5 wurden, wie unter Abschnitt 3.5 (Seite 70) beschrieben, mit 500 TCID₅₀ des X4-tropen Virus NL4-3 bzw. des R5-tropen Virus NL-991 infiziert und mit verschiedenen Konzentrationen VEBP (5, 10, 15 oder 20 µg/ml) oder HSA (5, 10, 15 oder 20 µg/ml) inkubiert. Nach 5 Tagen wurden die Überstände der Zellkultur abgenommen und der p24-Gehalt des Überstandes mit einem p24-Antigen Nachweis bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.4.3, Seite 43).

Der Gehalt der Zellüberstände an Capsidprotein p24 wird in Abbildung 15 (siehe Seite 75) gezeigt. Die mit NL4-3 bzw. NL-991 infizierten GHOST-CXCR4-Zellen bzw. GHOST-HI5-Zellen zeigten bei Inkubation mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml HSA keine Veränderung hinsichtlich der Vermehrung des NL4-3 bzw. NL-991 (siehe Abbildung 15 grüner/roter Kreis) bzw. p24-Gehalts. Die Menge an p24 verglichen mit infizierten Zellen ohne Vorinkubation der Virusstämme mit HSA nahm nicht ab. Die Menge an p24 hatte annähernd den gleichen Wert wie bei den infizierten Zellen ohne Inkubation mit HSA.

In diesem Versuch wurde beobachtet, dass der Gehalt an p24 und somit die Vermehrung des NL4-3 in der Indikatorzelllinie GHOST-CXCR4 bei Inkubation mit 20 µg/ml VEBP verglichen mit infizierten Zellen ohne Vorinkubation mit VEBP um > 80% reduziert wurde (siehe Abb. 15 rotes Viereck). Es ergab sich aus der Abbildung für den X4-tropen Virus NL4-3 ein EC₅₀-Wert von etwa 3 µg/ml (44 nM).

Bei den mit 500 TCID₅₀ des R5-tropen Virus NL-991 infizierten GHOST-HI5-Zellen wurde 20% weniger an Capsidprotein p24 verglichen mit der Menge an p24 der nicht mit VEBP vorinkubierten, infizierten Zellen in Anwesenheit von 20 µg/ml VEBP gebildet (siehe Abb. 15 grünes Viereck).

Der p24-Wert des X4-tropen Virus NL4-3 wurde also in diesem Versuch durch 20 µg/ml VEBP um > 80% reduziert, der p24-Wert von NL-991 (R5-trop) nur um 20%. VEBP neutralisierte somit das X4-trope Virus besser als das R5-trope Virus.

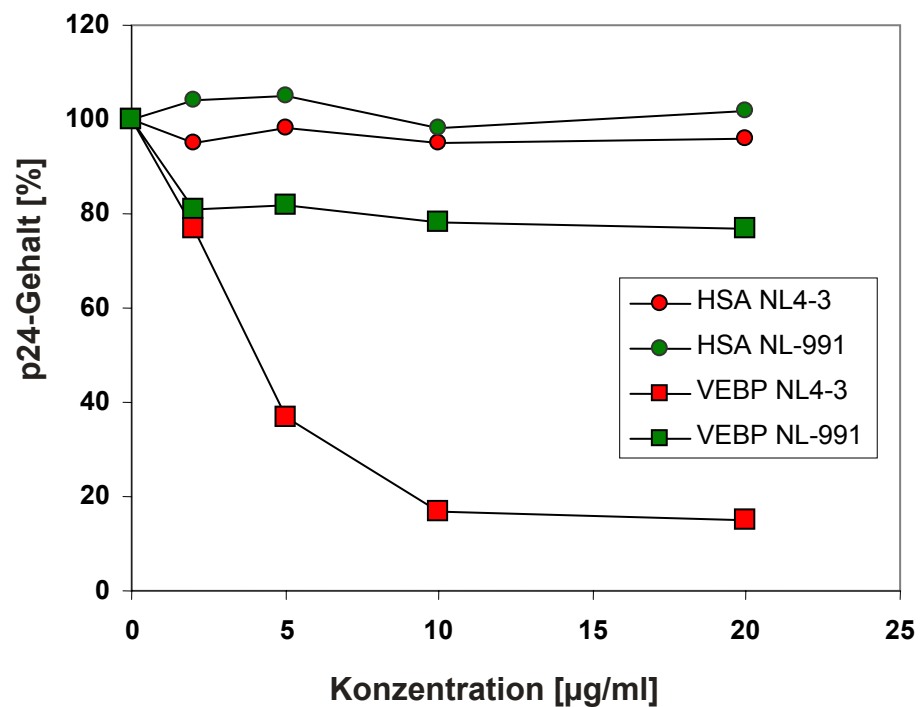


Abb. 15: Inhibition der HIV-1 Vermehrung durch VEBP

GHOST-CXCR4- bzw. GHOST-HI5-Zellen wurden jeweils mit 500 TCID₅₀ des HIV-1 Laborstammes **NL4-3** (X4-troper Virus) oder **NL-991** (R5-troper Virus) nach 1 h Vorinkubation der Viren mit verschiedenen Konzentrationen an VEBP (0, 2, 5, 10 und 20 µg/ml) oder HSA in jeweils gleicher Konzentration infiziert. Nach 5 Tagen wurden die Zellüberstände abgenommen und die Menge an Capsidprotein p24, die proportional zur Virusmenge ist, mit einem p24-Antigen-ELISA bestimmt. Es handelt sich jeweils um den Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

Grünes Viereck: VEBP (NL-991); rotes Viereck: VEBP (NL4-3);

grüner Kreis: HSA (NL-991); roter Kreis: HSA (NL4-3).

3.7 HIV-1_{NL991}-Neutralisationsversuche mit HOCl-modifizierten β -Galaktosidase- und GST-V3-Proteinen

Da gezeigt wurde, dass VEBP die HIV-1-Vermehrung des X4-tropen Virus NL4-3 und des R5-tropen Virus NL-991 inhibiert (siehe Abschnitt 3.6, Seite 74), wurden die HOCl-modifizierten Proteine m β Gal_{1:500} und mGST-V3_{1:200}, auf ihre potentielle Inhibitionswirkung der Virusvermehrung des R5-tropen Stammes NL-991 getestet.

Es wurde wiederum (siehe Abschnitt 3.6, Seite 74) der Gehalt des Zellüberstandes an HIV-Capsidprotein p24 bestimmt.

Die Indikatorzelllinie GHOST-HI5 wurde, wie unter Abschnitt 3.5 (Seite 70) beschrieben, mit 500 TCID₅₀ des R5-tropen Virus NL-991 infiziert und mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 20 und 50 μ g/ml) der HOCl-modifizierten Proteine m β Gal_{1:500} oder mGST-V3_{1:200} sowie BSA (1, 5, 20 und 50 μ g/ml) inkubiert. Nach 5 Tagen wurden die Überstände der Zellkultur abgenommen und der p24-Gehalt des Überstandes mit einem p24-Antigen Nachweis bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.4.3, Seite 43).

Der Gehalt der Zellüberstände an Capsidprotein p24 wird in Abbildung 16 (Seite 77) gezeigt. Die HOCl-modifizierten Proteine m β Gal_{1:500} und mGST-V3_{1:200} inhibierten bis zu einer Konzentration von 50 μ g/ml nicht die HIV-1_{NL991}-Vermehrung. Die GHOST-HI5-Zellen zeigten bei Inkubation mit 1, 5, 20 und 50 μ g/ml an HOCl-modifizierten Proteinen keine Veränderung hinsichtlich der Vermehrung des Virus NL-991 (siehe Abb. 16 grünes Dreieck/grünes Viereck) bzw. p24-Gehalts. Die Menge an p24 verglichen mit infizierten Zellen ohne Vorinkubation des Virusstammes nahm nicht ab. Die Menge an p24 hatte annähernd den gleichen Wert wie bei den infizierten Zellen ohne Inkubation mit m β Gal_{1:500} oder mGST-V3_{1:200}.

In diesem Versuch wurde bestätigt, dass es bei der Inkubation des Virusstammes mit BSA bis zu einer Konzentration von 50 μ g/ml zu keiner Inhibition der HIV-1_{NL991}-Vermehrung kommt (Abb. 16 grüne Raute).

Die Versuche zeigten, dass die HOCl-modifizierten Proteine m β Gal_{1:500} und mGST-V3_{1:200} nicht wie VEBP die HIV-1_{NL991}-Vermehrung inhibieren. Die modifizierten HSA-Proteine mHSA_{1:200} und mHSA_{1:500} zeigten bei diesen molaren Verhältnissen antivirale Aktivität gegen NL-991 (eigene Beobachtung).

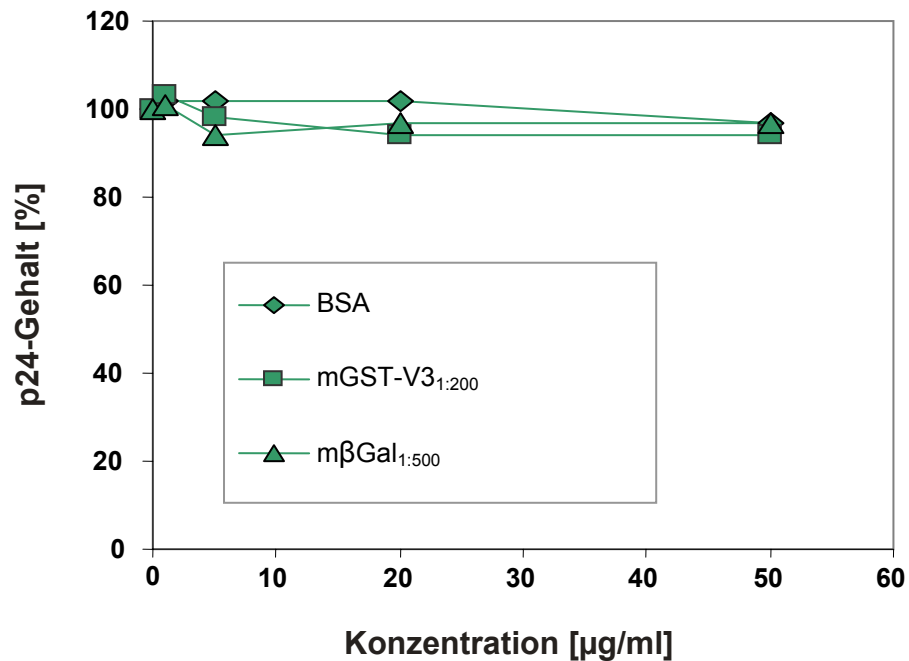


Abb. 16: HIV-1_{NL-991}-Neutralisationsversuche mit den HOCl-modifizierten Proteinen mβGal_{1:500} und mGST-V3_{1:200}

GHOST-HI5-Zellen wurden mit 500 TCID₅₀ des HIV -1 Laborstammes **NL-991** (R5-troper Virus) nach 1 h Vorinkubation der Viren mit verschiedenen Konzentrationen an mβGal_{1:500} und mGST-V3_{1:200} (0, 1, 5, 20 und 50 µg/ml) sowie BSA in jeweils gleicher Konzentration infiziert. Nach 5 Tagen wurden die Zellüberstände abgenommen und das Capsidprotein p24 und somit die dazu proportionale Virusmenge mit einem p24-Antigen-ELISA bestimmt. Es handelt sich jeweils um den Mittelwert einer Zweifachbestimmung.

Grüne Raute: BSA; grünes Viereck: mGST-V3_{1:200}; grünes Viereck: mβGal_{1:500}.

3.8 Neutralisation von verschiedenen HIV-1-Subtypen und HIV-2 durch VEBP

Da gezeigt wurde, dass die beiden Virusvarianten NL4-3 (X4-trop) und NL-991 (R5-trop) durch VEBP neutralisiert und die HIV-1-induzierte Synzytienbildung verhindert wird (siehe Abschnitt 3.5 und 3.6, Seite 70 und 74), wurde VEBP gegen verschiedene HIV-1-Stämme (Subtypen A, B, C, D, G, O und N) sowie gegen den HIV-2-Stamm CBL20_{HIV-2} (siehe Tabelle 5, Seite 80) getestet.

Dabei wurde ein *Bluecell*-Infektionstest verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4.4, Seite 44). HeLa-TZM-bl-Indikatorzellen, die CD4, CXCR4 und CCR5 stabil exprimieren und die beiden Reportergene Luciferase und β -Galaktosidase enthalten, wurden mit jeweils 500 infektiösen Einheiten der verschiedenen HIV-Stämme infiziert. So wurde gewährleistet, dass die verschiedenen HIV-Stämme vergleichbar ausgewertet werden konnten. Die Viren wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen VEBP (0,1, 1, 10 und 100 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Infektionsereignisse (blaugefärbte Zellen) ausgezählt und damit die Transfektionsrate für die verschiedenen Stämme bestimmt. Dabei wurde die Anzahl der infizierten Indikatorzellen mit 500 infektiösen Viruseinheiten gleich 100 gesetzt (Transfektion = 100%) und dementsprechend die Transfektionsraten der Zellen bei Anwesenheit der verschiedenen Konzentrationen an VEBP berechnet. In Abbildung 19 (Seite 83) wird ein Überblick der Transfektionsraten bei der Neutralisation der verwendeten Virusstämme bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ VEBP gezeigt.

Die Versuche zeigten folgende Ergebnisse. Bei den beiden HIV-1 Subtyp-B-Stämmen BaL (R5-trop) und JR-CSF (R5-trop) wurde die Infektion der HeLa-TZM-bl-Indikatorzellen mit 500 infektiösen Viruseinheiten in Anwesenheit von 100 $\mu\text{g/ml}$ VEBP zu 100% inhibiert (siehe Abbildung 17 A, Seite 81). Es ergab sich aus der Abbildung für beide Viren eine Wirksamkeit von etwa $\text{EC}_{50} \approx 15 \mu\text{g/ml}$ (220 nM). Der Virusstamm 92UG029, ein X4-troper Subtyp-A-Stamm, infizierte ebenfalls infolge der Inkubation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ VEBP keine Indikator-Zellen. Es ergab sich für 92UG029 ein EC_{50} -Wert von etwa 7 $\mu\text{g/ml}$ (90 nM). Die Infektion der Indikator-Zellen mit den Virusisolaten TZ05 und 98BR04 wurde durch die

Anwesenheit von 100 µg/ml VEBP zu 80 bzw. 82% inhibiert (siehe Abb. 17 B, Seite 81). Dies entsprach einer Wirksamkeit für VEBP von $EC_{50} \approx 50$ µg/ml (735 nM). Die beiden Virusstämme TZ05 und 98BR04 sind HIV-1 Subtyp-C-Stämme und benutzen als Korezeptor CCR5.

Die HIV-1 Subtyp-Stämme 92UG021 (X4-trop, Subtyp-D) und RU570 (R5-trop, Subtyp-G) sowie mvp2171 (X4-trop, Subtyp-O) wurden bei einer Konzentration von 100 µg/ml VEBP vollständig neutralisiert (siehe Abbildung 18 A, Seite 82). Daraus ergaben sich für die Inhibition der Infektion EC_{50} -Werte von ca. 15 µg/ml (150 nM) für die Virusstämme 92UG021 und RU570 sowie für das Virusisolat mvp2171 ein Wert von ca. 6 µg/ml (88 nM).

Die Infektion der HeLa-Indikatorzellen mit den beiden Subtyp-D-Stämmen 92UG035 (R5-tropes Virus) und ELI (X4-tropes Virus) wurde bei einer Konzentration von 100 µg/ml VEBP um > 90% inhibiert (ELI: 5% infizierte Zellen bei 500 infektiösen Einheiten, 92UG035: 14% infizierte Zellen bei 500 infektiösen Einheiten). Es ergaben sich die EC_{50} -Werte von ca. 20 µg/ml (294 nM) für ELI und eine $EC_{50} \approx 15$ µg/ml (220 nM) für 92UG035.

Bei den HIV-1 Subtypen mvp8161 (Subtyp-O, X4-trop) und YPF30 (Subtyp-N, R5-trop) sowie beim HIV-2 Stamm CBL20_{HIV-2} (Subtyp-A, CXCR4-Korezeptor-nutzend) wurde die Infektion der HeLa-Indikatorzellen mit 500 infektiösen Viruseinheiten in Anwesenheit von 100 µg/ml VEBP um 70 - 80% gesenkt (siehe Abb. 18 B, Seite 82). Es ergaben sich EC_{50} -Werte von etwa 50 µg/ml (735 nM) für YPF30 und für mvp8161 sowie CBL20 eine $EC_{50} \approx 80$ µg/ml (1176 nM).

Diese Ergebnisse zeigten, dass VEBP eine breite anti-HIV-Wirksamkeit gegen verschiedene Virusstämme der HIV-1-Subtypen A, B, C, D, G, O und N sowie gegen das HIV-2 Isolat CBL20_{HIV-2} besitzt. Unter den HIV-1-Stämmen befanden sich sowohl X4-trope als auch R5-trope Viren.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten HIV-Stämme

HIV-1 Subtyp	Name	Synzytium-Induzierend (SI) / Nicht-Synzytium-Induzierend (NSI)	Korezeptorusage X4-trop/R5-trop
A	92UG029	SI	CXCR4
B	BaL	NSI	CCR5
	JR-CSF	NSI	CCR5
C	TZ05	NSI	CCR5
	98BR04	NSI	CCR5
D	ELI	SI	CXCR4
	92UG021	SI	CXCR4
	92UG035	NSI	CCR5
G	RU570	NSI	CCR5
O	mvp2171	SI	CXCR4
	mvp8161	SI	CXCR4
N	YPF30	NSI	CCR5
HIV-2			
A	CBL20 _{HIV-2}	SI	CXCR4

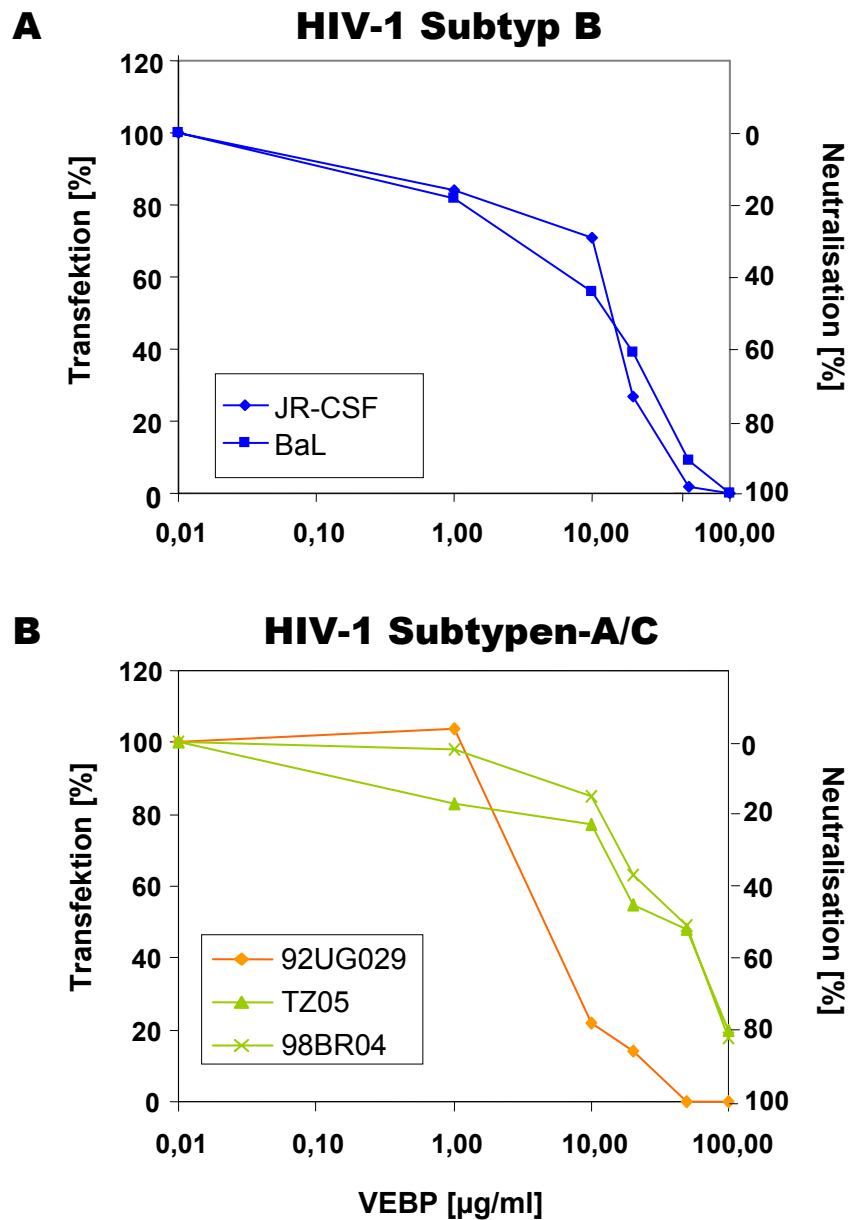


Abb. 17: Neutralisation der HIV-1-Subtypen-A/B/C

HeLa-TZM-bl-Zellen ($CD4^+$, $CXCR4^+$, $CCR5^+$, $Luciferase^+$, β -Galaktosidase $^+$) wurden mit jeweils 500 infektiösen Einheiten der verschiedenen HIV-1-Isolate, die 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an VEBP (0,1, 1, 10, 100 µg/ml) vorinkubiert wurden, infiziert. Nach 3 Tagen wurden die infizierten Zellen nach der Färbung ausgezählt.

- A** HIV-1 Subtyp-B BaL (R5-trop), JR-CSF (R5-trop);
- B** HIV-1 Subtyp-A 92UG029 (X4-trop);
- Subtyp-C TZ05 (R5-trop), 98BR04 (R5-trop).

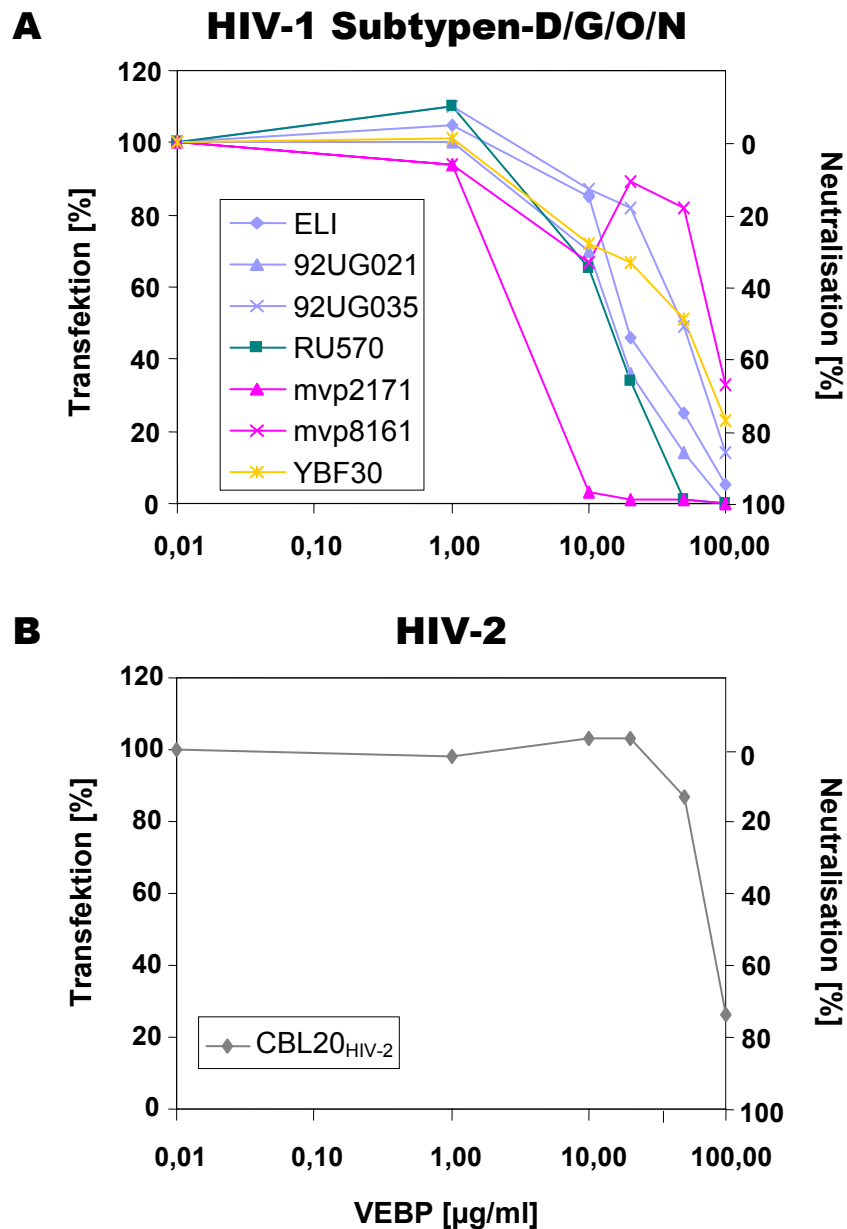


Abb. 18: Neutralisation der HIV-1-Subtypen-D/G/O/N und HIV-2 durch VEBP
 HeLa-TZM-bl-Zellen (CD4⁺, CXCR4⁺, CCR5⁺, Luciferase⁺, β -Galaktosidase⁺) wurden mit jeweils 500 infektiösen Einheiten der verschiedenen HIV-1-Isolate und des HIV-2-Isolates, die 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an VEBP (0,1, 1, 10, 100 μ g/ml) vorinkubiert wurden, infiziert. Nach 3 Tagen wurden die infizierten Zellen nach der Färbung ausgezählt.

- A** HIV-1 Subtyp-D ELI (X4-trop), 92UG021 (X4-trop),
 92UG035 (R5-trop);
 HIV-1 Subtyp-G RU570 (R5-trop);
 HIV-1 Subtyp-O mvp2171 (X4-trop) mvp8161(X4-trop);
 HIV-1 Subtyp-N YBF30 (R5-trop);
B HIV-2 Subtyp-A CBL20_{HIV-2} (X4-trop).

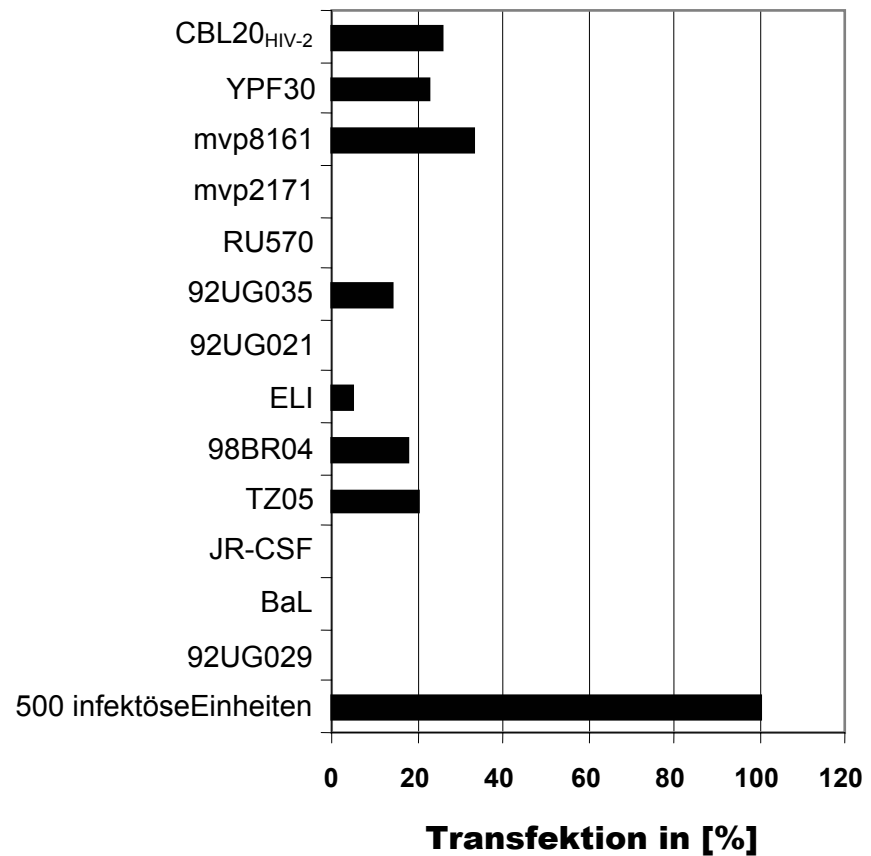


Abb. 19: Neutralisation der HIV-Virusstämme durch VEBP

Die im *Bluecell*-Infektionstest mit 500 infektiösen Viruseinheiten infizierten Zellen wurden ausgezählt und gleich 100 gesetzt (Transfektion = 500 infektiöse Einheiten = 100%).

Dementsprechend wurden die Transfektionsraten in Anwesenheit von 100 µg/ml VEBP berechnet. Es handelt sich hier jeweils um Doppelbestimmungen. Die Abbildung gibt einen Überblick über die VEBP-Neutralisierbarkeit der verwendeten Virusstämme.

3.9 Vergleich der VEBP-Sensitivität gegenüber den X4-tropen und den R5-tropen Virusstämmen

In Abbildung 20 (siehe Seite 85) wurde die VEBP-Sensitivität gegenüber den verwendeten X4-tropen Virusstämmen und den R5-tropen Virusstämmen des *Bluecell*-Infektionstestes (siehe Abschnitt 3.7, Seite 78) miteinander verglichen. Die X4-tropen Virusstämme sind rot dargestellt, die R5-tropen Virusstämme sind grün dargestellt.

Die Virusstämme mvp2171, 92UG021, 92UG029, ELI, mvp8161 sowie das HIV-2 Isolat CBL20 sind X4-trop. Die Subtyp-O-Stämme mvp2171 und mvp8161 sowie das HIV-2-Isolat CBL20 sind gestrichelt dargestellt, da diese Stämme keine HIV-1-typischen V3-Loop-Sequenzen besitzen (siehe Abschnitt 3.10, Seite 86). Der X4-trope Virusstamm ELI ist orange dargestellt, da das Virus eine X4-untypische Ladung im V3-Loop zeigt (siehe auch Abschnitt 3.10, Seite 86). Die Virusstämme BaL, JR-CSF, RU570, TZ05, 98BR04, 92UG035 und YBF30 sind R5-trop.

Anhand der schwarzen gestrichelten Linie wurden die EC_{50} -Werte für die Virusstämme abgeschätzt. Dabei ergab sich ein mittlerer Fehler von ungefähr +/-10%.

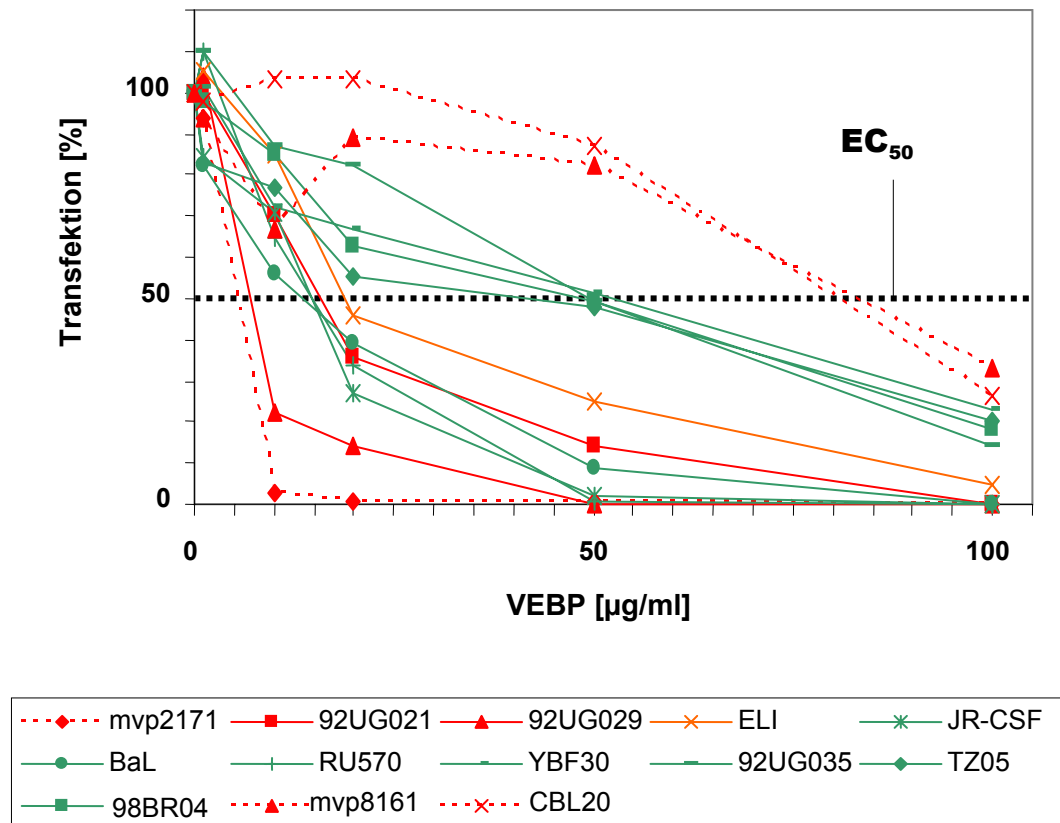


Abb. 20: Vergleich der VEBP-Sensitivität gegenüber den X4-tropen und den R5-tropen Virusstämmen

Die X4-tropen Virusstämmen mvp2171, 92UG021, 92UG029, mvp8161 und das X4-trope HIV-2-Isolat CBL20 sind rot dargestellt. Die Subtyp-O-Stämme mvp2171 und mvp8161 sowie das HIV-2-Isolat CBL20 sind gestrichelt dargestellt, da diese Stämme keine HIV-1-typische V3-Loop Sequenzen besitzen (siehe Abschnitt 3.10, Seite 86). Der X4-trope Virusstamm ELI ist orange dargestellt, da das Virus eine X4-untypische Ladung im V3-Loop zeigt (siehe auch Abschnitt 3.10). Die R5-tropen Virusstämmen BaL, JR-CSF, RU570, TZ05, 98BR04, 92UG035 und YBF30 sind grün dargestellt. Anhand der schwarzen gestrichelten Linie wurden die EC₅₀-Werte für die einzelnen Virusstämmen abgeschätzt.

3.10 Vergleich der Nettoladungen der V3-Loop-Sequenzen der verwendeten HIV-Isolate

In Tabelle 6 (siehe Seite 87) wurden die V3-Loop-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Virusstämme aufgelistet und die Nettoladungen des V3-Loops innerhalb der Cystein-Cystein_{Disulfidbindung}-Sequenz berechnet. Die Virusstämme wurden in X4-trope Viren (NL4-3, 92UG029, 92UG021 und ELI, rot) und R5-trope Viren (NL-991, BaL, JR-CSF, RU570, TZ05, 98BR04, 92UG035 und YBF30, grün) sowie die X4-tropen Subtyp-O-Viren mvp2161 und mvp8171 und das X4-trope HIV-2-Isolat CBL20_{HIV-2}, die für HIV-1 untypische V3-Loop-Sequenzen besitzen, eingeteilt.

Die Nettoladung des V3-Loops der Virusstämme wurde folgendermaßen berechnet: Die Anzahl der positiv geladenen Aminosäuren (Arginin und Lysin) des V3-Loops (innerhalb der Cystein-Cystein_{Disulfidbindung}-Sequenz) wurden addiert und davon die Summe an negativ geladenen Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäure) subtrahiert. Als Beispiel zur Berechnung der Nettoladung des V3-Loops soll dies am Subtyp-D Virusstamm 92UG029 gezeigt werden: Der V3-Loop besitzt 8 positiv geladene Aminosäuren (6R + 2K) und 2 negativ geladene Aminosäuren (2D). Daraus ergibt sich eine Nettoladung von **+6** des V3-Loops von 92UG029.

In der Tabelle wurden zudem die aus der Abbildung 20 (siehe Abschnitt 3.9, Seite 85) entnommenen EC₅₀-Werte der verwendeten Virusstämme aufgelistet. Die EC₅₀-Werte für NL4-3 und NL-991 stammen aus der Abbildung 15 (siehe Abschnitt 3.7, Seite 75).

Tabelle 6 : Vergleich der V3-Loop-Sequenzen der verwendeten HIV-Isolate

Subtyp	Virus	V3-Loop-Sequenz	Korezeptor	Aminosäuren		Netto-Ladung ^c	EC ₅₀ -Wert ^d [µg/ml]	Referenz
				K/R ^a	D/E ^b			
B	NL4-3	CTRPNNN-TRKS-IRIQRGPGRAFVTIGKI-GNMRQAHC	CXCR4	8	0	+ 8	3	acc. # M19921
A	92UG029	CTRPNNN-ISRRRIHI-GRGQAFYATGGMTGNIRQAYC	CXCR4	6	0	+ 6	7,5	acc. # AF205862
D	92UG021	CTRPYDK-VSYR-TPI-GVGRASYTTR-RKGDIRQAHC	CXCR4	8	2	+ 6	16	acc. # U27399
D	ELI	CARPYQN-TRQR-TPI-GLGQSLYTTRSRS-IIGQAHC	CXCR4	5	0	+ 5	19	acc. # K03454
B	NL-991	CTRPNNN-TRRS-IPI-GPGRAFYTGGDIVGDIRQAHC	CCR5	5	2	+ 3	>20 ^e	Polzer <i>et al.</i> , 2002
B	JR-CSF	CTRPSNN-TRKS-IHI-GPGRAFYTGGIIGDIRQAHC	CCR5	5	2	+ 3	15	acc. # M38429
B	BaL	CTRPNNN-TRKS-IHI-GPGRALYTTGEEIIGDIRQAHC	CCR5	5	2	+ 3	14	acc. # M68893
G	RU570	CTRPNNN-TRKS-ISF-GPGQAIYTTGNIIGDIRQAHC	CCR5	4	1	+ 3	15	acc. # U08368
D	92UG035	CIRPYNN-TREG-THI-GPGRALFTT-DIIGDIRQAHC	CCR5	4	3	+ 1	50	acc. # AY669755
C	TZ05	CTRPNNN-TRES-VRI-GPGQAFYATGDIIGDIRQAHC	CCR5	4	3	+ 1	42	Hauser, BNI
C	98BR04	CTRPNNN-TRES-IRI-GPGQTFYATGDIIREIRQAHC	CCR5	5	3	+ 2	48	acc. # AY669740
N	YBF30	CTRPGNN-TGGQ-VQI-GPAMTFYNIKIVGDIRQAYC	CCR5	3	2	+ 1	51	acc. # AJ006022
O	mvp2171	CNRPKMKI-QK-IRV--GPMARYSTY----RNSGVSSSKIASC	CXCR4	8	0	+ 8	6	unpublished data
O	mvp8161	CKRPNMEI-QK-IRI--GPMGRYSTYSTYAKNSGGSASKMAYC	CXCR4	7	1	+ 6	82	acc. # AF009034
A	CBL20 _{HIV-2}	CKRNGNK-TVLPI-TL-GSGHRFHAQPIISKRPQAWC	CXCR4	7	0	+ 7	80	Liu <i>et al.</i> , 2000

^a K/R: die Aminosäuren Arginin und Lysin sind bei pH 7,4 positiv geladen

^b D/E: die Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure sind bei pH 7,4 negativ geladen

^c Nettoladung = Summe (positiv geladener Aminosäuren) – Summe (negativ geladener Aminosäuren) des V3-Loops (innerhalb der Cystein-Cystein_{Disulfidbindung}-Sequenz)

^d EC₅₀-Werte des VEBP wurden aus der Abbildung 20 (Seite 86) entnommen (Mittlerer Fehler von +/- 10%)

^e VEBP wurde bei den Neutralisationsversuchen des Virus NL-991 nur bis zu einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt

3.11 Toxizitätsuntersuchungen *in vitro*

3.11.1 Populationsverdopplungstest von HeLa-Zellen

Als einfache Proliferationskontrolle für Zellen in Anwesenheit von VEBP und um das Toxizitätspotential von VEBP abzuschätzen, wurde zunächst ein Populationsverdopplungstest mit HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.3.6, Seite 39). Die Zellen wurden jeweils in Anwesenheit von VEBP bzw. HSA (Konzentration jeweils 200 µg/ml) inkubiert. HSA diente als Kontrolle.

Nach fünf Tagen Wachstum der HeLa-P4-Zellen wurde das Experiment gestoppt, da die Infektionsversuche (siehe Abschnitt 3.5, Seite 70) 5 Tage in Anspruch nahmen.

Es wurde folgendes Ergebnis beobachtet: Das Wachstum der Zellen wurde in Anwesenheit von VEBP bei einer Konzentration von 200 µg/ml verglichen mit dem Wachstum der Zellen in Anwesenheit von HSA nicht gehemmt (siehe Abbildung 21, Seite 89). Die Populationsverdopplungszeit der Zellen in Anwesenheit von VEBP und HSA war gleich groß. Es wurde kein Unterschied beobachtet.

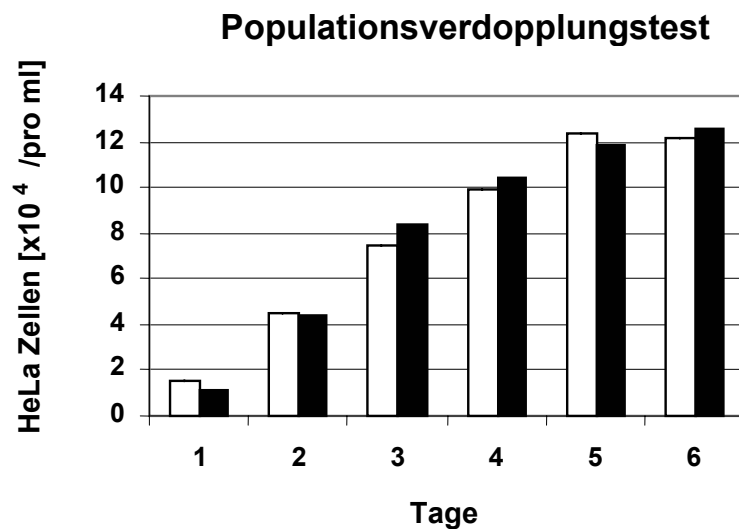


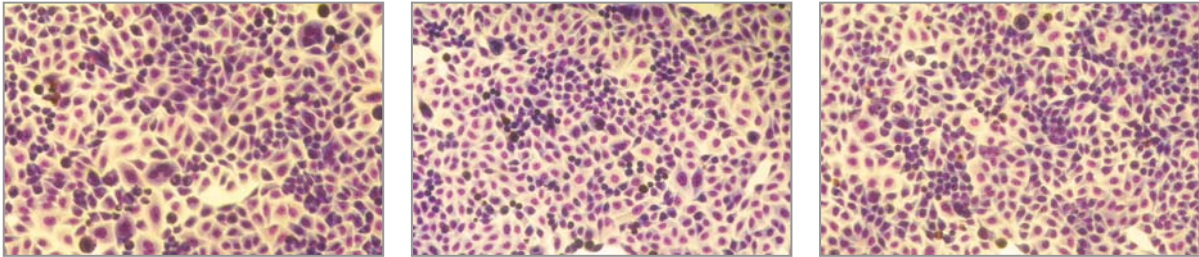
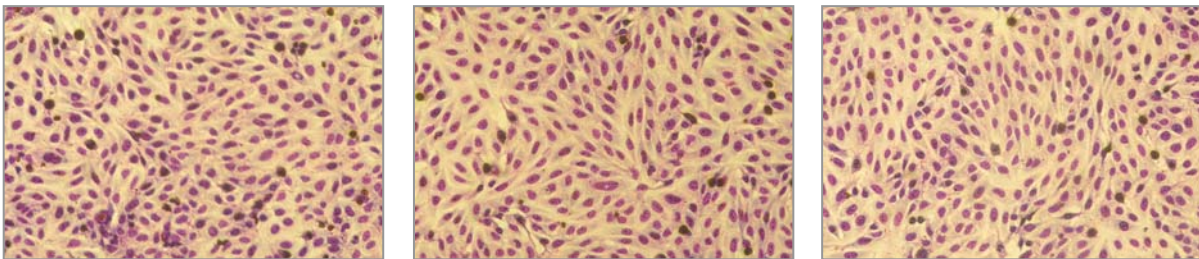
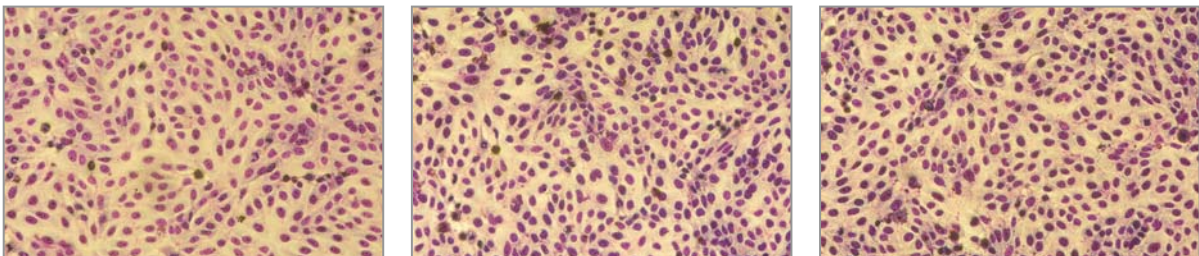
Abb. 21: Populationsverdopplungstest von HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen

HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen (1×10^4) wurden jeweils mit einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ VEBP \square oder HSA \blacksquare in 24-*well*-Zellkulturplatten inkubiert. Nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Tagen wurde jeweils für drei *wells* die Zellzahl pro ml bestimmt. Die Werte für die Balken ergaben sich aus dem Mittelwert von drei Bestimmungen. Es wurde ein mittlerer Fehler von $\pm 5\%$ berechnet.

3.11.2 Lichtmikroskopische Beobachtungen der mit VEBP oder HSA inkubierten Zelllinien

Um die Vitalität der Zellen in Anwesenheit von VEBP zu ermitteln, wurde ein einfacher Stresstest mit HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen, GHOST-CXCR4-Zellen und GHOST-HI5-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden 56 h mit oder ohne VEBP (Konzentration 200 µg/ml) inkubiert, als Kontrolle wurde HSA in der gleichen Konzentration eingesetzt. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und angefärbt (siehe Abschnitt 2.2.3.7, Seite 39) und schließlich unter dem Lichtmikroskop beobachtet und miteinander verglichen (siehe Abbildung 22, Seite 91).

Es wurden folgende Beobachtungen gemacht: Es wurden keine morphologischen Veränderungen bei den drei Zelllinien (siehe Abb. 22 A, 22 B, 22 C) nach 56 h bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml VEBP im Vergleich zu unbehandelt wachsenden Zellen unter dem Lichtmikroskop festgestellt.

A HeLa-P4-CXCR4-CCR5**B GHOST-CXCR4****C GHOST-HI5****Zellen****Zellen +
200 µg/ml VEBP****Zellen +
200 µg/ml HSA****Abb. 22: Vitalität der Zelllinien**

HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen (A), GHOST-CXCR4-Zellen (B) und GHOST-HI5-Zellen (C) wurden in Anwesenheit von 200 µg/ml VEBP 56 h (Abbildungen in der Mitte) inkubiert und anschließend mit Hemacolor® angefärbt (siehe Abschnitt 2.2.3.7, Seite 39). Zur Kontrolle wurden die Zelllinien mit 200 µg/ml HSA (Abbildungen rechts) inkubiert. Es wurde kein sichtbarer Unterschied beim Wachstum und dem Aussehen der Zellen unter dem Lichtmikroskop zwischen den nichtinkubierten Zellen und den mit VEBP oder HSA inkubierten Zellen nach 56 h beobachtet.

3.11.3 ³H-Thymidintest

HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen, GHOST/parenteral-Zellen, GHOST-CXCR4-Zellen, und GHOST-HI5-Zellen sowie Vero-B4-Zellen, die 48 h lang mit VEBP bzw. HSA (Konzentrationen von 1 - 200 µg/ml) inkubiert wurden, wurden wie unter 2.2.5.1 (siehe Seite 45) beschrieben mit ³H-Methyl-Thymidin versetzt und die Einbaurrate von ³H-Methyl-Thymidin in die DNA der Zellen mit einem β-Counter gezählt.

Der Einbau von ³H-Methyl-Thymidin in die DNA der Zelle wurde benutzt, um die Stoffwechselaktivität von Zellen kurzfristig zu beobachten.

Bei allen getesteten Zelllinien:

- HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen
- GHOST/parenteral-Zellen
- GHOST-CXCR4-Zellen
- GHOST-HI5-Zellen
- Vero-B4-Zellen

zeigte VEBP bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml keinen hemmenden oder unterschiedlichen Effekt auf die Stoffwechselaktivität und somit auf die Zellproliferation verglichen mit dem Zellwachstum in Anwesenheit von entsprechenden Konzentrationen an HSA.

Das in dieser Arbeit hergestellte VEBP wurde zur antiviralen Testung gegen andere Viren (West-Nil, Dengue-2-Virus, Gelbfieber-Virus und Hantaan-Virus) auf Vero-B4-Zellen von Markus Voßmann in seiner Arbeit benutzt (Vossmann 2004). Deshalb wurde der ³H-Thymidin-Test auch auf Vero-B4-Zellen durchgeführt.

Abbildung 23 (siehe Seite 93) zeigt die Einbauraten von ³H-Methyl-Thymidin in den HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen (siehe Abb. 23 A), den GHOST-HI5-Zellen (siehe Abb. 23 B) und den Vero-B4-Zellen (siehe Abb. 23 C). Hinsichtlich der Einbaurrate von radioaktiv-markiertem Thymidin in die Zellen lässt sich kein Unterschied nach VEBP- bzw. HSA-Inkubation feststellen.

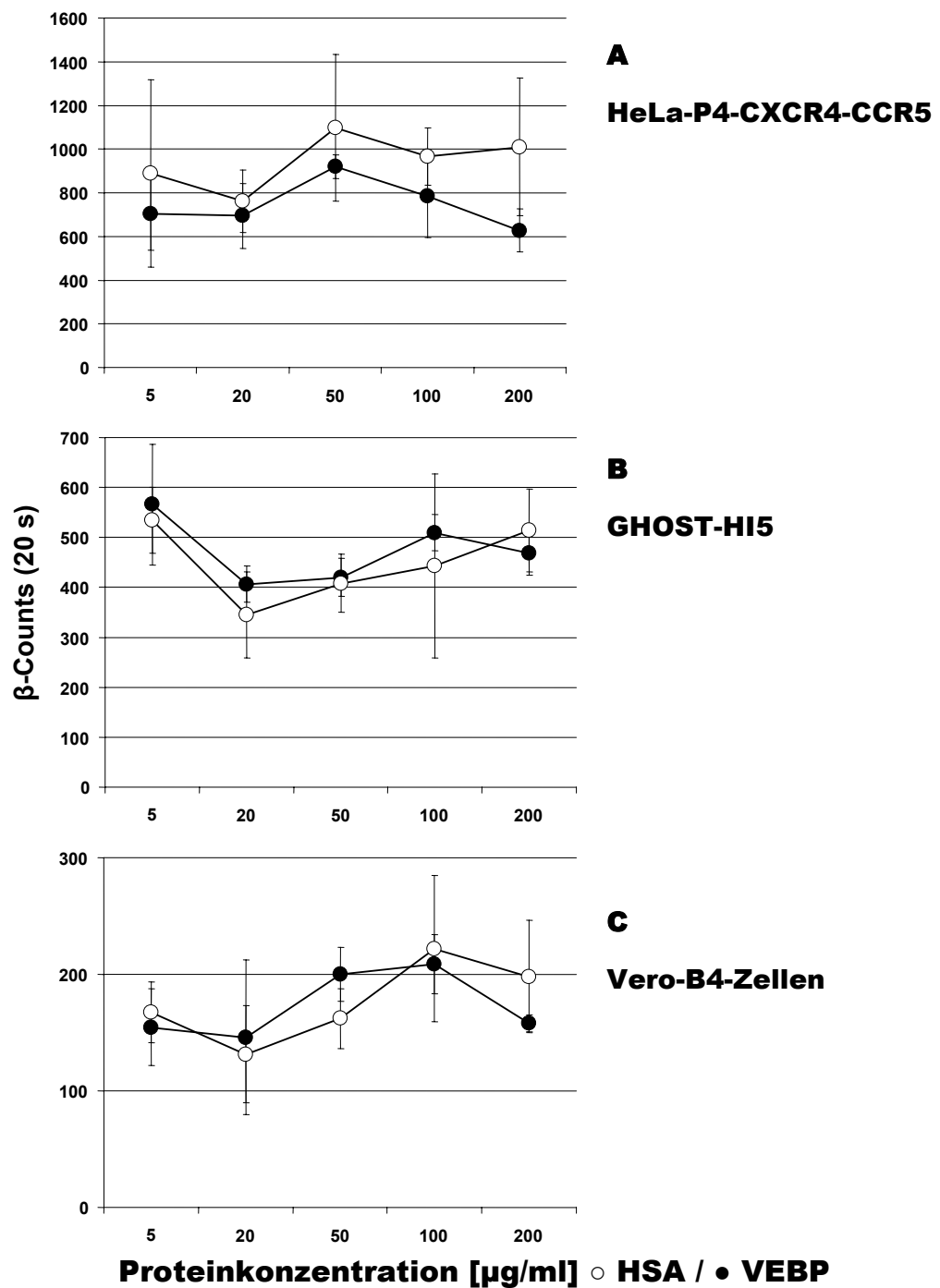


Abb. 23: ^3H -Thymidintest

2×10^4 Zellen (HeLa-P4-CXCR4-CCR5-Zellen (A), GHOST-HI5-Zellen (B) und Vero-B4-Zellen (1×10^4 Zellen) (C) wurden in 96-well-Zellkulturplatten ausgesät und nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (5, 20, 50, 100 und 200 $\mu\text{g/ml}$) an VEBP oder HSA mit ^3H -Methyl-Thymidin 8 h bzw. 12 h (Vero-B4-Zellen) inkubiert. Danach wurde die Einbaurrate von ^3H -Methyl-Thymidin mit einem β -Counter ausgezählt (Messdauer 20 s).

3.11.4 Hämolysetest bei Erythrozyten

Hypochlorige Säure kann die Hämolyse von Erythrozyten verursachen (Vissers *et al.*, 1998). Deshalb wurden jeweils frisch gewonnene Erythrozyten mit verschiedenen Konzentrationen an HOCl-modifizierten Proteinen inkubiert, um die Anwesenheit von HOCl, welches nach der Aufreinigung eventuell noch vom Herstellungsprozeß übrig geblieben ist, in den modifizierten Proteinlösungen ausschließen zu können. Zusätzlich wurde mit diesem Test die potentielle toxische Wirkung (Hämolyse) der HOCl-modifizierten Proteine auf die Erythrozyten untersucht.

Zur Überprüfung der Hämolyse wurden zwei Positivproben (verdünnte HOCl-Lösung im Verhältnis HOCl/NaOCl-Stammlösung zu PBS pH 7,4 1:100 und konzentrierte HOCl/NaOCl-Stammlösung) verwendet (siehe Abschnitt 2.2.5.2, Seite 45). Als Negativkontrolle diente PBS pH 7,4.

Es wurden folgende Ergebnisse beobachtet: VEBP bzw. die HOCl-modifizierten Serum Albumine mPSA_{1:500} und mMSA_{1:500} zeigten bei einer Konzentration von jeweils 250 µg/ml keine erkennbare Hämolyse gegenüber den frischgewonnenen roten Blutkörperchen. Der Überstand blieb nach Zentrifugation klar. Somit kann die Anwesenheit an freier HOCl in den Proteinlösungen ausgeschlossen werden. VEBP und die HOCl-modifizierten Serum Albumine mPSA_{1:500} und mMSA_{1:500} dürften nach diesen Ergebnissen auch keine toxische Wirkung auf die Erythrozyten haben.

Die von Sigma erworbene konzentrierte NaOCl/HOCl-Lösung hingegen bewirkte die sofortige Hämolyse der Erythrozyten zu einer rot-braunen Suspension. Die verdünnte HOCl-Stammlösung lysierte die Erythrozyten erst nach einer halben Stunde, der Überstand färbte sich dabei nach Zentrifugation der Lösung nach und nach rot (siehe Tabelle 7, Seite 95).

Tabelle 7: Hämolysen von frischgewonnenen Erythrozyten

Probe	Erythrozyten	Überstand
Negativprobe PBS pH 7,4	Intakt	klar
Positivprobe HOCl/NaOCl-Lösung	Hämolysen	rot-braune Suspension
Verdünnte HOCl-Lösung ^a pH 7,4	Hämolysen	rot ^d
mPSA _{1:500} ^b	Intakt	klar
mMSA _{1:500} ^b	Intakt	klar
VEBP ^c	Intakt	klar

^a HOCl-Stammlösung Verdünnung 1:100 (NaOCl-Lösung:PBS pH 7,4)

^b HOCl-modifiziertes mPSA_{1:500} und mMSA_{1:500} Konzentration c = 250 µg/ml

^c VEBP Konzentration c = 250 µg/ml

^d Lyse der Erythrozyten nach 30 min Zentrifugation

4 Diskussion

4.1 VEBP im Vergleich zu anderen HIV-Inhibitoren

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HOCl-modifiziertes HSA (VEBP) eine breite Wirksamkeit gegen verschiedene HIV-1-Isolate, die sowohl CXCR4 als auch CCR5 als Korezeptor nutzen, besitzt. Zugleich zeigte VEBP auch antivirale Aktivität gegen das HIV-2 Isolat CBL20_{HIV-2}.

Wie effizient ist nun die VEBP-Aktivität im Vergleich zu anderen antiviralen Substanzen?

Zuerst soll VEBP mit dem *Entry*-Inhibitor Enfurvitid (T-20) verglichen werden. Enfurvitid ist ein Peptid. Es bindet an das Transmembranprotein gp41 und verhindert somit die Fusion von Virus- und Zellmembran. Enfurvitid ist als Medikament zugelassen und wird aktuell in der HIV-Therapie eingesetzt.

Die antivirale Aktivität von VEBP habe ich in einem *Bluecell*-Infektionstest gezeigt. Der Test wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Wei *et al.*, 2002). Auch die antivirale Aktivität des Enfurvitids wurde von Derdeyn und Mitarbeitern mit diesem Test untersucht (Derdeyn *et al.*, 2000). Sie ermittelten für Enfurvitid bei Infektion von HeLa-Zellen (5×10^4 Zellen) mit 2000 infektiösen Einheiten des HIV-1-Stammes NL4-3 eine EC_{50} -Konzentration von $0,125 \mu\text{g}$ Enfurvitid/ml, was bei einem Molekulargewicht von $M_r = 4490$ einer Wirkstoffkonzentration von ca. 28 nM entspricht. Für R5-trope HIV-1 Virusisolate ergaben sich für Enfurvitid EC_{50} -Werte von $0,03$ bis $0,42 \mu\text{g/ml}$ (7 nM bis 94 nM). Für das in dieser Arbeit untersuchte VEBP ergab sich bei Infektion der Indikatorzelllinie GHOST-CXCR4 mit 500 $TCID_{50}$ HIV-1 NL4-3 eine EC_{50} -Konzentration von etwa 44 nM. Im *Bluecell*-Infektionstest neutralisierte VEBP X4-trope und R5-trope Virusstämme im Konzentrationsbereich von 200 nM. Somit ergaben sich EC_{50} -Werte für VEBP im *Bluecell*-Infektionstest, die ungefähr 2x so hoch sind wie die Werte für Enfurvitid. Zusätzlich zu den HIV-1 Untersuchungen haben Wild und Mitarbeiter auch die Wirkung des Enfurvitids gegen HIV-2 getestet. Der verwendete Test war ein *Overlay*-Synzytienbildungstest, für den die Zelllinien MOLT-4 und CEM eingesetzt wurden. Die CEM-Zellen wurden mit dem HIV-1-Stamm LAI (500 $TCID_{50}$) und dem HIV-2-Isolat NIHZ (500 $TCID_{50}$)

infiziert und die Synzytienbildung der MOLT4-Zellen beobachtet. Dabei zeigte sich für Enfurvitid ein EC_{50} -Wert von 0,002 $\mu\text{g/ml}$ gegen das HIV-1 LAI Virus und ein EC_{50} -Wert von 3,5 $\mu\text{g/ml}$ für das HIV-2 Isolat. In einem weiteren Test wurden AA5- oder CEM-Zellen mit zellfreiem Virus infiziert. Dabei ergab sich für Enfurvitid eine EC_{50} von 0,09 $\mu\text{g/ml}$ für HIV-1 LAI und für das HIV-2-Isolat NIHZ ein EC_{50} -Wert von 26 $\mu\text{g/ml}$ (5790 nM) (Wild *et al.*, 1994). Vergleicht man diese Daten mit den VEBP-Neutralisationsdaten, so zeigen sich für VEBP deutlich bessere Werte für die Inhibition eines HIV-2 Virus. Meine Untersuchungen ergaben für die Neutralisation des HIV-2-Stammes CBL20_{HIV-2} eine EC_{50} von etwa 1200 nM.

Vergleicht man die Daten, die aufgrund eines gleichen experimentellen Systems entstanden sind, so zeigt sich für VEBP eine vergleichbare antivirale HIV-1 Effektivität wie für Enfurvitid beschrieben. CBL20_{HIV-2} wird sogar besser durch VEBP neutralisiert als das HIV-2-Isolat NIHZ durch Enfurvitid.

Obwohl Enfurvitid und VEBP beide den Eintritt des Virus in die Zelle verhindern, so wirken sie doch unterschiedlich. Das Enfurvitid Peptid (T-20) bindet an das Transmembranprotein gp41, wogegen VEBP an das Oberflächenprotein gp120 bindet. Andere *Entry*-Inhibitoren gegen HIV-1, welche an gp120 binden sind die Substanzen BMS-806, Cyanovirin N und Dextrin-2-sulfat.

Zurzeit befinden sich diese drei Substanzen in der klinischen Erprobung. Im folgenden werden die *in vitro* Daten für die antivirale Effektivität im Vergleich zu VEBP beschrieben.

Die Substanz BMS-806 hat eine durchschnittliche EC_{50} von 62 nM gegen verschiedene Isolate des HIV-1 Subtyp-B. Die Substanz zeigte allerdings keine Aktivität gegen HIV-2 (Lin P-F *et al.*, 2002).

Der *Attachment*-Inhibitor Cyanovirin N neutralisiert verschiedene HIV-1 Isolate und Laborstämme bei einer EC_{50} von 0,1 bis 37 nM in einem HIV-Infektionstest mit CEM-Zellen. Unter anderem wurde auch das HIV-1-Isolat BaL getestet (EC_{50} = 17 nM). Cyanovirin N wirkt ebenfalls gegen zwei HIV-2 Isolate MS und ROD (EC_{50} 2,3 nM bzw. 7,6 nM). In verschiedenen Zell-Zell-Fusionstests inhibiert Cyanovirin N die Synzytienbildung (> 80% Inhibitionswirkung) in einem Bereich von 10 - 50 nM (Boyd *et al.*, 1997).

Für das Polyanion Dextrin-2-sulfat, einer Weiterentwicklung des Dextransulfats, ergab sich eine EC_{90} von ca. 230 nM für die HIV-1 Laborstämme MN, IIIb und RF. Um PHA/IL-2 aktivierte PBMC-Zellen vor der Infektion zu schützen, waren

EC₉₅-Werte von 230 - 3700 nM notwendig (Shaunak *et al.*, 1994). Vergleicht man die Werte dieser gp120-bindenden Substanzen mit den Werten des VEBP, so sieht man auch hier, dass VEBP HIV-1 gleich effizient neutralisiert. Ebenso wie Dextrin-2-sulfat neutralisiert VEBP X4-trope Viren effizienter als R5-trope Isolate.

Eine andere antivirale Substanz, das Dextransulfat, ist wie Dextrin-2-sulfat eine polyanionische Verbindung. Auch hier zeigt sich antivirale Aktivität gegen X4- und R5-trope Viren, wobei die Effizienz gegen X4-trope Viren wie z.B. gegen das NL4-3 deutlich erhöht ist. Dextransulfat inhibiert die HIV-1-induzierte Zytotoxizität bei einer EC₅₀ von 0,8 µg/ml. Dies ergibt mit einem Molekulargewicht von 5000 eine Inhibitionswirkung von 160 nM (Cabrera *et al.* 1999). Im Vergleich dazu hatte VEBP einen EC₅₀-Wert, der für NL4-3 im Bereich von 50 nM liegt.

Interessanterweise ergeben sich für die negativ geladenen Albumine succinyliertes und aconityliertes HSA (Cabrera *et al.*, 1999), die sich als sehr potente Inhibitoren der HIV-1 Vermehrung *in vitro* erwiesen haben und auch an gp120 binden, EC₅₀-Werte für NL4-3 in einem MTT-Test (Pauwels *et al.*, 1988) auf MT-4 Zellen von 4,7 µg/ml bzw. 1,5 µg/ml. Dies entspricht 68 nM und 28 nM. Diese Werte liegen ebenfalls im Bereich von etwa 50 nM, in dem VEBP wirkt.

Aus diesem Vergleich der Daten lässt sich folgern, dass VEBP ebenfalls als Inhibitor im nanomolaren Bereich wirkt. Es zeigt im Unterschied zu anderen Verbindungen aber auch ein sehr breites Wirkungsspektrum gegen die HIV-1 Subtypen A, B, C, D, G, N und O, sowohl bei X4- als auch R5-tropen Isolaten, und auch gegen HIV-2. Ein Vorteil des VEBP ist auch seine gute Verträglichkeit, bzw. die nicht toxischen Eigenschaften, die sich in den durchgeführten Tests (³H-Thymidin etc., siehe Abschnitt 3.11, Seite 88) zeigten. Das breite Wirkspektrum und die geringe Zytotoxizität sind zwei Gründe, warum VEBP eine vielversprechende antivirale Substanz für ein Mikrobizid ist.

4.2 Wirkungsweise der VEBP--HIV-1-Interaktion

Uns stellte sich die Frage, in welcher Weise VEBP gegen die verschiedenen HIV-1-Isolate wirken kann. Wie unter 4.1 erwähnt, bindet VEBP an gp120. Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit Markus Vossmann erarbeitet. Das in dieser Arbeit hergestellte VEBP wurde von Markus Vossmann in einem Biacore-Test auf Bindung zu verschiedenen Proteinen getestet. Dabei wurde eine spezifische Interaktion des VEBP mit HIV-1 gp120 des MN- und IIIB-Stammes beobachtet (Vossmann 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente durchgeführt, in welchen die Inhibition des VEBP in einem virusfreien Test untersucht wurde. Für diese Experimente wurden Zellen mit einem gp160-Expressionsvektor transfiziert. Durch die Ausbildung des gp41/gp120-Komplexes in der Membran von CD4/CXCR4/CCR5-positiven Zellen wurden Synzytien induziert (siehe Abschnitt 3.3, Seite 51). Da VEBP die Synzytienbildung dieses Tests hemmt (siehe Abschnitt 3.4, Seite 56), lag die Vermutung nahe, dass VEBP an der Stelle der gp120-CD4-Korezeptor-Interaktion eingreift und dadurch die Interaktion und die anschließende Fusion der Virus- und Zellmembran verhindert.

Durch die Bindungsstudien (Vossmann 2004) wurde gezeigt, dass das von mir hergestellte HOCl-modifizierte HSA (1:1000) an rekombinantes gp120 bindet. Dieses modifizierte HSA bindet in einem Oberflächen-Plasmonresonanz-Test mit einer Bindungskonstante von $> K_D = 5 \times 10^{-8}$ Mol an rekombinantes gp120 des X4-tropen Virusstammes IIIB und an gp120 des X4-tropen Virusstammes MN. Die Bindung zwischen VEBP und gp120 liegt damit in dem Bereich einer hochspezifischen Antikörper-Antigen Bindung. VEBP bindet nicht an HSA und nicht an rekombinantes CD4.

Die HOCl-modifizierten Serum Albumine mBSA_{1:500}, mMSA_{1:500}, und mPSA_{1:500} binden mit ähnlichen Bindungskonstanten wie VEBP an rekombinantes gp120 von MN und IIIB (Markus Vossmann, mündliche Kommunikation).

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass VEBP die Synzytienbildung von gp41/gp120-exprimierenden Zellen vollständig inhibiert. Daher ist davon auszugehen, dass die Wirkung des VEBP durch die Bindung an gp120 hervorgerufen wird. Die Zugabe von normalen Serumbestandteilen und Proteinen, wie sie in fötalem Kälber-Serum vorhanden sind, inhibiert die VEBP-gp120-Bindung nicht. Auch zeigt HSA im Unterschied zu VEBP keinerlei antivirale Aktivität. Die VEBP-gp120-Bindung ist, wie schon gesagt, ähnlich stark wie eine Antikörper-Antigen-Bindung. Es ist noch unklar, ob die VEBP-gp120-Bindung in Analogie zur Antikörper-Bindung epitop-spezifisch ist. Aus den Experimenten lässt sich ebenfalls nicht schließen, an welchen Bereich des gp120 VEBP bindet.

Tatsache ist: VEBP neutralisiert HIV und bindet an gp120. Welche Interaktion zwischen VEBP und gp120 führt zu dieser starken Bindung? Es ist davon auszugehen, dass die Bindung an gp120 durch oxidative Veränderungen des HSA bewirkt wird.

Die Oxidation von Aminosäuren als Bestandteil von Peptiden und Proteinen durch hypochlorige Säure ist von sehr komplexer Natur (Hawkins *et al.*, 2003). In der Literatur existieren stark unterschiedliche Ergebnisse und Erkenntnisse hinsichtlich der Proteinveränderung durch die Reaktion mit HOCl. Dies liegt an den unterschiedlichen experimentellen Systemen. Umfangreiche Untersuchungen wurden an LDL vorgenommen. Das LDL findet sich im Organismus in der normalen und der oxidierten Form (oxLDL). Um zu untersuchen, welche Veränderungen bei der Oxidation des LDL durch HOCl verursacht werden, wurden einzelne Peptide getestet (Fu *et al.*, 2002). Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Oxidation eines Peptids mit der Sequenz PFKCG zu einer Zyklisierung des Peptids führt. Zwischen den benachbarten Aminosäuren K (Lysin) und C (Cystein) bildete sich ein Sulfonamid. Dieses Produkt wäre eine gezielte Veränderung des HSA. Man könnte sich vorstellen, dass solche Zyklisierungen Epitope bilden, die dann von Antikörpern erkannt werden. Damit würden sich die Beobachtungen von Malle und Mitarbeitern erklären, die monoklonale Antikörper gegen HOCl-modifiziertes LDL hergestellt haben. Diese Antikörper sind für die oxidierte Form spezifisch und reagieren nicht mit normalem LDL (Malle *et al.*, 2001).

Die Oxidation des 68 kDa großen HSA scheint aber doch komplexerer Natur zu sein. Pattison und Davies beobachteten bei der Umsetzung einzelner freier Aminosäuren mit HOCl unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten und entwarfen ein Computermodell, um HOCl-verursachte Proteinveränderungen vorauszusagen (Pattison & Davies, 2001). Diese Daten zeigen, dass bevorzugt Methionin und Cystein reagieren, wogegen Glutamin und Asparagin am langsamsten reagieren. Die von Pattison und Davies vorgeschlagene Reihenfolge lautet:

Met > Cys >> -S-S-Cystine \approx His (Ring) \approx α -amino-Gruppen > Trp (Ring) >
Lys (Seitenkettenaminogruppe) >> Tyr (Ring) \approx Arg (Seitenkette) >> Gln \approx Asn

Aus der Reihenfolge für die Aminosäuren von Pattison und Davies (2001) ergibt sich die Sensitivität einzelner Aminosäurereste, aber man kann nicht vorhersagen, wie sie im Kontext einer Tertiärstruktur in einem Protein (z.B. HSA) miteinander reagieren.

Aus den Arbeiten von Hawkins und Davies sowie Hazell lässt sich schlussfolgern, dass bei hohen Konzentrationen von HOCl bevorzugt Veränderungen der beiden Aminosäuren Lysin und Arginin in den Proteinen stattfinden. (Hawkins & Davies, 1998; Hazell *et al.*, 1994). Dies würde bedeuten, dass die Reaktionsreihenfolge der Aminosäuren von Pattison und Davies nur bedingt zutrifft und dass die zugegebene Menge an HOCl eine Rolle bei der Reihenfolge spielt.

Bei der Reaktion von α -Amino-Gruppen und Lysinresten mit HOCl können verschiedene Zwischen- und Endprodukte entstehen. So entstehen zuerst Mono- und Dichloramine als Produkte (R-NCL₂) (Winterbourne, 1985; Hawkins & Davies, 1998), die dann durch Hydrolyse in Aldehyde übergehen können (Zgliczynski *et al.*, 1968, 1971; Fu *et al.*, 2000). Bei der Herstellung des VEBP in wässriger Lösung kann diese Hydrolyse leicht stattfinden. Die gebildeten Aldehydgruppen können in Anwesenheit eines Überschusses von Oxidationsmittel weiter oxidiert werden. Die antivirale Aktivität des VEBP wurde durch Behandlung des HSA ab einem HSA:HOCl-Verhältnis von 1:200 beobachtet. Daher befindet sich HOCl im Überschuss, wenn es zur Bildung der antiviralen Form des HSA kommt. Wurde zu wenig HOCl eingesetzt, (mHSA_{1:20}, mHSA_{1:100}), waren keine anti-HIV-Eigenschaften zu beobachten. Daher wird vermutet, dass ein 10-facher HOCl-Überschuss zur

Aktivierung nötig ist und dass dadurch die gebildeten Aldehyde zu Carbonylgruppen weiterreagieren.

So entstehen auch bei der Umsetzung von HOCl mit LDL (Hazell *et al.* 1994; Yang *et al.*, 1997), Fibronektin (Vissers & Winterbourn, 1991) und BSA (Hawkins & Davies, 1998; Chapman *et al.*, 2003) zusätzliche Carbonylgruppen in den Proteinen. Diese zusätzlichen Carbonylgruppen entstehen aus Lysin- und Argininresten. Daher werden bei der Oxidation eines Proteins in Anwesenheit von großen Mengen HOCl die Mengen der Lysin- und Argininreste reduziert und in Carbonylfunktionen umgewandelt. Diese tragen dann die genau gegensätzliche Ladung. Es kommt also zu einer entsprechenden Umverteilung positiver in negativ geladene Seitengruppen. Somit könnte die HOCl-Behandlung und die Herstellung von VEBP, d.h. seine antivirale Aktivität, von der Anzahl der Lysin- und Argininreste im Protein abhängig sein.

Betrachtet man die Aminosäurezusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Proteine, so zeigt sich ein Unterschied in der Menge und dem Anteil der vorhandenen Lysinreste: HSA besitzt 60 Lysinreste (K) und 27 Argininreste (R) (entspricht 9,85 % bzw. 4,43 % der Molmasse) und β -Galaktosidase 18 Lysin- und 66 Argininreste (1,76 % und 6,45 % der Molmasse).

In der folgenden Abbildung ist exemplarisch die Aminosäureverteilung (Molmasse in %) von HSA und β -Galaktosidase in einem Balkendiagramm dargestellt:

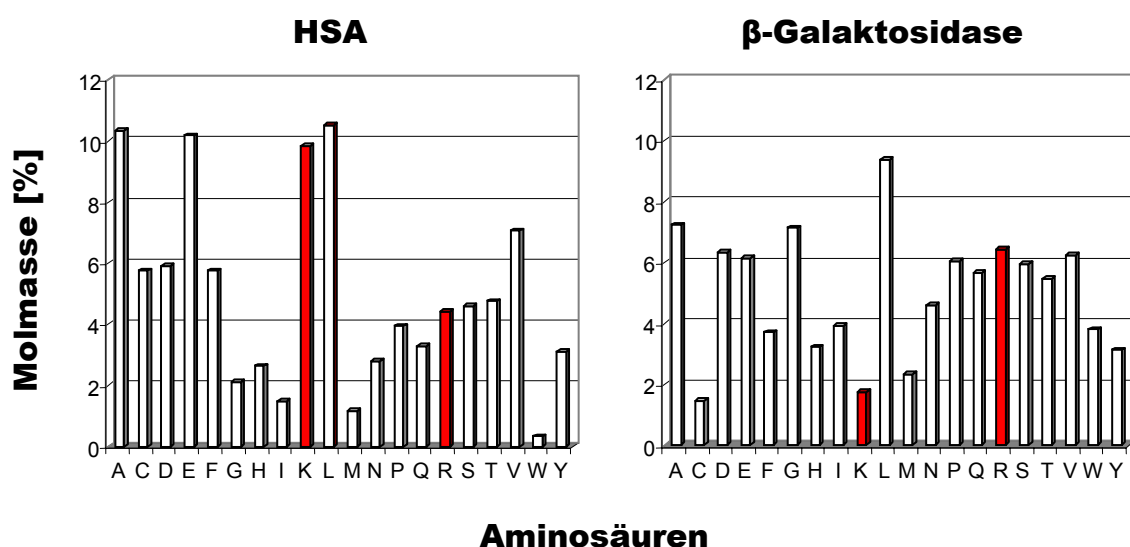


Abb. 24: Aminosäureverteilung von HSA und β -Galaktosidase

Die Balken der beiden Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) sind ausgefüllt.

In den Untersuchungen zeigte HOCl-modifiziertes HSA-Protein (VEBP) antivirale Eigenschaften und neutralisierte die Infektion von Zellen mit X4- und R5-tropen Viren. Das HOCl-modifizierte Protein m β Gal_{1:500}, welches im Vergleich zu HSA weniger Lysinreste (K) hat, zeigte diese Eigenschaften nicht (siehe Abschnitt 3.7; Seite 76). Auch andere Daten mit dem Protein GST-V3 aus *Schistosoma japonicum* zeigten, dass sich GST-V3 nicht durch HOCl in eine antivirale Substanz überführen lässt (siehe auch Abschnitt 3.7).

Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei der Umsetzung mit HOCl die freien Aminogruppen in Carbonylgruppen umgewandelt werden können.

Die Charakterisierung von VEBP wurde zum Thema einer nachfolgenden Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe. Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung der HOCl-Modifikationen in VEBP und der Struktur des VEBP.

Ich habe daher meine VEBP Chargen Frau Melanie van Yperen für ihre ersten Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Bei ihren Untersuchungen zeigte sich, dass neue Carbonylgruppen in VEBP entstehen. Dies wurde durch spektrometrische Messung der Farbreaktion der neu entstehenden Carbonylgruppen mit DMPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin) (Levine *et al.*, 1990) gezeigt. In dem Maße wie die Carbonylgruppen in den HOCl-modifizierten Proteinen zunahm, nahm die Anzahl der freien Aminogruppen ab. Die Anzahl der Aminogruppen wurde durch die Farbreaktion der Amine mit TNB (5-Thio-2-nitrobenzoesäure) nach der Methode von Vissers und Winterbourn (1991) bestimmt.

Bei der Umsetzung mit HOCl werden nicht nur Lysin- und Argininreste in den Proteinen durch HOCl oxidiert bzw. modifiziert (siehe oben), sondern es kommen weitere Aminosäuren in den Proteinen als mögliche Reaktionspartner von HOCl in Frage. So können Cysteinreste zu Disulfiden und komplexen höheren Oxidationsprodukten umgewandelt werden, Methionin kann durch HOCl in das zugehörige Sulfoxid umgesetzt werden, Tryptophanreste können oxidiert und Tyrosinreste chloriert werden (Winterbourn 1985; Pattison & Davies, 2001; Hawkins *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit modifizierten Proteine besitzen z.B. auch sehr wenige reaktive Methioninreste (HSA: 1,15% der Molmasse), so dass dadurch die Wahrscheinlichkeit der Reaktion von HOCl mit Methionin kleiner ist als die Reaktion von HOCl mit Lysin- oder Argininresten.

Eine weitere Frage ist, ob HSA bei der Umsetzung mit einem Überschuss an HOCl eine homogene Substanz bleibt oder ob das Protein in Fragmente gespalten wird. Daher habe ich versucht, VEBP durch massenspektroskopische Untersuchungen zu analysieren. Bei der Umsetzung des HSA mit geringen Dosen an HOCl (2- bis 20-facher molarer Überschuss) zeigte sich eine homogene Substanz mit dem für HSA typischen Molekulargewicht von 66774,24 Da (siehe Abschnitt 3.2, Seite 49). Diese homogene Substanz zeigte, wie schon erwähnt, keine antiviralen Eigenschaften. In den Untersuchungen wurde nun beobachtet, dass die VEBP-Präparationen mit antiviralen Eigenschaften, die durch Behandlung mit einem HOCl-Überschuss (> 1:200) hergestellt waren, sich in der Massenspektroskopie nicht mehr analysieren ließen. Es wurden in der MALDI-TOF-(*Time of flight*)-Analyse keine Molekülpeaks beobachtet. Weder das HSA noch Fragmente des Proteins wurden detektiert. Auch eine Zusammenarbeit mit der massenspektroskopischen Arbeitsgruppe am Forschungsinstitut Borstel ergab die gleichen Befunde. Es wurde in dieser Zusammenarbeit bestätigt, dass sich VEBP mittels MALDI-TOF nicht analysieren lässt. Genauso schlugen Versuche, VEBP in einem ESI-(*electro spray ionisation*)-Massenspektroskop zu messen, fehl.

Was lässt sich nun aus diesen massenspektroskopischen Befunden folgern? Zum einen besteht die Möglichkeit, dass HSA durch HOCl in so viele kleine und vielfältige Bruchstücke hydrolysiert wird und sich so in der massenspektroskopischen Analyse keine definierten Molekülpeaks zeigen. Die andere Möglichkeit wäre, dass sich das oxidierte HSA mit den Methoden der Massenspektroskopie nicht mehr ionisieren lässt und daher in der massenspektroskopischen Analyse nicht mehr „fliegt“. Eine Fragmentierung ist wahrscheinlich, da in der Literatur Daten vorgestellt werden, die eine Fragmentierung durch HOCl-Oxidation diskutieren. Hawkins und Dawies zeigten, dass mit HOCl umgesetztes BSA im SDS-Polyacrylamidgel eine Verbreiterung der BSA-Proteinbande zeigt (Hawkins & Dawies 1998). Die Verbreiterung der Bande nimmt mit steigender Konzentration an HOCl zu.

Markus Voßmann zeigte in seiner Arbeit (Vossmann 2004) mit Hilfe von verschiedenen Proteingelen (Silberfärbung, Coomassie-Färbung), dass auch bei HSA mit zunehmender Konzentration an HOCl ein Shift in der SDS-PAGE beobachtet wird.

Ein Shift im Gel kann entweder die Fragmentierung des Proteins oder eine inhomogene Struktur des Proteins bedeuten. Außerdem kann durch die Oxidation die Einlagerung an SDS unterschiedlich sein, was ebenfalls das Laufverhalten verändern würde. All diese Phänomene könnten Grund für den beobachteten Shift der VEBP-Bande im SDS-Page sein. Gegen die Fragmentierung des HSA spricht die Analyse der VEBP-gp120-Bindung, die im Biacore-Test beobachtet wurde. Markus Voßmann koppelte HSA an einen C5-Biosensor und oxidierte das immobilisierte HSA direkt auf dem Biosensor. Dabei wurde nach Modifikation mit HOCl keine drastische Abnahme der Masse beobachtet. Wäre HSA durch HOCl in viele kleine Bruchstücke fragmentiert worden, die sich aufgrund ihrer Vielzahl nicht in der Massenspektroskopie nachweisen lassen, so würde man dies auch in den Biacore-Versuchen beobachten.

Ein weiteres Argument gegen die Fragmentierung des VEBP in kleine Bruchstücke ist die Beobachtung, dass VEBP bei der Aufreinigung mittels einer Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten und aufkonzentriert wird. Die Filter halten Moleküle > 10 kDa zurück. Bestünde die VEBP-Charge nur aus kleinen Bruchstücken, könnten sie nicht mit dieser Methode aufkonzentriert werden. Daher ist zu vermuten, dass VEBP nicht in kleine Bruchstücke hydrolysiert wird.

Eine andere Eigenschaft der HOCl-modifizierten Proteine ist die Bildung von Aggregaten. Fibronectin (Vissers & Winterbourn, 1991), α_{s-1} Casein (Matoba *et al.*, 1985), Apolipoprotein B (Hazell *et al.*, 1994), Ovalalbumin (Olszowski *et al.*, 1996), α_2 -Makroglobulin (Wu & Pizzo, 1999) sowie Mn-Superoxid-Dismutase (MacMillan-Crow *et al.*, 1998) bilden Aggregate oder Polymere aus. Diese Aggregate oder Polymere sollen durch starke nicht-kovalente Interaktionen zwischen den Proteinketten zustande kommen. Die Entstehung von Carbonylgruppen und Chloraminen soll zu einer Änderung der Proteinfaltung führen. Diese Änderung in der Proteinstruktur legt hydrophobe Bereiche von Nachbarmolekülen frei, die dann untereinander assoziieren und Dimere und Aggregate bilden (Chapman *et al.*, 2003). Naskalski zeigte, dass auch BSA durch HOCl aggregiert wird (Naskalski 1994). Als Reaktionsablauf soll gebildetes Chloramin durch Hydrolyse in Aldehyd übergehen, das wiederum mit freien Amingruppen via Schiff'sche Base inter- oder intramolekular reagiert und es somit zum *crosslinking* der modifizierten Proteine untereinander

kommt. Ein *crosslinking* von HSA- oder BSA-Fragmenten untereinander scheint möglich.

Würde es bei VEBP zu einem *crosslinking* mit dem Liganden gp120 kommen, wäre dies aber nicht konform mit der Beobachtung der Biacore-Experimente. Hier zeigte sich ein reversibles Bindungsverhalten. Daher scheint eine Chloramin-basierende Vernetzung des VEBP mit gp120 nicht wahrscheinlich.

Dagegen behaupten Kehrel und Mitarbeiter (Patenschrift DE 10148624), dass durch die HOCl-Oxidation in Fibrinogen, HSA, BSA und Antithrombin III bestimmte definierte Epitope erzeugt werden. Der Überschuss an zugesetztem HOCl ist in diesen Versuchen sehr viel höher als in meinen Experimenten. Kehrel *et al.* benutzen HOCl in einem molaren Überschuss von $> 10^6$. Die Autoren argumentieren, dass sich gegen die so induzierten Epitope monoklonale Antikörper erzeugen lassen. Beweise dafür existieren in der angegebenen Literatur allerdings nicht. Würden spezifische monoklonale Antikörper entstehen, würde dies gegen die Fragmentierung des HOCl-modifizierten HSA sprechen und eher ein Hinweis auf eine definierte homogene Substanz sein.

Bei den Untersuchungen zur HOCl-Oxidation des LDL fanden Malle und seine Mitarbeiter, dass sich gegen die oxidierte Form des LDL monoklonale Antikörper herstellen lassen (Malle *et al.*, 1995, 2001). Ob diese Daten auf die Oxidation des HSA zu übertragen sind, ist unklar.

Fest steht, dass die Oxidation eines so großen Proteins (HSA) bis heute nicht genau analysierbar ist und die einzelnen molekularen Veränderungen am Protein nur sehr unzugänglich beschrieben werden können.

Unsere Versuche zeigten, dass die Masse des VEBP in massenspektroskopischen Experimenten nicht bestimmt werden kann. Daher ist es wahrscheinlich, dass VEBP keine homogene Substanz ist, wie von Kehrel und Mitarbeitern behauptet, sondern ein Struktur- bzw. Substanz-Gemisch mit einer oder mehreren antiviral-aktiven Komponenten.

Durch die Komplexität der möglichen Reaktionen bei der Umsetzung von Proteinen mit HOCl sind weitere Versuche notwendig, um die HOCl-induzierten Veränderungen zu untersuchen und die endgültige Natur des VEBP herauszufinden.

Geht man von der Hypothese aus, dass sich bevorzugt die Lysin- und Argininreste durch die HOCl-Oxidation in Carbonylgruppen umwandeln, so kann man die HOCl-Modifikation auch als eine Reaktion zur Herstellung eines polyanionischen Inhibitors betrachten. HSA und andere Serum Albumine wurden in der Vergangenheit schon vielfach als Trägersubstanz zur Herstellung von polyanionischen Substanzen benutzt. Die Serum Albumine wurden dazu verwendet, weil sie einen hohen Anteil an Lysinresten tragen, die sich für die Kopplung von modifizierten Seitenketten bestens eignen (z.B. mit Succinsäureanhydrid, Formaldehyd).

Jansen und Mitarbeiter modifizierten HSA, indem sie HSA mit Formaldehyd oder Succinsäureanhydrid versetzten und dadurch pro Lysinrest einen „Spacer“, der am Ende Carbonylgruppen trägt, in das Protein einfügten (Jansen *et al.*, 1991, 1993a; Swart & Meijer, 1994). Die Serum Albumine wurden dadurch negativ geladen. Succinyliertes und aconityliertes HSA (Suc-HSA bzw. Aco-HSA) zeigten genauso wie VEBP antivirale Aktivität (Jansen *et al.* 1993a), Suc-HSA und Aco-HSA zeigten ebenfalls antivirale Aktivität gegen andere Viren, wie z.B. das Influenza A-Virus (Schoen *et al.* 1997). Gegen dieses wurde VEBP nicht getestet. Allerdings zeigen die Daten, die in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen erarbeitet wurden, dass auch VEBP außer HIV-1 andere Viren neutralisieren kann (Lassavirus, Stefan Günther BNI, Hamburg; Murines Leukämievirus, Ulf Dittmer, Universität Essen; West-Nil Virus, Hantaanvirus, Markus Vossman, BNI, Hamburg).

Diese modifizierten Serum Albumine (Suc-HSA und Aco-HSA) können *in vitro* die Vermehrung von primären HIV-1-Isolaten in PHA/IL-2 aktivierten PBMC-Zellen oder MT-2 Zelllinien inhibieren (Groenink *et al.*, 1997). Suc-HSA und Aco-HSA inhibierten die Vermehrung von synzytienbildenden und nicht-synzytienbildenden HIV-1-Isolaten (HIV-1 IIIB, HIV_{Ams} 16.2, HIV_{Ams} 181 etc.) mit EC₅₀-Werten im Bereich von 2,0 bis 263 µg/ml. Suc-HSA und Aco-HSA inhibierten ebenfalls die Synzytienbildung zwischen infizierten H9-Zellen oder aktivierten PBMC-Zellen und nichtinfizierten MT-2 Zellen. Die Verbindungen sind gegenüber MT4- und PBMC-Zellsystemen untoxisch und besitzen keine antikoagulierenden Eigenschaften wie die Polyanionen Dextransulfat und Heparin (Jansen *et al.*, 1993). Hohe Plasmakonzentrationen von Suc-HSA (bis zu 1 mg/ml) beeinträchtigen nicht die Blutkoagulation und zeigen keinen Effekt auf die Lymphozyten-Proliferation. Durch die Acylation der freien NH₂-Gruppen der Lysinreste sollen die Serum Albumine nur geringfügig in ihrer

Tertiärstruktur verändert werden, so dass nur schwache immunogene Effekte gegen Suc-HSA zu erwarten sind (Swart *et al.*, 1996).

Negativ geladenes HSA bzw. Suc-HSA bindet an die V3-Region und am C-Terminus des gp120 (Kuipers *et al.*, 1996; Carbrera *et al.*; 1999). Die Arbeitsgruppen nehmen an, dass diese Bindung durch elektrostatische Interaktionen zwischen den negativ geladenen Proteinen (Suc-HSA) und den positiv geladenen Peptidsequenzen des V3-Loops (Kuipers *et al.* 1996) zustande kommt. Somit würde negativ geladenes HSA die Interaktion des gp120 mit den Korezeptoren CXCR4 und CCR5 stören und so den Viruseintritt verhindern. Trotz all dieser positiven Eigenschaften des Suc-HSA und Aco-HSA wurden Resistenzen gegen Suc-HSA und Aco-HSA *in vitro* beobachtet (Cabrera *et al.*, 1999).

Da für Suc-HSA und Aco-HSA gezeigt wurde, dass die Substanzen im Bereich der Korezeptorbindungsstelle mit dem gp120 interagieren, könnte dies auch für VEBP gelten. Als eine Bindungsstelle von VEBP an gp120 könnte daher wie bei den negativ-geladenen Serumalbuminen u.a. der positiv geladene V3-Loop innerhalb des gp120 in Frage kommen. Durch den polyanionischen Charakter würde das negativ geladene VEBP mit dem positiven geladenen V3-Loop in Wechselwirkung treten.

Die unterschiedliche inhibitorische Wirkung des VEBP auf das X4-trope Virus NL4-3 und das R5-trope Patientenisolat NL-991 könnte ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass die Interaktion des VEBP mit gp120 von der positiven Nettoladung im V3-Loop- Bereich abhängt. Diese beiden Viren unterscheiden sich ausschließlich in der Sequenz des gp120 V3-Loops. Daher kann der Unterschied in Bezug auf die VEBP-Sensitivität nur durch den V3-Loop hervorgerufen werden. So besitzt der V3-Loop des NL4-3 eine Nettoladung von +8 (8 positiv geladene Arginin- bzw. Lysinreste (6Arg/2Lys)). Das Patientenisolat NL-991 hat eine Nettoladung von +3. Dies entspricht fünf positiv geladenen Argininresten und zwei negativ geladenen Asparaginsäureresten (5Arg/2Asp) (siehe Abschnitt 3.10, Seite 67). Besitzt nun VEBP sehr viele negativ geladene Carbonylgruppen, könnte VEBP unterschiedlich gut mit dem V3-Loop des NL4-3 und des NL-991 interagieren und so unterschiedlich gut die gp120-CD4-Korezeptor-Interaktion inhibieren. Dies wurde in meinen Versuchen gezeigt. Für VEBP ergibt sich bei Neutralisation des X4-tropen Virus NL4-3 eine EC₅₀ im Bereich von 3 µg/ml, bei Neutralisation des R5-tropen Virus NL-991 ein EC₅₀-Wert von > 20 µg/ml.

Im allgemeinen kann man aus der Ladung des V3-Loops auf den Tropismus des Virus schließen. Für die Voraussage des Tropismus anhand von V3-Loop-Sequenzen sind verschiedene Algorithmen entwickelt worden. Diese stehen als Programme im Internet zur Verfügung (Pillai *et al.*, 2003). Mit Hilfe dieser Programme lassen sich bei V3-Loop-Sequenzen von 32 - 34 Aminosäuren Länge relativ zuverlässige Voraussagen für HIV-1 Varianten des Subtyp-B treffen. Für andere Subtypen ist dies nicht möglich. Vor allen Dingen gibt es keine gültigen Algorithmen, mit denen Berechnungen der Sequenzen der Subtyp-O-Viren mvp2171 und mvp8161 durchgeführt werden können. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Nettoladung des V3-Loops von +7 bis +9 für den X4-tropen Phänotyp und eine Nettoladung von +2 bis +3 für den R5-tropen Phänotyp charakteristisch sind. Voraussagen, basierend auf V3-Loop Sequenzen, ob ein Virus den dualtropen Phänotyp besitzen könnte, sind nach unserer Einschätzung nicht möglich.

In meiner Arbeit habe ich gezeigt, dass das X4-trope Virus NL4-3 besser neutralisiert wurde als das R5-trope Virus NL-911. Beide Viren unterschieden sich nur durch den V3-Loop. Daher ist anzunehmen, dass die Neutralisation des HIV-1 durch VEBP vorwiegend von der positiven Gesamtladung des V3-Loops und dem damit zusammenhängenden Korezeptor-Phänotyp abhängig ist. Neben den Ergebnissen der NL4-3 V3-Loop-Varianten bestätigten die Untersuchungen mit anderen Viren ebenfalls (siehe dazu Abschnitt 3.9, Seite 84), dass VEBP tendenziell X4-trope HIV-1-Stämme besser neutralisiert als R5-trope Viren.

So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Virusstämme 92UG029, 92UG021 und 92UG035 sehr effizient durch VEBP neutralisiert werden. VEBP neutralisiert dabei den X4-tropen Virusstamm 92UG029 (Subtyp-A/ env-A) besser als den X4-tropen Virusstamm 92UG021 (Subtyp-A/ env-D). Dieser wiederum wurde besser neutralisiert als das R5-trope Virus 92UG035 (Subtyp-A/ env-D). Damit zeigen sich in der Gruppe der Viren aus Uganda die gleichen Zusammenhänge hinsichtlich der erhöhten VEBP-Sensitivität gegenüber X4-tropen Viren wie für die Subtyp-B NL4-3-Virusmutanten. Ausnahmen von dieser Regel sind die beiden Viren ELI und mvp8161. Diese beiden Viren benötigen VEBP-Konzentrationen, die höher liegen als die Menge an VEBP für die Neutralisation der R5-tropen Viren JR-CSF, BaL und RU570. Damit zeigen ELI und mvp8161 die schlechtesten Neutralisationswerte in der X4-tropen Virusgruppe und JR-CSF, BaL sowie RU570 die niedrigsten Werte für die

R5-trope Virusgruppe. Somit sind die verbleibenden R5-tropen Viren alle VEBP-resistenter als JR-CSF, Bal oder RU570. Bei den HIV-1 Subtypen-O mvp2161 und mvp8161 zeigte sich ein kleiner, aber feiner Unterschied. Das X4-trope Virus mvp2161, mit einer V3-Loop-Nettoladung von +8, wurde besser neutralisiert als das X4-trope Virus mvp8161 mit einer V3-Loop-Nettoladung von +7. Hierbei ist ebenfalls das Virus mit der geringeren Ladung resistenter gegenüber VEBP als bei der NL-Virusmutante oder den Uganda-Viren. Welche Rolle aber die Nettoladung bei den Subtyp-O-Viren für die Korezeptornutzung spielt, ist nicht so vorhersagbar wie bei den anderen HIV-Subtypen. Gerade die Subtyp-O-Viren zeigten im Unterschied zu den anderen Subtypen sehr ungewöhnliche V3-Loop-Sequenzen, die eine 4 Aminosäuren längere Sequenz besitzen und deren Sequenz so verschieden ist, dass ein Sequenzvergleich mit den „normalen“ V3-Loops keinen Sinn ergibt.

Die schlechte Neutralisierbarkeit des X4-tropen Virus ELI durch VEBP könnte dadurch zustande kommen, dass ELI eine V3-Loop-Nettoladung von +5 besitzt. Diese Ladung ist für X4-trope Viren unüblich. Normalerweise zeigen X4-monotrope Viren eine Nettoladung von +6 bis +9. Da in der Arbeit gezeigt wurde, dass R5-trope Viren mit Nettoladungen von +1 bis +3 schlechter durch VEBP neutralisiert werden, könnte ELI aufgrund seiner V3-Loop-Nettoladung von +5 auch schlechter neutralisiert werden als die X4-tropen Viren mit Nettoladungen von +6 bis +8.

Vergleicht man die in meiner Arbeit gezeigten Neutralisationsdaten für die Virusstämme mit den Neutralisationsdaten von Matthias Dittmar (Heidelberg), der VEBP bis zu einer Konzentration von 150 µg/ml getestet hat, so ergibt sich folgende VEBP-Sensitivität (EC₅₀-Daten) der HIV-1-Virusstämme (siehe Abbildung 25, Seite 111):

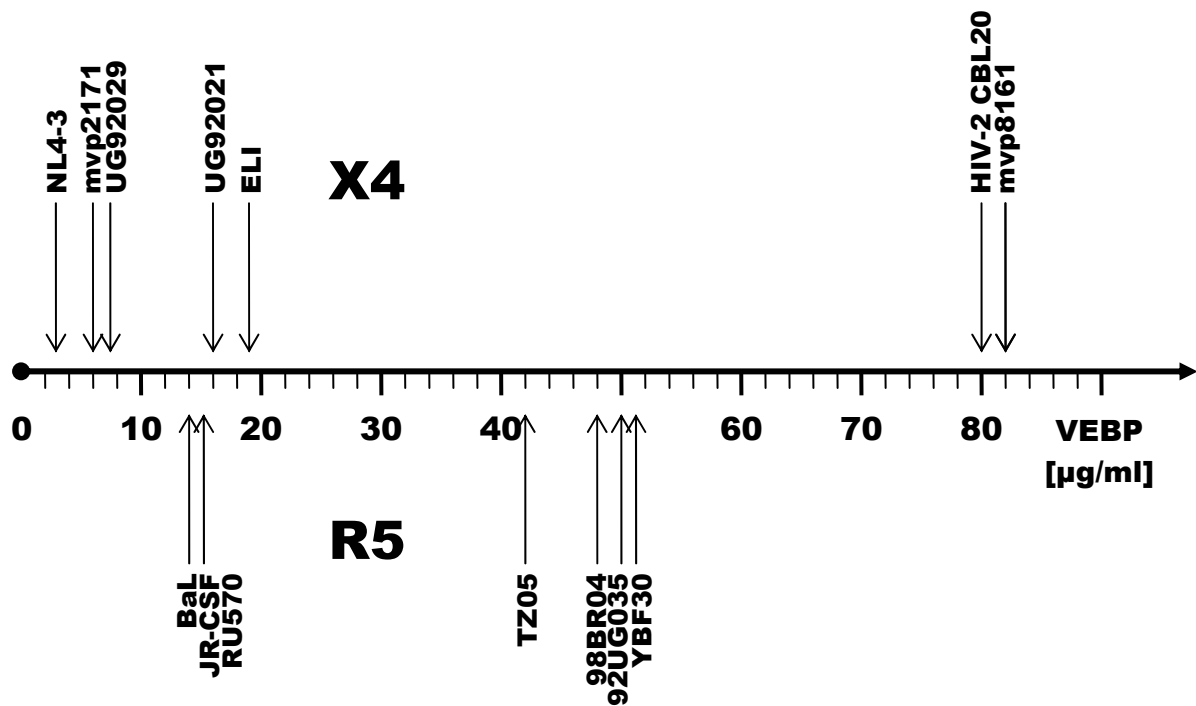


Abb. 25: Neutralisierbarkeit der verschiedenen HIV-Stämme

Zusammenfassend lässt sich also folgern, dass VEBP tendenziell X4-trope Viren besser neutralisiert als R5-trope Viren oder HIV-2. Trotzdem ist VEBP eine Substanz, die HIV-1 und HIV-2 Viren sehr effizient neutralisiert, denn bei einer Konzentration von $150 \mu\text{g VEBP/ml}$ werden alle Virussubtypen und das $\text{CBL}_{\text{HIV-2}}$ Isolat zu $> 98\%$ neutralisiert.

Die unterschiedlich gute Neutralisation aufgrund der V3-Loop-Sequenz und dem damit einhergehenden Unterschied in der Nettoladung stützt meine Hypothese: Bei der Veränderung des HSA durch HOCl werden vorwiegend negativ geladene Strukturen auf dem Protein erzeugt, so dass VEBP ein *Entry*-Inhibitor darstellt, der wahrscheinlich aufgrund seines polyanionischen Charakters wirkt.

4.3 Mögliche Resistenzen gegenüber VEBP

Eine der erstaunlichsten Eigenschaften des HIV-1 ist seine genetische Variabilität. So haben sich gegen alle zurzeit zugelassenen und in der Therapie eingesetzten Substanzen resistente HIV-1-Varianten gebildet. Wie groß ist daher die Wahrscheinlichkeit, dass sich auch gegen den Inhibitor VEBP resistente Viren herausbilden könnten?

Die negativ geladenen Serum Albumine und Polyanionen wie Dextransulfat können Resistenzen *in vitro* bilden. So wächst ein X4-troper-Abkömmling des NL4-3-Stammes in Anwesenheit hoher Konzentration der polyanionischen Substanz Dextransulfat (Este *et al.*, 1997). Für die Resistenzen sind u.a. Mutationen im Bereich des V3- und V4-Loops sowie im Bereich des gp41 verantwortlich (Cabrera *et al.*, 1999).

Daraus könnten wir ableiten, dass die Bildung von Resistenzen gegen Polyanionen prinzipiell möglich ist.

Es ist fragwürdig, ob bei VEBP ebenfalls Resistenzen auftreten können, da VEBP so viele verschiedene HIV-1 Subtypen neutralisieren kann. Wir können daher annehmen, dass gegen VEBP seltener Resistenzen auftreten würden.

Bobardt und Mitarbeiter zeigten außerdem (Bobardt *et al.*, 2004) in ihrer Arbeit, dass die polyanionresistente Virusvariante des NL4-3-Stammes die Fähigkeit verliert, an Heparansulfatproteoglykan (HSPG) zu binden. Zellgebundenes HSPG auf der Oberfläche von bestimmten Zelltypen erleichtert die HIV-1 Infektion in verschiedenen Zelllinien (Patel *et al.*, 1993; Roderiquez *et al.*, 1995). Auch könnte die Transzytose von HIV-1 durch die Bluthirnschranke durch die Bindung von HIV-1 an Heparansulfat oder Chondroitinsulfat, welche auf der Oberfläche von mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns exprimiert werden, eingeleitet und erleichtert werden (Argyris *et al.*, 2003; Bobardt *et al.*, 2003).

Verliert das Virus durch die Resistenzbildung diese Fähigkeiten, wird die Anzahl der potentiellen Zielzellen für die resistenten Viren eingeschränkt. Somit würde eventuell das Infektionsrisiko gesenkt. Ein ähnlicher Ablauf könnte deshalb auch bei Viren auftreten, die gegen VEBP resistent geworden sind.

Allerdings ist es fraglich, ob die *in vitro* erzeugten Resistenzen *in vivo* so auftreten können. Ebenso stellt sich die Frage, ob die polyanion-sensitiven Viren *in vivo* tatsächlich weniger Zellen infizieren würden.

4.4 Vorkommen von VEBP *in vivo*? – Myeloperoxidase-Defizienz

Eine weitere interessante Frage ergibt sich aus der Ausgangsbeobachtung, dass HOCl-modifizierte Proteine im menschlichen Körper vorkommen können. Kommt auch das in meiner Arbeit in einem molaren Verhältnis von 1:1000 hergestellte HOCl-modifizierte HSA in dieser Form im Körper vor bzw. könnte HSA durch das MPO-H₂O₂-Chloridsystem in VEBP transformiert werden?

HSA liegt im Blut in einer Konzentration von 500 - 700 µM (35 - 50 g/l) vor, HOCl kann beim oxidativen *Burst* in einer Konzentration von 1 - 2 mM vorliegen (Katrantzis *et al.*, 1991). Dies entspräche einem molaren Verhältnis von etwa 1:2, so dass eine Umsetzung von HOCl mit HSA im molaren Verhältnis von 1:1000 eher unwahrscheinlich wäre.

Es wäre dennoch denkbar, dass freies HSA oder HSA, das bei der Phagozytose von Viren und Mikroorganismen mit in das Phagosom eingeschlossen wird, durch die von der Myeloperoxidase beim oxidativen *Burst* freigesetztes HOCl modifiziert werden könnte. Dadurch wäre es möglich, dass diese HOCl-modifizierten HSA-Proteine im Phagosom oder im extrazellulären Raum die unspezifische Immunabwehr am Infektionsort unterstützen könnten. In dieser Arbeit wurde ja gezeigt, dass VEBP antiviral wirkt. Hier müsste man z.B. Experimente mit stimulierten neutrophilen Granulozyten durchführen, um HOCl-modifiziertes HSA mit spezifischen Antikörpern, ähnlich wie es beim Nachweis des oxidierten LDL im Gewebe gezeigt wurde, nachzuweisen. Oxidiertes LDL wurde im menschlichen Gewebe durch einen monoklonalen Antikörper, der HOCl-oxidiertes LDL (molares Verhältnis 1:800) erkennt, nachgewiesen (Malle *et al.*, 2001). Man müsste daher auch einen monoklonalen Antikörper herstellen, der gegen VEBP gerichtet ist, und VEBP durch diesen nachweisen.

Es stellte sich in diesem Zusammenhang eine weitere Frage. Spielt das Fehlen der Myeloperoxidase, die HOCl als ein Mittel der unspezifischen Immunabwehr produzieren kann, in den neutrophilen Granulozyten (Myeloperoxidase-Defizienz) eine Rolle bei Infektionskrankheiten?

Die MPO-Defizienz kommt zwar in der Bevölkerung (Auftreten der MPO-Defizienz im Verhältnis von 1:4000) relativ häufig vor (Forehand *et al.*, 1989), verläuft aber klinisch

meist inapparent (Kitahara *et al.*, 1981). Es wird gelegentlich von einer Zunahme der Anfälligkeit gegenüber Candida-Infektionen berichtet.

Es wird vermutet, dass die fehlende oxidative Abwehrreaktion durch HOCl in MPO-defizienten Zellen durch andere Oxidationssysteme, wie z.B. die NADPH-Oxidase oder Stickstoffoxid-Synthase in den Zellen kompensiert wird (Hampton *et al.*, 1998). Es gibt allerdings keine Untersuchungen darüber, dass MPO-defiziente Personen ein höheres Risiko haben, sich mit HIV zu infizieren.

4.4 Andere HOCl-modifizierte Proteine als HIV-Inhibitoren

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HOCl-modifizierte Serum Albumine (VEBP, mHSA_{1:10000}, mBSA_{1:1000}, mMSA_{1:1000} und mPSA_{1:1000}) antivirale Eigenschaften zeigen. Wie sieht es nun bei anderen Proteinen aus? Zeigen andere HOCl-modifizierte Proteine wie Transferrin und β -Galaktosidase eine ähnliche antivirale Aktivität wie die HOCl-modifizierten Serum Albumine?

Aus diesem Grund wurden HOCl-modifizierte Transferrin- und β -Galaktosidase-Proteine auf inhibitorische Wirkung im gp120/gp41-induzierten Synzytienbildungstest untersucht. Dabei zeigte HOCl-modifiziertes Transferrin mTF_{1:1000} bei der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung eine ähnliche inhibitorische Wirkung wie VEBP (siehe Abschnitt 3.4.3, Seite 66). Untersuchungen mit diesem Protein durch Markus Vossman (mündliche Kommunikation) in Biacore-Bindungsstudien ergaben allerdings, dass mTF_{1:1000} nicht an das auf dem Biacore-Sensorchip immobilisierte gp120 binden kann.

HOCl-modifiziertes m β Gal_{1:10000} zeigte ebenfalls bei der gp120/gp41_{NL4-3}-induzierten Synzytienbildung eine ähnliche inhibitorische Wirkung wie VEBP. Um diese Aktivität zu erhalten, waren jedoch große Mengen an HOCl bei der Umsetzung notwendig. m β Gal_{1:10000} zeigte aber keinen inhibitorischen Effekt auf die HIV-1_{NL-991}-Vermehrung (siehe Abschnitt 3.8, Seite 76).

In Abschnitt 4.2 (Seite 99) wurde diskutiert, dass β -Galaktosidase eine geringere Anzahl an reaktiven Lysin- und Argininresten verglichen mit HSA besitzt. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass größere Mengen an HOCl notwendig sind, um das Protein in eine aktive antivirale Substanz umzuwandeln. Die fehlenden Lysin- und

Argininreste machen β -Galaktosidase inerte gegen die HOCl-Modifikation. Somit zeigten mTF_{1:1000} und m β Gal_{1:10000} zwar einen Effekt bei dem gp120/gp41-induzierten Synzytienbildungstest, aber keine anti-HIV-Aktivität gegen infektiöse Viren. Es wäre dennoch möglich, dass größere Mengen an HOCl bei der Modifikation von Transferrin und β -Galaktosidase eine ähnliche antivirale Aktivität wie bei VEBP bewirken könnten. Allerdings wären dazu sehr große Mengen an HOCl notwendig. Dies wäre für die Produktion eines HIV-Inhibitors ungünstig.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich zudem ableiten, dass ein positives Ergebnis im gp120/gp41-induzierten Synzytienbildungstest, d.h. ein inhibitorischer Effekt auf die Synzytienbildung, nicht unbedingt mit einer antiviralen Aktivität gegen infektiöse Viruspartikel korrelieren muss. Die Testung von Substanzen gegen infektiöse Viruspartikel sollte daher zur Überprüfung einer potentiellen antiviralen Eigenschaft herangezogen werden. Der gp120/gp41-induzierte Synzytienbildungstest kann zum einfachen und schnellen *Screening* potentieller *Entry*-Inhibitoren genutzt werden.

4.6 Ausblick und Anwendungsmöglichkeiten von VEBP

Über 50% der weltweit 40 Millionen HIV-Infizierten sind mit dem HIV-1 Subtyp-C infiziert. Die weltweite HIV-Forschung fokussiert sich allerdings auf die Entwicklung antiviraler HIV-Substanzen und die Erforschung des HIV-1 Subtyp-B. Von den eingesetzten Ressourcen entfallen 90% der Gelder auf die Entwicklung von HIV-1 Subtyp-B Medikamente und nur 10% der Gelder und Ressourcen werden für die *Non-B* HIV-Forschung aufgewendet (Kantor & Katzenstein 2004). Für die Entwicklung wirksamer Protease-, Integrase- oder Reverse-Transkriptase-Inhibitoren scheint diese Unausgewogenheit nicht von Bedeutung zu sein. Für die Entwicklung von viralen Substanzen, die den *Virusentry* inhibieren sollen, ist dies allerdings von entscheidender Bedeutung, da sich die verschiedenen Subtypen vor allen Dingen im Bereich des gp120 unterscheiden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass z.B. ein Impfstoff-induzierter Antikörper gegen gp120 Subtyp-B auch gleichzeitig HIV-1-Varianten des Subtyp-A oder -C neutralisiert. Um die Ausbreitung von HIV, besonders in den ärmeren Ländern, zu verhindern, wäre die Entwicklung einer

wirksamen Substanz sinnvoll, die möglichst viele Virustypen neutralisieren kann. Die in dieser Arbeit vorgestellte Substanz VEBP ist ein Inhibitor, der den *Virusentry* verhindert und der gegen alle in dieser Arbeit getesteten Subtypen wirkt.

Man könnte sich daher VEBP als eine neue Möglichkeit zur Prophylaxe in Form eines topischen Mikrobizids vorstellen. In den Ländern Afrikas und Südostasiens infizieren sich immer mehr Frauen mit HIV. Ursächlich hierfür ist u.a. die fehlende Akzeptanz der Prophylaxe mittels Kondome von Seiten der Männer. Auch sind Frauen beim ungeschützten heterosexuellen Geschlechtsverkehr bis zu viermal empfänglicher für eine HIV-Infektion als Männer. So sind schon mehr als die Hälfte der HIV-1-Infizierten im Süden Afrikas Frauen (UNAIDS/WHO, 2004).

Hier wäre der Einsatz eines topischen Mikrobizids, mit dem sich die Frauen selbst schützen können, sehr sinnvoll. Man geht davon aus, dass der Einsatz eines Mikrobizid, welches zu 60% Schutz verleiht, dazu führt, dass ca. 1 Millionen Menschen weniger pro Jahr mit dem Virus infiziert würden (Watts 2002). Die WHO geht weiterhin davon aus, dass ein wirksames Mikrobizid langfristig sogar zu einem weltweiten Rückgang der Infiziertenrate führen würde. Diese Daten verdeutlichen die Wichtigkeit, die die Entwicklung eines solchen Mikrobizids zukommt.

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass VEBP eine Vielzahl von verschiedenen HIV-1-Isolaten und vor allen Dingen auch den weltweit am meisten verbreiteten und bedeutsamsten HIV-1 Subtyp-C neutralisieren kann, wäre VEBP eine geeignete Substanz für ein Mikrobizid. Ein weiteres Argument, das für den Einsatz von VEBP spricht, ist seine Aktivität sowohl gegen X4- als auch R5-trope Viren. In den Untersuchungen zeigte sich auch, dass unter VEBP keinerlei toxische Nebenwirkungen auftraten. Diese Tatsache ist besonders wichtig, vergleicht man VEBP mit anderen Mikrobiziden, wie z.B. Nonoxynol-9.

Bei klinischen Studien mit dem erfolgsversprechenden Spermizid Nonoxynol-9 zeigte sich, dass eine vaginale Anwendung von 100 mg Nonoxynol-9 vermehrt zur Zerstörung von Epithelzellen führte und damit genitale Symptome hervorrief (Hoffman *et al.*, 2004). Diese Epithelzellruptur begünstigt aber wiederum die Infektion mit HIV beim ungeschützten Geschlechtsverkehr. Auch zeigte Nonoxynol-9 eine 20 bis 50-fache höhere *in vitro*-Toxizität verglichen mit anderen möglichen Mikrobiziden (Dezutti *et al.*, 2004). Mikronisiertes Cellulose Acetat Phthalat (CAP) zeigte zwar eine hohe antivirale Aktivität als Mikrobizid sowohl bei X4-tropen als auch

bei R5-tropen Virusstämmen, allerdings müsste man es in sehr hoher Konzentration einsetzen (bis zu 121,5 mg/ml) (Neurath *et al.*, 2002). Daher ist diese Substanz praktisch ohne Nutzen.

Werden die bisher erhaltenen Daten über VEBP mit den Eigenschaften der existierenden und getesteten Mikrobizide verglichen, so ergeben sich weitere Vorteile für VEBP. Neben der guten Zellverträglichkeit und der Wirksamkeit im nM-Bereich hat VEBP den wichtigen Vorteil, dass es sehr einfach und preiswert durch die HOCl-Umsetzung und die anschließende Gelfiltration hergestellt werden kann. Hierdurch bestünde die Möglichkeit, VEBP in großen Mengen als antivirale Substanz für ärmere Länder zur Verfügung zu stellen, oder den Entwicklungsländern die Möglichkeit zu geben, VEBP selbst zu produzieren. Ein weiterer Vorteil ist, dass VEBP seine antiviralen Eigenschaften nicht verliert, wenn es vor Anwendung auf 96°C erhitzt wird (Beobachtung in dieser Arbeit). VEBP ist also sehr inert gegenüber äußeren Einflüssen, wie z.B. einer längeren Lagerung bei tropischen Temperaturen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit wäre die Verwendung von VEBP als Zusatz zu Blutkonserven. Durch die antivirale Aktivität von VEBP gegen HIV und andere Viren wie z.B. das West-Nil Virus, das Hantaanvirus (Vossmann 2004) oder auch das Lassavirus (Stefan Günther, BNI) könnte die Sicherheit von Blutkonserven gesteigert werden. Dadurch würden diese Viren in eventuell kontaminierten Blutspenden von frischinfizierten Spendern, die kurz nach der Infektion nicht als solche erkennbar sind, inaktiviert und das Risiko einer möglichen Infektion reduziert werden. Dass sich durch die *in vitro* Gabe von VEBP eine Infektion verhindern lässt, wurde in Zusammenarbeit mit Ulf Dittmer (Universität Essen) gezeigt. Da VEBP auch das Murine Leukämievirus inaktivierte und eine Infektion von Mäusen vollständig verhindert wurde, kann man davon ausgehen, dass VEBP als Zusatz von Blutspenden geeignet wäre.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass VEBP gegen alle HIV-1 Subtypen wirkt und außerdem noch andere behüllte Viren inaktiviert. Eventuell verbirgt sich hinter der antiviralen Wirkung des VEBP ein gemeinsamer viraler Mechanismus wie z.B. die Annäherung der Virusmembran an die Zielzelle durch Kontakt mit Oberflächenmolekülen (z.B. Heparansulfatproteoglykanstrukturen bei HIV-1).

5 Literaturverzeichnis

- Argyris EG, Acheampong E, Nunnari G, Mukhtar M, Williams KJ, Pomerantz RJ. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts. *J Virol.* **77**(22):12140-51.
- Baba M, Pauwels R, Balzarini J, Arnout J, Desmyter J, De Clercq E. (1988) Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**(16):6132-6.
- Babior BM. (1988) The respiratory burst oxidase. *Hematol Oncol Clin North Am.* **2**(2):201-12.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**(4599):868-71.
- Belding ME, Klebanoff SJ, Ray CG. (1970) Peroxidase-mediated virucidal systems. *Science.* **167**(915):195-6.
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA. (1998) A new classification for HIV-1. *Nature.* **391**(6664):240.
- Berliner JA., Heinecke JW. (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med.* **20**(5):707-27. Review.
- Birnboim HC, Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**(6):1513-23.
- Bobardt MD, Saphire AC, Hung HC, Yu X, Van der Schueren B, Zhang Z, David G, Gallay PA. (2003) Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity.* **18**(1):27-39.
- Bobardt MD, Armand-Ugon M, Clotet I, Zhang Z, David G, Este JA, Gallay PA. (2004) Effect of polyanion-resistance on HIV-1 infection. *Virology.* **325**(2):389-98.
- Boyd MR, Gustafson KR, McMahon JB, Shoemaker RH, O'Keefe BR, Mori T, Gulakowski RJ, Wu L, Rivera MI, Laurencot CM, Currens MJ, Cardellina JH 2nd, Buckheit RW Jr, Nara PL, Pannell LK, Sowder RC 2nd, Henderson LE (1997) Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**(7):1521-30.

- Brinkman K, Smeitink JA, Romijn JA, Reiss P. (1999) Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet*. **354**(9184):1112-5.
- Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM. (1987) Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell*. **8**;49(3):347-56.
- Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. (1990) Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science*. **249**(4976):1555-8.
- Cabrera C, Witvrouw M, Gutierrez A, Clotet B, Kuipers ME, Swart PJ, Meijer DK, Desmyter J, De Clercq E, Este JA (1999) Resistance of the human immunodeficiency virus to the inhibitory action of negatively charged albumins on virus binding to CD4. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **15**(17):1535-43.
- Carrow EW, Vujcic LK, Glass WL, Seamon KB, Rastogi SC, Hendry RM, Boulos R, Nzila N, Quinnan GV Jr. (1991) High prevalence of antibodies to the gp120 V3 region principal neutralizing determinant of HIV-1MN in sera from Africa and the Americas. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **7**(10):831-8.
- Cecilia D, KewalRamani VN, O'Leary J, Volsky B, Nyambi P, Burda S, Xu S, Littman DR, Zolla-Pazner S. (1998) Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage. *J Virol*. **72**(9):6988-96.
- Chapman AL, Winterbourn CC, Brennan SO, Jordan TW, Kettle AJ. (2003) Characterization of non-covalent oligomers of proteins treated with hypochlorous acid. *Biochem J*. **375**(Pt 1):33-40.
- Chase MJ, Klebanoff SJ. (1992) Viricidal effect of stimulated human mononuclear phagocytes on human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12):5582-5.
- Cheng-Mayer C, Brown A, Harouse J, Luciw PA, Mayer AJ. (1999) Selection for neutralization resistance of the simian/human immunodeficiency virus SHIVSF33A variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify N-linked glycosylation. *J Virol*. **73**(7):5294-300.
- Chochola J, Yamaguchi Y, Moguilevsky N, Bollen A, Strosberg AD, Stanislawski M. (1994) Virucidal effect of myeloperoxidase on human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *Antimicrob Agents Chemother*. **38**(5):969-72.
- Clapham PR, McKnight A. (2002) HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull*. **58**:43-59.

- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. **18**;233(4761):343-6.
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, et al. (1986) Human immunodeficiency viruses. *Science*. **9**;232(4751):697.
- Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. **2**;312(5996):763-7.
- Daugherty A, Rateri DL. (1994) Presence of LDL receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptors in macrophages of atherosclerotic lesions from cholesterol-fed New Zealand and heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. **14**(12):2017-24.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. **273**(5283):1856-62. Erratum in: *Science* 1996 Nov 15;274(5290):1069.
- de Mendoza C, Gallego O, Soriano V. (2002) Mechanisms of resistance to antiretroviral drugs – clinical implications. *AIDS Rev*. **4**(2):64-82. Review.
- Derdeyn CA, Decker JM, Sfakianos JN, Wu X, O'Brien WA, Ratner L, Kappes JC, Shaw GM, Hunter E (2000) Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J Virol*. **74**(18):8358-67.
- Deeks SG, Volberding PA. (1997-98) HIV-1 protease inhibitors. *AIDS Clin Rev*. **1997-98**;:145-85.
- Dezzutti CS, James VN, Ramos A, Sullivan ST, Siddig A, Bush TJ, Grohskopf LA, Paxton L, Subbarao S, Hart CE. (2004) In vitro comparison of topical microbicides for prevention of human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Antimicrob Agents Chemother*. **48**(10):3834-44.
- Drake JW. (1993) Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**(9):4171-5.

- Eron JJ, Haubrich R, Lang W, Pagano G, Millard J, Wolfram J, Snowden W, Pedneault L, Tisdale M. (2001) A phase II trial of dual protease inhibitor therapy: amprenavir in combination with indinavir, nelfinavir, or saquinavir.
J Acquir Immune Defic Syndr. **26**(5):458-61.
- Este JA, Schols D, De Vreese K, Van Laethem K, Vandamme AM, Desmyter J, De Clercq E. (1997) Development of resistance of human immunodeficiency virus type 1 to dextran sulfate associated with the emergence of specific mutations in the envelope gp120 glycoprotein.
Mol Pharmacol. **52**(1):98-104.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.
Science. **272** (5263):872-7.
- Flexner C, Barditch-Crovo PA, Kornhauser DM, Farzadegan H, Nerhood LJ, Chaisson RE, Bell KM, Lorentsen KJ, Hendrix CW, Petty BG, et al. (1991) Pharmacokinetics, toxicity, and activity of intravenous dextran sulfate in human immunodeficiency virus infection.
Antimicrob Agents Chemother. **35**(12):2544-50.
- Forehand JR, Pabst MJ, Phillips WA, Johnston RB Jr. (1989) Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium.
J Clin Invest. **83**(1):74-83.
- Fu X, Mueller DM, Heinecke JW (2002) Generation of intramolecular and intermolecular sulfenamides, sulfinamides, and sulfonamides by hypochlorous acid: a potential pathway for oxidative cross-linking of low-density lipoprotein by myeloperoxidase.
Biochemistry. **41**(4):1293-301.
- Furtmuller PG, Obinger C, Hsuanyu Y, Dunford HB. (2000) Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion.
Eur J Biochem. **267**(19):5858-64.
- Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A. (2004) Frequent Transmission of Cytotoxic-T-Lymphocyte Escape Mutants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Highly HLA-A24-Positive Japanese Population.
J Virol. **78**(16): 8437–8445.
- Gonzales MJ, Machekano RN, Shafer RW. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 reverse-transcriptase and protease subtypes: classification, amino acid mutation patterns, and prevalence in a northern California clinic-based population.
J Infect Dis. **184**(8):998-1006. Epub 2001 Sep 10.

- Gottlieb GJ, Ragaz A, Vogel JV, Friedman-Kien A, Rywlin AM, Weiner EA, Ackerman AB. (1981) A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men. *Am J Dermatopathol.* **3**(2):111-4.
- Graham NM. (2000) Metabolic disorders among HIV-infected patients treated with protease inhibitors: a review. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **25** Suppl 1:S4-11.
- Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL. (1984) Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. *J Biol Chem.* **259**(16):10404-13.
- Groenink M, Swart PJ, Broersen S, Kuipers M, Meijer DK, Schuitemaker H. (1997) Potent inhibition of replication of primary HIV type 1 isolates in peripheral blood lymphocytes by negatively charged human serum albumins. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997 Jan 20;13(2):179-85.
- Grone HJ, Grone EF, Malle E. (2002) Immunohistochemical detection of hypochlorite-modified proteins in glomeruli of human membranous glomerulonephritis. *Lab Invest.* **82**(1):5-14.
- Hammer A, Desoye G, Dohr G, Sattler W, Malle E. (2001) Myeloperoxidase-dependent generation of hypochlorite-modified proteins in human placental tissues during normal pregnancy. *Lab Invest.* **81**(4):543-54.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* **92**(9):3007-17. Review.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol.* **166**(4):557-80.
- Harris C, Small CB, Klein RS, Friedland GH, Moll B, Emeson EE, Spigland I, Steigbigel NH. (1983) Immunodeficiency in female sexual partners of men with the AIDS. *N engl J Med* **308**:1181-4.
- Hawkins CL, Davies MJ. (1998) Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem J.* **332** (Pt 3):617-25.
- Hawkins CL, Davies MJ. (2000) Hypochlorite-induced damage to red blood cells: evidence for the formation of nitrogen-centred radicals. *Redox Rep.* **5**(1):57-9.
- Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. (2003) Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids.* **25**(3-4):259-74. Epub 2003 Jul 29.
- Hazell LJ, Stocker R. (1993) Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem J.* **290** (Pt 1):165-72.

- Hoffman IF, Taha TE, Padian NS, Kelly CW, Welch JD, Martinson FE, Kumwenda NI, Rosenberg ZF, Chilongozi DA, Brown JM, Chirenje M, Richardson BA. (2004) Nonoxynol-9 100 mg gel: multi-site safety study from sub-Saharan Africa. *AIDS*. **18**(16):2191-5.
- Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR. (1991) Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science*. **5**;253(5015):71-4.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **96**(1):23-8.
- Jacobson JM, Lowy I, Fletcher CV, O'Neill TJ, Tran DN, Ketas TJ, Trkola A, Klotman ME, Maddon PJ, Olson WC, Israel RJ. (2000) Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults. *J Infect Dis*. **182**(1):326-9. Epub 2000 Jun 30.
- Jansen RW, Molema G, Pauwels R, Schols D, De Clercq E, Meijer DK. (1991) Potent in vitro anti-human immunodeficiency virus-1 activity of modified human serum albumins. *Mol Pharmacol*. **39**(6):818-23.
- Jansen RW, Schols D, Pauwels R, De Clercq E, Meijer DK. (1993a) Novel, negatively charged, human serum albumins display potent and selective in vitro anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Mol Pharmacol*. **44**(5):1003-7.
- Jansen RW, Olinga P, Harms G, Meijer DK. (1993b) Pharmacokinetic analysis and cellular distribution of the anti-HIV compound succinylated human serum albumin (Suc-HSA) in vivo and in the isolated perfused rat liver. *Pharm Res*. **10**(11):1611-4.
- Jesaitis AJ, Quinn MT, Mukherjee G, Ward PA, Dratz EA. (1991) Death by oxygen: radical views. The molecular basis of oxidative damage by leukocytes: a Montana State University/Keystone Symposium, Big Sky, MT, USA, January 28-February 3, 1991.
- Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, D'Aquila RT, Demeter LM, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Telenti A, Richman DD; (2003) International AIDS Society-USA Drug Resistance Mutations Group. Drug resistance mutations in HIV-1. *Top HIV Med*.; **11**(6):215-21. Review.
- Kantor R, Katzenstein D. (2004) Drug resistance in non-subtype B HIV-1. *J Clin Virol*. **29**(3):152-9.
- Katrantzis M, Baker MS, Handley CJ, Lowther DA. (1991) The oxidant hypochlorite (OCl⁻), a product of the myeloperoxidase system, degrades articular cartilage proteoglycan aggregate. *Free Radic Biol Med*. **10**(2):101-9.
- Kehrel B et al. (2001) Patenschrift DE 10148624

- Kempf DJ, Marsh KC, Kumar G, Rodrigues AD, Denissen JF, McDonald E, Kukulka MJ, Hsu A, Granneman GR, Baroldi PA, Sun E, Pizzuti D, Plattner JJ, Norbeck DW, Leonard JM. (1997) Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**(3):654-60.
- Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson MR, Nowak MA, Shaw GM, Saag MS.(1998) Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med.* **4**(11):1302-7.
- Kilby JM, Lalezari JP, Eron JJ, Carlson M, Cohen C, Arduino RC, Goodgame JC, Gallant JE, Volberding P, Murphy RL, Valentine F, Saag MS, Nelson EL, Sista PR, Dusek A. (2002) The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **18**(10):685-93.
- Kilby JM, Eron JJ. (2003) Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med.* **348**(22):2228-38.
- Kitahara M, Eyre HJ, Simonian Y, Atkin CL, Hasstedt SJ. (1981) Hereditary myeloperoxidase deficiency. *Blood.* **57**(5):888-93.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. (1984a) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* **2**;312(5996):767-8.
- Klebanoff SJ. (1967) A peroxidase-mediated antimicrobial system in leukocytes. *J Clin Invest.* **46**:1078.
- Klebanoff SJ. (1968) Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J Bacteriol.* **95**(6):2131-8.
- Klebanoff SJ. (1974) Role of the superoxide anion in the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J Biol Chem.* **249**(12):3724-8.
- Klebanoff SJ. (1999) Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians.* **111**(5):383-9. Review.
- Klebanoff SJ and Belding ME. (1974) Virucidal activity of H₂O₂-generating bacteria: requirement for peroxidase and a halide. *J Infect Dis.* **129**(3):345-8.
- Klebanoff SJ and Coombs RW. (1991) Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *J Exp Med.* **174**(1):289-92.
- Klebanoff SJ and Coombs RW. (1992) Viricidal effect of polymorphonuclear leukocytes on human immunodeficiency virus-1. Role of the myeloperoxidase system. *J Clin Invest.* **89**(6):2014-7.

- Klebanoff SJ, Kazazi F. (1995) Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by the amine oxidase-peroxidase system. *J Clin Microbiol.* **33**(8):2054-7.
- Kliks SC, Shioda T, Haigwood NL, Levy JA. (1993) V3 variability can influence the ability of an antibody to neutralize or enhance infection by diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(24):11518-22.
- Kuipers ME, Huisman JG, Swart PJ, de Bethune MP, Pauwels R, Schuitemaker H, De Clercq E, Meijer DK. (1996) Mechanism of anti-HIV activity of negatively charged albumins: biomolecular interaction with the HIV-1 envelope protein gp120. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* **11**(5):419-29.
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* **18**;393(6686):648-59.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**(259):680-5.
- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. (1990) Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* **265** (18):10373-82.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**:464-78.
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**(4664):840-2.
- P-F. Lin, B. Robinson, Y-F. Gong, K. Ricarrdi, Q. Guo, C. Deminie, R. Rose, T. Wang, N. Meanwell, Z. Yang, H. Wang, T. Zhang, and R. Colonno, Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Res. Inst., Wallingford, CT (2002) Identification and Characterization of a Novel Inhibitor of HIV-1 Entry – I: Virology and Resistance (Abstract)
9th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections.
- Liu HY, Soda Y, Shimizu N, Haraguchi Y, Jinno A, Takeuchi Y, Hoshino H. (2000) CD4-Dependent and CD4-independent utilization of coreceptors by human immunodeficiency viruses type 2 and simian immunodeficiency viruses. *Virology.* **278**(1):276-88.
- Luscher-Mattli M. (2000) Polyanions--a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases? *Antivir Chem Chemother.* **11**(4):249-59. Review.

- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry*. **37**(6):1613-22.
- Maeda Y, Foda M, Matsushita S, Harada S. (2000) Involvement of both the V2 and V3 regions of the CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope in reduced sensitivity to macrophage inflammatory protein 1alpha. *J Virol*. **74**(4):1787-93.
- Malle E, Hazell L, Stocker R, Sattler W, Esterbauer H, Waeg G. (1995) Immunologic detection and measurement of hypochlorite-modified LDL with specific monoclonal antibodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **15**(7):982-9.
- Malle E, Woenckhaus C, Waeg G, Esterbauer H, Grone EF, Grone HJ. (1997) Immunological evidence for hypochlorite-modified proteins in human kidney. *Am J Pathol*. **150**(2):603-15.
- Malle E, Waeg G, Schreiber R, Grone EF, Sattler W, Grone HJ. (2000) Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *Eur J Biochem*. **267**(14):4495-503.
- Malle E, Wag G, Thiery J, Sattler W, Grone HJ. (2001) Hypochlorite-modified (lipo)proteins are present in rabbit lesions in response to dietary cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun*. **289**(4):894-900.
- Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, Buclin T. (2001) Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS*. **15**(1):71-5.
- Matoba T., Shiona T. and Kito M. (1985) Cross-linking of α_{s1} casein by sodium hypochlorite. *J. Food Sci*. **50**, 1738-1744.
- Miller V, Staszewski S, Boucher CA, Phair JP. (1997) Clinical experience with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS*. 1997;11 Suppl A:S157-64.
- Moguilevsky N, Steens M, Thiriart C, Prieels JP, Thiry L, Bollen A. (1992) Lethal oxidative damage to human immunodeficiency virus by human recombinant myeloperoxidase. *FEBS Lett*. **302**(3):209-12.
- Moore JP *et al.* (1992) A monoclonal antibody to CD4 domain 2 blocks soluble CD4-induced conformational changes in the envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-1 infection of CD4+cells. *J Virol*. **66**(8):4784-93.
- Modrow S, Falke D, Truyen U. (2003) Molekulare Virologie. Spektrum Verlag GmbH, Heidelberg.

- Morck H et al., Neue Arzneistoffe 1997-2004, www.pharmazeutische-zeitung.de
- Mori T, Boyd MR. (2001) Cyanovirin-N, a potent human immunodeficiency virus-inactivating protein, blocks both CD4-dependent and CD4-independent binding of soluble gp120 (sgp120) to target cells, inhibits sCD4-induced binding of sgp120 to cell-associated CXCR4, and dissociates bound sgp120 from target cells. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**(3):664-72.
- Morris JC. (1966) The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°. *J Phys Chem* **70**: 3798-3805.
- Mutschler E et al., (2001) Arzneimittelwirkungen. W. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 8. Auflage.
- Naskalski JW.(1994) Oxidative modification of protein structures under the action of myeloperoxidase and the hydrogen peroxide and chloride system. *Ann Biol Clin (Paris)*. **52**(6):451-6.
- Neurath AR, Strick N, Li YY. (2002) Anti-HIV-1 activity of anionic polymers: a comparative study of candidate microbicides. *BMC Infect Dis.* **2**(1):27. Print 2002 Nov 21.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. (1996) The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature.* **29**;382(6594):833-5. Erratum in: *Nature* 1996 Nov 21;384(6606):288.
- Olszowski S, Olszowska E, Stelmaszynska T, Krawczyk A, Marcinkiewicz J, Baczek N. (1996) Oxidative modification of ovalbumin. *Acta Biochim Pol.* **43**(4):661-72.
- Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**(4):1372-6.
- Patel M, Yanagishita M, Roderiquez G, Bou-Habib DC, Oravec T, Hascall VC, Norcross MA.(1993) Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **9**(2):167-74.
- Pattison DI, Davies MJ (2001) Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem Res Toxicol.* **14**(10):1453-64.
- Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, Desmyter J, De Clercq E (1988) Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J Virol Methods.* **20**(4):309-21.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.* **271**(5255):1582-6.
- Pillai S, Good B, Richman D, Corbeil J. (2003) A new perspective on V3 phenotype prediction. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **19**(2):145-9.

- Piot P, Quinn TC, Taelman H, Feinsod FM, Minlangu KB, Wobin O, Mbendi N, Mazebo P, Ndangi K, Stevens W, et al. (1984) AIDS in a heterosexual population in Zaire. *Lancet* **2**: 65-9.
- Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, Hazen SL. (1999) Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest.* **103**(11):1547-60.
- Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Schreiber M. (2002) The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology* **304**(1):70-80.
- Robert Koch Institut (2004) HIV-Infektionen und AIDS-Erkrankungen in Deutschland Aktuelle Epidemiologische Daten. *Epidemiologisches Bulletin.*
Sonderausgabe A/2004 HIV-Infektionen/AIDS: Halbjahresbericht II/2003
- Roderiquez G, Oravecz T, Yanagishita M, Bou-Habib DC, Mostowski H, Norcross MA. (1995) Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J Virol.* **69**(4):2233-9.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. N.Ford, C.Nolan and M. Ferguson, eds. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**(12):5463-7.
- Schacker T, Collier AC, Coombs R, Unadkat JD, Fox I, Alam J, Wang JP, Eggert E, Corey L. (1995) Phase I study of high-dose, intravenous rsCD4 in subjects with advanced HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* **9**(2):145-52.
- Schoen P, Corver J, Meijer DK, Wilschut J, Swart PJ. (1997) Inhibition of influenza virus fusion by polyanionic proteins. *Biochem Pharmacol.* **53**(7):995-1003.
- Schreiber M, Wachsmuth C, Muller H, Odemuyiwa S, Schmitz H, Meyer S, Meyer B, Schneider-Mergener J. (1997) The V3-directed immune response in natural human immunodeficiency virus type 1 infection is predominantly directed against a variable, discontinuous epitope presented by the gp120 V3 domain. *J Virol.* **71**(12):9198-205.
- Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F. (1998) Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med.* **4**(9):1032-7.

- Shafer R. Stanford HIV RT and Protease Sequence Database 1998-2002 a, b c.
- Shaunak S, Gooderham NJ, Edwards RJ, Payvandi N, Javan CM, Baggett N, MacDermot J, Weber JN, Davies DS (1994) Infection by HIV-1 blocked by binding of dextrin 2-sulphate to the cell surface of activated human peripheral blood mononuclear cells and cultured T-cells. *Br J Pharmacol.* **113**(1):151-8.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**(1):76-85.
- Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA. (1986) Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature.* **322**(6078):470-4.
- Sommadossi JP. (1999) HIV protease inhibitors: pharmacologic and metabolic distinctions. *AIDS.* **13** Suppl 1:S29-40.
- Stein BS, Engleman EG. (1991) Mechanism of HIV-1 entry into CD4+ T cells. *Adv Exp Med Biol.* **300**:71-86; discussion 87-96.
- Strizki JM *et al.* (2001) SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(22):12718-23. Epub 2001 Oct 16.
- Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. (2001) Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol.* **158**(3):879-91.
- Swart PJ. & Meijer DKF (1994) Negatively charged albumins: a novel class of polyanionic proteins with a potent anti-HIV activity. *International Antiviral News* **2**:69-71.
- Swart PJ, Beljaars E, Smit C, Pasma A, Schuitemaker H, Meijer DK. (1996) Comparative pharmacokinetic, immunologic and hematologic studies on the anti-HIV-1/2 compounds aconitylated and succinylated HSA. *J Drug Target.* **4**(2):109-16.
- Tersmette M, de Goede RE, Al BJ, Winkel IN, Gruters RA, Cuypers HT, Huisman HG, Miedema F. (1988) Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol.* **62**(6):2026-32.
- Thomas EL. (1979) Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal action against *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **23**(2):522-31.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**(9):4350-4.
- Trkola A, Ketas TJ, Nagashima KA, Zhao L, Cilliers T, Morris L, Moore JP, Maddon PJ, Olson WC. (2001) Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J Virol.* **75**(2):579-88.
- UNAIDS/WHO (2004) www.unaids.org
- Yang CY, Gu ZW, Yang HX, Yang M, Gotto AM Jr, Smith CV (1997) Oxidative modifications of apoB-100 by exposure of low density lipoproteins to HOCl in vitro. *Free Radic Biol Med.* **23**(1):82-9.
- Van Damme L *et al.*, (2000) A phase I study of a novel potential intravaginal microbicide, PRO 2000, in healthy sexually inactive women. *Sex Transm Infect.* **76**(2):126-30.
- Veldkamp AI, Weverling GJ, Lange JM, Montaner JS, Reiss P, Cooper DA, Vella S, Hall D, Beijnen JH, Hoetelmans RM. (2001) High exposure to nevirapine in plasma is associated with an improved virological response in HIV-1-infected individuals. *AIDS.* **15**(9):1089-95.
- Vissers MC, Carr AC, Chapman AL. (1998) Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis. *Biochem J.* **330** (Pt 1):131-8.
- Vissers MC and Winterbourn CC (1991) Oxidative damage to fibronectin. I. The effects of the neutrophil myeloperoxidase system and HOCl. *Arch Biochem Biophys.* **285**(1):53-9.
- Vissers MC and Winterbourn CC (1991) Oxidative damage to fibronectin. II. The effect of H₂O₂ and the hydroxyl radical. *Arch Biochem Biophys.* **285**(2):357-64.
- Volf I, Bielek E, Moeslinger T, Koller F, Koller E. (2000) Modification of protein moiety of human low density lipoprotein by hypochlorite generates strong platelet agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**(8):2011-8.
- Vossmann M (2004) Neutralisation von Varianten des Humanen Immundefizienz Virus Typ I(HIV-1), West-Nil Virus und Hantaan Virus mit modifiziertem humanen Serumalbumin (HSA). Universität Hamburg, Fakultät für Biologie
- Vossmann M, Kirst M, Brodde M, Kehrel B and Schreiber M (2003). Binding of chemically modified serum albumins to HIV-1 gp120, RET 02, Seite 440 (Gesellschaft für Virologie-Jahrestagung, Berlin, Poster)
- Vucicevic-Boras V, Brozovic S, Cekic-Arambasin A, Zadro R, Devcic T, Begovac J, Brailo V. (2003) Salivary peroxidase levels in patients with AIDS. *Eur J Med Res.* **21**;8(2):81-4.

- Watts DH. (2002) Management of human immunodeficiency virus infection in pregnancy. *N Engl J Med.* **346**(24):1879-91. Review.
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature.* **387**(6631):426-30.
- Wei X, Decker JM, Liu H, Zhang Z, Arani RB, Kilby JM, Saag MS, Wu X, Shaw GM, Kappes JC. (2002) Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**(6):1896-905.
- Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* **175**(1):231-7.
- Wild C, Greenwell T, Matthews T. (1993) A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **9**(11):1051-3.
- Wild C, Dubay JW, Greenwell T, Baird T Jr, Oas TG, McDanal C, Hunter E, Matthews T (1994) Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(26):12676-80.
- Winterbourn CC (1985) Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. *Biochim Biophys Acta.* **840**(2):204-10.
- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. (2000) Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol.* **7**(1):53-8. Review.
- Wu SM, Pizzo SV. (1999) Mechanism of hypochlorite-mediated inactivation of proteinase inhibition by alpha 2-macroglobulin. *Biochemistry.* **38**(42):13983-90.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* **393**(6685):595-9.
- Zgliczynski JM, Stelmaszynska T, Ostrowski W, Naskalski J, Sznajd J (1968) Myeloperoxidase of human leukaemic leucocytes. Oxidation of amino acids in the presence of hydrogen peroxide. *Eur J Biochem.* **4**(4):540-7.
- Zgliczynski JM, Stelmaszynska T, Domanski J, Ostrowski W (1971) Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Biochim Biophys Acta.* **235**(3):419-24.
- Zwart G, Langedijk H, van der Hoek L, de Jong JJ, Wolfs TF, Ramautarsing C, Bakker M, de Ronde A, Goudsmit J. (1991) Immunodominance and antigenic variation of the principal neutralization domain of HIV-1. *Virology.* **181**(2):481-9.

Anhang 1: Abkürzungen und Schreibweisen

ad	zu
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
β-Gal	β-Galaktosidase
BSA	Bovines Serum Albumin
CCR	CC-(β)-Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
CEM	lymphoblastoide T-Zelllinie
CXCR	CXC-(α)-Chemokinrezeptor
Da	Dalton
DMEM	<i>Dubleco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
EC ₅₀₍₉₀₎	<i>effective concentration</i> , Konzentration, bei der die Infektionsrate um 50% (90%) gemindert ist
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbent Assay</i>
Env, <i>env</i>	<i>envelope</i> Protein oder Gen
<i>et al.</i>	lateinisch <i>et alii</i> : und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAG, <i>gag</i>	<i>group specific antigen</i> , virales Strukturprotein bzw. Gen
GenTSV	Gentechniksicherheitsverordnung
GHOST	humane Osteosarcomzelllinie
GST-V3	Gluthation-S-Transferase-V3, GST gekoppelt mit einem V3-Loop
gp	Glycoprotein
HAART	Hoch aktive antiretrovirale Therapie
HeLa	humane Cervixkarzinomzelllinie
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HSA	Humanes Serum Albumin
HR	<i>hapted repeat</i> : Region im Transmembranprotein gp41
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid

LB	Luria Bertani
LDL	<i>low density protein</i>
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektroskopie <i>Time of flight</i> -Analyse
MPO	Myeloperoxidase
MSA	Murines Serum Albumin
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NtRTI	Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NNRTT	Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBMS	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIPES	Piperazin-N, N`-bis-[2-ethansulfonsäure]
pH	lateinisch <i>pondus hydrogenii</i> : negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PMN	neutrophile polymorphkernige Leukozyten
PP	Polypropylen
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Pol, <i>pol</i>	Polymerase, Vorläuferprotein bzw. Gen der viralen Polymerase, Reversen Transkriptase und Integrase
PSA	Porcines Serum Albumin
RANTES	<i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCID ₅₀	<i>tissue culture infectious dose</i> : Volumen (ml) einer viralen Lösung bei der 50% der Zellen einer Kultur infiziert werden
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
TF	Transferrin

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i>
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
VEBP	Virus Envelope Bindendes Protein
VERO	Affennierenzelllinie
WHO	<i>World Health Organization</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Anhang 2: Aminosäuren

Symbol I	Symbol II	Name
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valein
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Anhang 3: Veröffentlichungen

Kirst M, Vossmann M, Schaal H and Schreiber M (2003). Novel modified Serum Albumins as inhibitors for Human Immunodeficiency Virus-1 entry *in-vitro*, RET 01, Seite 439 (Gesellschaft für Virologie-Jahrestagung, Berlin, Poster)

Vossmann M, Kirst M, Brodde M, Kehrel B and Schreiber M (2003). Binding of chemically modified serum albumins to HIV-1 gp120, RET 02, Seite 440 (Gesellschaft für Virologie-Jahrestagung, Berlin, Poster)

Kirst M (2003). A new in-vitro assay to study the role of V3 loop glycosylation for binding of gp120 to viral receptors CD4, CXCR4 and CCR5.
(1st International Meeting on Glycoviropology, Virus and Glycans, Göteborg, Sweden, Oral presentation)

Kirst M, Vossmann M, Schaal M and Schreiber M (2003). A new in-vitro assay to study the role of V3 loop glycosylation for binding of gp120 to viral receptors CD4, CXCR4 and CCR5, O13 Seite 29
(1st International Meeting on Glycoviropology, Virus and Glycans, Göteborg, Sweden, Poster)

Vossmann M, Kirst M, Hauser H and Schreiber M (2003). Direct analysis of gp120-receptor using infectious viral particles and a new developed surface plasmon resonance assay O12 Seite 28
(1st International Meeting on Glycoviropology, Virus and Glycans, Göteborg, Sweden, Poster)

Vossmann M, Kirst M, Hauser H and Schreiber M (2004). Direct analysis of gp120-receptor binding using infectious viral particles and a new developed surface plasmon resonance assay.
(HIV Pathogenesis. Whistler, Canada 2004, Poster)

Danksagung

Herrn Dr. Michael Schreiber danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, dieses selbstständig zu bearbeiten. Außerdem danke ich ihm für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion und für seine wertvollen Tipps bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Herbert Schmitz möchte ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich möchte ich für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit und die Möglichkeit zur Absolvierung der Disputation in Heidelberg danken.

Herrn Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte danke ich für die nette Hilfestellung und Möglichkeit, die Disputation in Heidelberg zu absolvieren, und für die Bereitschaft als Prüfer zur Verfügung zu stehen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Hilgenfeldt danke ich ebenfalls für die Bereitschaft als Prüfer zur Verfügung zu stehen.

Frau Dr. Svenja Polzer danke ich für ihre Bereitschaft, mir das Arbeiten mit infektiösen Material im Sicherheitslabor näherzubringen und mich in die HIV-Infektionsversuche einzuführen.

Herrn Prof. Dr. Heiner Schaal danke ich für die Bereitstellung der pgp160-Expressionsvektoren und die Möglichkeit, die Immunoblotversuche zur Darstellung der gp120-Expression während eines dreiwöchigen Aufenthaltes in Düsseldorf durchzuführen.

Herrn Dr. Matthias Dittmar und Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich danke ich für die Möglichkeit, die Neutralisationsversuche mit VEBP während eines zweiwöchigen Aufenthaltes am Hygiene-Institut in Heidelberg durchzuführen.

Herrn Dr. Matthias Dittmar danke ich für die Bereitstellung der verschiedenen HIV-Subtypen für die Neutralisationsversuche.

Danke an alle Mitarbeiter der Virologie im BNI für die gute Arbeitsatmosphäre und insbesondere Meike, Susanne, Antje, Klaus, Christian, Susanne C. und Ina für die schöne Zeit im BNI und ganz besonders Markus und Heiko. Die Ausflüge ins HH-nightlife haben über manche Frusterlebnisse im Labor hinweggetröstet.

aufstehen, atmen, anziehen und hingehen. zurückkommen, essen und einsehen am schluss: dass man weitermachen muss.

an den landungsbrücken raus.

Kettcar

Kaija danke ich für das Korrekturlesen und ihr Verständnis, dass ich immer so lange Zeit vor dem Computer für die Doktorarbeit verbracht habe.

An meine Eltern einen ganz lieben Dank, ohne die wär`s auch nicht gegangen.

Vielen lieben Dank!