

**INAUGURAL - DISSERTATION**

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

**vorgelegt von**

**Diplom - Biologin**  
**Sandra Reuter**  
**aus Worms**

Tag der mündlichen Prüfung:

# **Charakterisierung einer Hüllprotein-vermittelten Restriktion von HIV-2 in humanen Zellen**

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich  
Prof. Dr. Elisabeth Schwarz

*meinen Eltern*

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung und die Übernahme des 1.Gutachtens bedanken.

Prof. Dr. Elisabeth Schwarz danke ich für die Übernahme des 2.Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Matthias T. Dittmar für die Bereitstellung des interessanten Themas und die intensive Betreuung während der gesamten Arbeit. Er ermöglichte mir außerdem mehrere Laboraufenthalte im Ausland und die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dittmar für die freundliche und lockere Arbeitsatmosphäre bedanken. Ganz besonders sind mir Heike und Lars ans Herz gewachsen, die auch außerhalb des Laboralltages immer für mich da waren.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Virologie möchte ich für die unzähligen Ratschläge und die Unterstützung bei zahlreichen Problemen danken. Jochen Bodem, Oliver Fackler, Sabine Buschhorn und Heike Oberwinkler danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Dr. Àine McKnight und Prof. Dr. Nathaniel Landau, die mich als Gast in ihren Labors freundlich aufgenommen und mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und vor allem Marcus bedanken, die mich durch alle Höhen und Tiefen geduldig begleitet haben.

Den größten Dank schulde ich meinen Eltern, die immer für mich da waren, und die mir dieses Studium erst ermöglicht haben.

## Zusammenfassung

Die Erforschung von Restriktionen der HIV-Infektion spielt eine wichtige Rolle für die Aufklärung und das Verständnis von Virus-Wirt-Interaktionen und liefert neue Ansätze für die Entwicklung antiviraler Therapien. In der vorliegenden Arbeit wurde die Restriktion eines HIV-2 Isolates in humanen Zellen analysiert. Das Primärisolat prCBL23 erfährt im Vergleich zum T-Zell-adaptierten Isolat CBL23 eine Restriktion der Infektion in einigen humanen Zelllinien und primären Zellen. Die restriktiven Zellen exprimieren dabei die für die HIV-Infektion notwendigen Rezeptoren CD4 und CXCR4 und teilen sich aktiv. Zunächst wurde eine virale Determinante der Restriktion charakterisiert, dann die Phase des Replikationszyklus bestimmt, in der sich die Restriktion manifestiert, und anschließend Versuche zur Aufklärung des Mechanismus der Restriktion durchgeführt.

In Infektionsstudien mit pseudotypisierten HIV-2-Partikeln konnte gezeigt werden, dass das Hüllprotein von prCBL23 die virale Determinante der Restriktion in GHOST/X4-Zellen ist. Es vermittelt im Vergleich zum Hüllprotein von CBL23 eine 60fache Restriktion der Infektion. Durch Mutationsanalyse der Hüllproteine prCBL23-Env und CBL23-Env konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure an Position 74 im aminoterminalen Bereich von prCBL23-Env die für die Restriktion kritische Determinante ist. Die Aminosäure an Position 111 und die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne von prCBL23 spielen nur eine untergeordnete Rolle. Durch die Quantifizierung der Hüllproteine in den pseudotypisierten Partikeln konnte ausgeschlossen werden, dass die Restriktion durch einen schlechten Einbau des Hüllproteins in das virale Partikel vermittelt wird. Mit Hilfe des BlaM-Assays konnte gezeigt werden, dass die restringierten prCBL23-Env-Partikel mit ähnlicher Effizienz mit GHOST/X4-Zellen fusionieren können wie die nicht-restringierten CBL23-Partikel. Dies bedeutet, dass die Restriktion erst nach der Fusion innerhalb der Zelle stattfindet. Eine Analyse der viralen DNA in GHOST/X4-Zellen durch quantitative PCR zeigte weiterhin, dass sich die Restriktion bereits vor oder während der reversen Transkription manifestiert.

Dies wirft die Frage auf, wie das Hüllprotein Prozesse beeinflussen kann, die nach der Fusion innerhalb der Zelle stattfinden. In Infektionsstudien mit gemischten Partikeln konnte beobachtet werden, dass bereits wenig CBL23-Env in prCBL23-Partikeln die Restriktion drastisch reduziert. Andererseits konnten keine Hinweise gefunden werden, dass die Aktivierung von Signalkaskaden eine Rolle für die Vermeidung der Restriktion spielt. Dies könnte bedeuten, dass die Restriktion nur vermieden werden kann, wenn CBL23-Env die Fusion selbst vermittelt. Eine Hypothese für den der Restriktion zugrunde liegenden Mechanismus wäre, dass durch die kritische Aminosäureposition 74 die Interaktion des Hüllproteins mit zellulären Oberflächenmolekülen beeinflusst wird, so dass die beiden Hüllproteine, möglicherweise unter Ausnutzung spezieller Mikrodomänen in der Zellmembran, das virale Kapsid auf verschiedenen Routen in die Zelle schleusen, die unterschiedlich günstige Bedingungen für die Replikation bieten. So könnten prCBL23-Env-Partikel in einem zellulären Kompartiment festsitzen, das keine günstigen Bedingungen bietet, oder die Degradation fördert. Die weiterführende Aufklärung des Mechanismus der Restriktion kann maßgeblich zu einem detaillierten Verständnis von Post-Fusions-Ereignissen wie *Uncoating*, Zusammenlagerung des Präintegrationskomplexes und Start der reversen Transkriptase beitragen, die bislang nur unzureichend erforscht sind.

## Summary

The investigation of restrictions to HIV replication are very important for the elucidation and understanding of virus-host interactions and may provide new targets for the development of antiviral therapies. In this thesis, the restriction of an HIV-2 isolate to infection of human cells has been analysed. In comparison to the T-cell line adapted isolate CBL23, the primary isolate prCBL23 is unable to infect some human cell lines and primary human cells, although the restrictive cell types express the HIV-receptors CD4 and CXCR4. First, the viral determinant of the restriction has been characterised, then the step of the replication cycle at which the restriction manifests has been determined. Finally, experiments towards the elucidation of the mechanism of restriction have been performed.

Infection studies with pseudotyped HIV-2 particles revealed that the envelope protein of prCBL23 is the viral determinant of the restriction in GHOST/X4 cells. It confers a 60fold restriction to infection compared to the envelope protein of CBL23. The mutational analysis of both prCBL23-Env and CBL23-Env mapped the critical determinant of the restriction to amino acid 74 in the aminoterminal region of prCBL23. Amino acid 111 and the truncation of the cytoplasmic domain of prCBL23-Env play only secondary roles. The quantification of the amount of envelope protein in the investigated pseudotype particles excluded the possibility that the restriction is mediated by inefficient incorporation of the envelope protein into viral particles. The investigation of the entry efficiency with a BlaM-Assay showed that the restricted prCBL23-Env particles and the non-restricted CBL23-Env particles mediate fusion with similar efficiency. Therefore, the restriction to infection manifests after fusion within the cell. Furthermore, the analysis of viral DNA in GHOST/X4 cells by quantitative PCR revealed that the restriction to infection manifests before or during reverse transcription.

This raises the question how the envelope protein is able to influence post-entry events of the viral replication. Infection studies with mixed particles showed that already minor amounts of CBL23-Env in prCBL23 particles dramatically reduce their restriction to infection. However, no evidence could be found that the activation of signalling cascades is involved in restriction of prCBL23 particles. A hypothesis for the mechanism of restriction is that the critical amino acid 74 influences the interaction of the envelope protein with cellular surface molecules. Thereby, the envelope proteins might target the viral capsid into different cellular compartments that provide different conditions for the viral replication. prCBL23-Env particles might be trapped in a compartment that does not promote replication or that accelerates degradation. The further elucidation of the mechanism of restriction will contribute to the understanding of post-fusion events in the HIV life cycle like uncoating, assembly of the preintegration complex or initiation of reverse transcription.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>IV</b>
<b>Summary.....</b>	<b>V</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Humane Immundefizienz Virus.....	1
1.1.1 Morphologie von HIV-Partikeln.....	2
1.1.2 Genomische Organisation von HIV.....	3
1.1.3 Replikationszyklus von HIV.....	4
1.2 Das HIV Hüllprotein.....	5
1.2.1 Struktur und Aufbau.....	5
1.2.2 Interaktion mit dem Rezeptor CD4.....	7
1.2.3 Interaktion mit den Korezeptoren.....	8
1.2.4 CD4-unabhängige Virusinfektion.....	9
1.2.5 Fusionsprozess.....	9
1.2.6 Funktionen der zytoplasmatischen Domäne.....	10
1.2.7 Rolle des Hüllproteins beim <i>Attachment</i> .....	11
1.2.8 Aktivierung von Signalkaskaden durch das Hüllprotein.....	13
1.2.9 Einfluss des Hüllproteins auf Ereignisse nach der Fusion.....	14
1.3 Antivirale Strategien des Wirtsorganismus.....	15
1.3.1 Retrovirale Restriktionsfaktoren.....	16
1.3.1.1 ZAP.....	16
1.3.1.2 APOBEC3G.....	17
1.3.1.3 Fv1, Lv1 und Ref1.....	18
1.4 Fragestellung.....	19
<b>2. Ergebnisse.....</b>	<b>22</b>
2.1 Charakterisierung der Hüllproteine prCBL23-Env und CBL23-Env.....	22
2.1.1 HIV-2 Partikel lassen sich mit Env35 und Env42 pseudotypisieren.....	23
2.1.2 Env35 vermittelt eine Restriktion der Infektion in GHOST/X4-Zellen.....	24
2.1.3 Die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne von Env35 ist nicht für die Restriktion verantwortlich.....	26
2.1.4 Der für die Restriktion kritische Bereich liegt am aminoterminalen Ende der Oberflächendomäne von Env35.....	28
2.1.5 Die Aminosäure Glutaminsäure an Position 74 in Env35 ist die kritische Determinante für die Restriktion.....	30
2.1.6 Die potentielle Glykosylierungsstelle an Position 71 in Env35 und Env42 hat keinen Einfluss auf die Restriktion.....	32

2.2 Bestimmung der Phase des Replikationszyklus, in der die Restriktion stattfindet.....	32
2.2.1 Die Menge der verschiedenen Hüllprotein-Mutanten in den viralen Partikeln korreliert nicht mit deren Restriktionseigenschaften.....	34
2.2.2 Bestimmung der Effizienz des Eintritts der viralen Partikel in die Zelle mit Hilfe des BlaM-Assays.....	36
2.2.2.1 Optimierung des Einbaus von $\beta$ -Lactamase-Vpr2 in virale Partikel.....	36
2.2.2.2 Env35 vermittelt den Eintritt in GHOST/X4-Zellen mit ähnlicher Effizienz wie Env42.....	41
2.2.3 Quantifizierung der viralen DNA in infizierten GHOST/X4-Zellen mittels Real-Time-PCR.....	43
2.2.3.1 Evaluierung der quantitativen Gag-PCR.....	43
2.2.3.2 In GHOST/X4-Zellen können nach der Infektion mit Env35-Partikeln im Vergleich zu Env42-Partikeln weniger RT-Produkte nachgewiesen werden.....	46
2.3 Versuche zur Aufklärung des Mechanismus der Restriktion.....	48
2.3.1 Die Anwesenheit von Env42S in Env35-Partikeln reduziert deren Restriktion drastisch.....	49
2.3.2 Die Infektionseffizienz von Env35-Partikeln wird nicht signifikant durch die Präinkubation von GHOST/X4-Zellen mit Env42S-Partikeln gesteigert.....	49
2.3.3 Die Inkubation von GHOST/X4-Zellen mit Env35- und Env42S-Partikeln führt nicht zur unterschiedlichen Aktivierung von MAP-Kinase.....	52
<b>3. Diskussion.....</b>	<b>54</b>
3.1 Charakterisierung der Hüllproteine.....	54
3.2 Lokalisation der Restriktion.....	58
3.3 Überlegungen zum Mechanismus der Restriktion.....	61
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>67</b>
4.1 Chemikalien.....	67
4.1.1 Radiochemikalien.....	68
4.2 Puffer und Lösungen.....	68
4.3 Kits und Reagenzien.....	70
4.4 Enzyme.....	70
4.5 Antikörper.....	71
4.6 Oligonukleotide.....	71
4.6.1 PCR- und Mutagenese-Primer.....	71
4.6.2 Sequenzier-Primer.....	72
4.6.3 Primer und Sonden für die quantitative PCR.....	72
4.7 DNA- und Proteinmarker.....	73
4.8 Plasmide.....	73
4.9 Medien und Materialien für die Arbeit mit Bakterien.....	76
4.10 Materialien für die Zellkultur.....	77



4.11 Software.....	78
4.12 Methoden.....	78
4.12.1 Isolierung von kleineren Mengen Plasmid-DNA („Minipreps“)	78
4.12.2 Isolierung von großen Mengen Plasmid-DNA („Maxipreps“)	78
4.12.3 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	79
4.12.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	79
4.12.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	79
4.12.6 Isolierung von DNA-Fragmenten.....	79
4.12.7 Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	80
4.12.8 Phosphatasebehandlung von Vektoren.....	81
4.12.9 Ligation.....	81
4.12.10 Sequenzierung.....	81
4.12.11 Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	81
4.12.12 Transformation von Bakterien.....	82
4.12.13 Flüssigkulturen von Bakterien.....	82
4.12.14 Einfrieren von Bakterien.....	82
4.12.15 Haltung von Zellkulturzellen.....	82
4.12.16 Einfrieren von Zellkulturzellen.....	83
4.12.17 Auftauen von Zellkulturzellen.....	83
4.12.18 Transfektion von 293T-Zellen.....	83
4.12.19 Herstellung von pseudotypisierten Viren.....	84
4.12.20 Konzentrierung von viralen Partikeln.....	84
4.12.21 Quantifizierung der Reversen Transkriptase in Virusstocks (RT-Assay).....	84
4.12.22 Infektionsstudien.....	85
4.12.23 Auswertung von Infektionen durch Immunfärbung.....	85
4.12.24 Auswertung von Infektionen durch den Renilla Luziferase Assay.....	85
4.12.25 Extraktion genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.....	85
4.12.26 Quantitative PCR.....	86
4.12.27 BlaM-Assay.....	88
4.12.28 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	89
4.12.29 Western Blot.....	89
4.12.30 Kinase-Assay.....	90
4.12.31 Quantifizierung des Hüllprotein-Einbaus in virale Partikel.....	90
<b>5. Abkürzungen.....</b>	<b>92</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>7. Publikationen.....</b>	<b>111</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Humane Immundefizienz Virus

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) ist der Erreger von AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) und gehört zur Familie der Retroviren. Der Name „Retrovirus“ leitet sich von einer besonderen Replikationsstrategie ab, bei der das einzelsträngige, positiv-orientierte retrovirale RNA-Genom von der Reversen Transkriptase in doppelsträngige, lineare DNA umgeschrieben wird, die anschließend in das Wirtszellgenom integriert wird. Retroviren können aufgrund ihrer Genomorganisation in zwei Kategorien unterteilt werden: in einfache und komplexe Retroviren (Coffin 1992; Murphy et al., 1994). Einfache Retroviren enthalten die drei kodierenden Bereiche *gag*, *pol* und *env*, welche die Informationen für die viralen Strukturproteine, Enzyme, wie Reverse Transkriptase, Integrase und Protease, und das Hüllprotein enthalten. HIV gehört zu den komplexen Retroviren, die zusätzlich zu diesen essentiellen Informationen noch für einige akzessorische und regulatorische Proteine kodieren. Innerhalb der Familie der Retroviren gehört HIV zur Unterfamilie der Lentiviren. Die Lentiviren werden wiederum in Nichtprimaten- und Primaten-Lentiviren unterteilt. Vertreter der Nichtprimaten-Lentiviren konnten aus verschiedenen Säugetier-Spezies isoliert werden, wie z.B. das Katzen-Immundefizienz Virus (FIV, *feline immunodeficiency virus*) und das Virus der infektiösen Anemie der Pferde (EIAV, *equine infectious anemia virus*). Die Primaten-Lentiviren beinhalten neben HIV das Affen-Immundefizienz Virus (SIV, *simian immunodeficiency virus*).

Die Subtypen von HIV, HIV-1 und HIV-2, sind die einzigen bekannten humanpathogenen Lentiviren. Dennoch sind sie mit den SIV-Subtypen, die in verschiedenen afrikanischen Affenspezies vorkommen und in ihren natürlichen Wirten nicht pathogen sind, eng verwandt. Man glaubt, dass HIV durch Übertragung von SIV-infizierten nichthumanen Primaten auf den Menschen entstanden sein könnte (Gao et al., 1992, 1999; Hirsch et al., 1989). Die phylogenetische Analyse der Primaten-Lentiviren ergab, dass SIVcpz (SIV des Schimpansen) eng mit HIV-1 verwandt ist (Gao et al., 1999), weshalb die HIV-1 Epidemie wahrscheinlich von SIVcpz ausgegangen ist. Dagegen gibt es deutliche Hinweise, dass HIV-2 durch Übertragung von SIVsm von Mohrenmangaben (*sooty mangabey monkeys*, *Cercocebus atys*) auf den Menschen entstanden ist. HIV-2 und SIVsm sind phylogenetisch nah verwandt, haben eine ähnliche genomische Organisation, und die geographische Verbreitung von HIV-2 in Westafrika stimmt mit dem Vorkommen des natürlichen Wirtes *C. atys* überein.

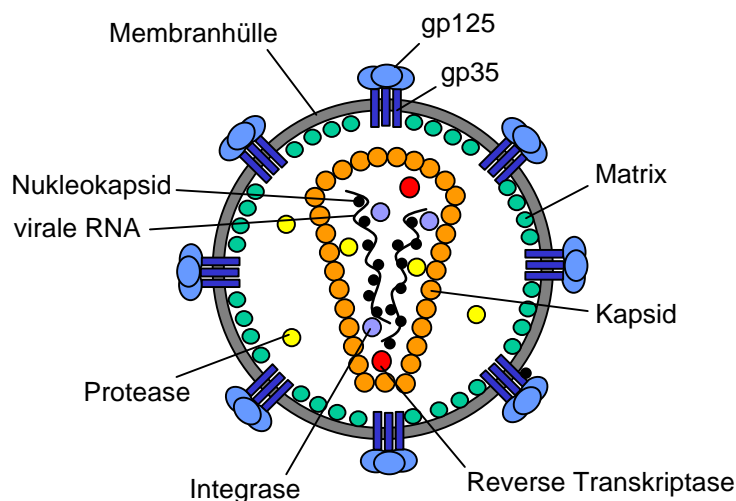
HIV-1 und -2 sind sich in vielen Dingen sehr ähnlich und verursachen beide AIDS im Menschen. Doch es gibt einige wichtige Unterschiede, die zum Verständnis ihrer Pathogenese beitragen. Während die meisten HIV-Infektionen durch den Subtyp HIV-1 verursacht werden und HIV-1 sich fast in der ganzen Welt ausgebreitet hat, treten HIV-2-Infektionen hauptsächlich in Westafrika und aufgrund der früheren Kolonialisierung auch in Portugal auf. Dieses im Vergleich zur HIV-1-Pandemie mehr endemische Verhalten der HIV-2-Infektion mit stabilen Prävalenzraten in den meisten Ländern, entsteht aufgrund von Differenzen in der Transmissionsrate und Virulenz von HIV-2 im Vergleich zu HIV-1 (Remy, 1998). So ist die Häufigkeit der HIV-2 Übertragungen im Vergleich zu HIV-1 etwa 10fach niedriger, was wahrscheinlich auf die niedrige Viruslast in vielen asymptomatischen Individuen zurückzuführen ist

(Adjorlolo-Johnson et al., 1994; Berry et al., 1998; Cavaco-Silva et al., 1998; Kanki et al., 1994; O'Donovan et al., 2000). Die klinischen Anzeichen der HIV-2- und HIV-1- Infektion sind ähnlich (Brun-Vezinet et al., 1987), dennoch ist HIV-2 generell weniger pathogen. HIV-2-Infizierte haben gewöhnlich eine lange klinisch latente Periode von 10 oder mehr Jahren, die in einer zu etwa 2/3 niedrigeren Mortalitätsrate resultiert (Marlink et al., 1994; Pepin et al., 1991; Whittle et al., 1994). Tatsächlich scheinen viele HIV-2-Infizierte überhaupt nicht AIDS zu entwickeln (Poulsen et al., 1997). Auch dies könnte auf die niedrigere Virulenz und Viruslast, oder auf eine bessere Kontrolle der HIV-2-Replikation durch das Immunsystem zurückzuführen sein (Andersson et al., 2000; Berry et al., 1998; Simon et al., 1993; Soriano et al., 2000; Whittle et al., 1998). So können Seren von HIV-2-Infizierten sowohl HIV-2 als auch HIV-1 häufig besser neutralisieren, als die Seren von HIV-1-Infizierten. Dies könnte bedeuten, das HIV-2 eine effizientere Antikörper-Antwort im Infizierten induziert. Zusätzlich haben HIV-2-Infizierte oft eine starke zytotoxische T-Zell-Antwort.

Diese und andere Unterschiede zwischen HIV-1 und HIV-2 liefern interessante Einblicke in die Pathogenese von HIV. HIV-2 scheint eine leicht abgeschwächte Form von HIV-1 zu sein, was in einem langsameren Fortschreiten der Krankheit resultiert. Die Erforschung von HIV-2 liefert somit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis und zur Bekämpfung der HIV-Infektion.

### 1.1.1 Morphologie von HIV-Partikeln

In Abbildung 1.1 ist die Morphologie von HIV-Partikeln schematisch dargestellt. Infektiöse HIV-Partikel sind sphärisch und haben einen Durchmesser von ungefähr 100 nm. Sie bestehen aus einer äußeren Membranhülle, die von der Plasmamembran der Wirtszelle abstammt. In diese Membranhülle ist das virale Glykoprotein (Hüllprotein, *Envelope*) eingebettet. Es besteht aus zwei nicht-kovalent miteinander verbundenen Untereinheiten, dem Transmembran-Glykoprotein (gp41 bei HIV-1 und gp35 bei HIV-2)



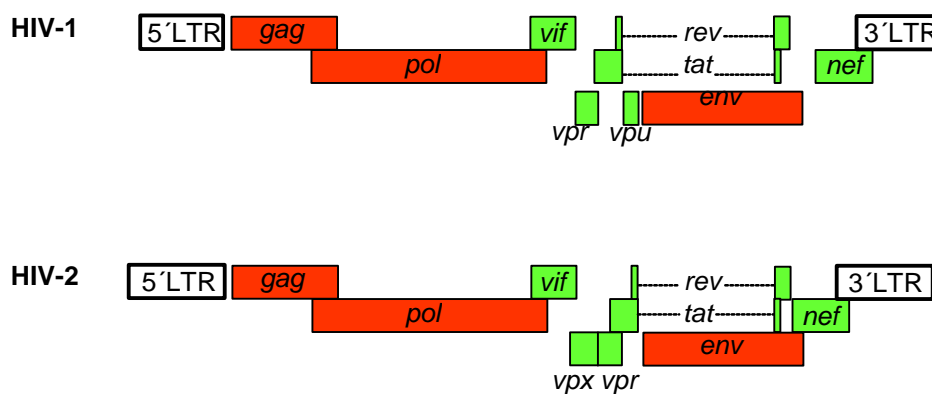
**Abb. 1.1** Schematische Darstellung reifer HIV-2-Partikel.

und dem Oberflächen-Glykoprotein (gp120 bzw. gp125). Die Hüllproteine sind über die Transmembrandomäne des Transmembran-Glykoproteins in Form von Trimeren in der Membranhülle verankert. Mit der Innenseite der Membranhülle sind Matrixproteine (MA) über ihren Myristinsäurerest und eine positiv geladene Domäne assoziiert. Im Inneren des Partikels befindet sich das konisch geformte Viruskapsid, das vom Kapsidprotein (CA) gebildet wird. Das Kapsid enthält das Virusgenom in Form von zwei identischen Molekülen einzelsträngiger RNA, die an einer Dimerisierungsstelle miteinander assoziiert sind. Die RNAs sind ca. 9 kb lang und mit dem Nukleokapsidprotein (NC) komplexiert. Im Kapsid befinden sich außerdem die Enzyme Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Die Protease (PR) befindet sich wahrscheinlich sowohl innerhalb als auch außerhalb des Kapsids. In die viralen Partikel werden außerdem die viralen Proteine p6, Vpr, Vpx (nur bei HIV-2), Nef und Vif verpackt.

### 1.1.2 Genomische Organisation von HIV

Das Genom von HIV besteht aus zwei identischen, einzelsträngigen, linearen RNA-Molekülen, die je ca. 9000 Basen lang sind. In der Nähe des 5'-Endes der viralen RNA befindet sich eine Primer-Bindestelle, an die die zelluläre tRNA<sup>Lys</sup> hybridisiert ist. Diese tRNA dient als Primer für die Initiation der reversen Transkription des viralen RNA-Genoms. Die kodierenden Regionen werden am 5'- und 3'-Ende von regulatorisch wichtigen Kontrollsequenzen flankiert, die für die reverse Transkription und die Integration essentiell sind. Durch die reverse Transkription wird das RNA-Genom in doppelsträngige DNA umgeschrieben und anschließend als sogenannter Provirus ins Genom der Wirtszelle integriert. Die provirale DNA von HIV kodiert für insgesamt neun Proteine, deren offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*) teilweise überlappen (Abb. 1.2). Die kodierenden Regionen werden durch die LTRs (*long terminal repeats*) eingerahmt. Die LTRs sind identische Sequenzfolgen, die im Verlauf der reversen Transkription generiert werden. Sie bestehen aus den Regionen U3, R und U5, die verschiedene regulatorische Sequenzen wie Promotor- und *Enhancer*-Elemente enthalten, die für die Transkription der proviralen DNA wichtig sind. Das 5'LTR ist für die Initiation und das 3'LTR für die Termination der Transkription verantwortlich. Vor allem im U3-Bereich sind mehrere *cis*-aktive Sequenzen zu finden, an die zelluläre transaktive Proteine wie z.B. NF $\kappa$ B (Nuklearfaktor  $\kappa$ B) binden und die Transkription der integrierten Virusgene induzieren. In der R-Region des 5'LTR befindet sich außerdem ein für die Transkription essentielles Strukturelement TAR (*Tat-responsive*), an das das virale Protein Tat bindet und so die Elongation der Transkription 100 bis 1000fach steigert. Die Transkription der proviralen DNA startet immer an der U3-R-Grenze im 5'LTR und endet am R-U5-Übergang im 3'LTR. Somit wird nur eine mRNA transkribiert, die wie die zellulären mRNAs am 5'-Ende eine Cap-Struktur erhält und am 3'-Ende polyadenyliert wird. Diese RNA dient entweder als genomische RNA, die in die Nachkommen-Viren eingebaut wird, oder als mRNA für die Translation des *gag*- und *pol*-ORF. *gag* kodiert für die Strukturproteine Matrix (MA), Kapsid (CA), Nukleokapsid (NC) und p6, die zunächst als Gag-Vorläuferprotein translatiert werden, das erst bei der Reifung des Virus von der viralen Protease in die einzelnen Komponenten gespalten wird. Die Produkte des *pol*-Gens sind die Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Sie werden

ebenfalls als Vorläuferprotein synthetisiert, das hauptsächlich erst bei der Virusreifung durch die virale Protease in die einzelnen Enzyme gespalten wird. Dieses Vorläuferprotein ist ein Gag/Pol-Fusionsprotein. Da der *gag*- und *pol*-ORF überlappen, muss bei der Proteinsynthese in etwa 5% der Fälle eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters erfolgen, wodurch das Stop-Kodon des *gag*-ORF überlesen wird und die Pol-Proteine synthetisiert werden können. Die anderen viralen Gene werden von verschiedenen Spleißvarianten der viralen mRNA translatiert. Das *env*-Gen, das für das Hüllprotein von HIV kodiert, wird von einer einfach gespleißten mRNA exprimiert. Das Hüllprotein wird als Vorläuferprotein synthetisiert und dann im Golgi-Apparat durch die zelluläre Protease Furin in das Oberflächen-Glykoprotein und das Transmembran-Glykoprotein gespalten. Die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu (nur bei HIV-1 vorhanden) und Vpx (nur bei HIV-2 vorhanden) werden ebenfalls von einfach gespleißten mRNAs translatiert. Nef wird dagegen genauso wie die regulatorischen Proteine Tat und Rev von mehrfach gespleißten mRNAs synthetisiert.



**Abb. 1.2** Genomorganisation von HIV-1 und HIV-2. Dargestellt ist die provirale DNA. Die Strukturgene *gag*, *pol* und *env* sind in Rot dargestellt, die regulatorischen (*tat* und *rev*) und akzessorischen Gene (*nef*, *vif*, *vpu*, *vpx* und *vpr*) in Grün (modifiziert nach *Fields Virology*, 1996).

### 1.1.3 Replikationszyklus von HIV

Abbildung 1.3 zeigt schematisch den Replikationszyklus von HIV in seiner Wirtszelle. HIV bindet über sein Hüllprotein an die zellulären Rezeptoren CD4 und CCR5 bzw. CXCR4 (1). Durch diese Interaktion wird die Fusion der viralen mit der zellulären Membran induziert (2), worauf das virale Kapsid in das Zytoplasma der Zelle gelangt. Dort zerfällt das Kapsid (*Uncoating*) (3) und es bildet sich ein Präintegrationskomplex (PIC, *preintegration complex*) aus, der aus viralen und zellulären Proteinen und der viralen RNA besteht. In diesem Komplex findet die reverse Transkription der viralen RNA in provirale DNA statt (4). Während oder nach *Uncoating* und reverser Transkription wird der PIC zum Zellkern transportiert, und durch die Kernporen aktiv importiert (5). Die provirale DNA wird anschließend ins Wirtsgenom integriert (6), wo sie transkribiert wird (7). Die viralen RNA-Transkripte werden unter aktiver Beteiligung von Rev vom Kern ins Zytoplasma transportiert (8), wo sie in Proteine translatiert werden (9). Um neue Viruspartikel zu bilden, assemblieren die viralen Proteine an der

Zytoplasmamembran (10) und werden durch Knospung zunächst als unreife Partikel freigesetzt (11). Die Virusreifung wird durch die virale Protease induziert, die die Vorläuferproteine der viralen Strukturproteine und Enzyme in die einzelnen Proteine spaltet, die sich dann zu reifen Partikeln zusammenlagern können.

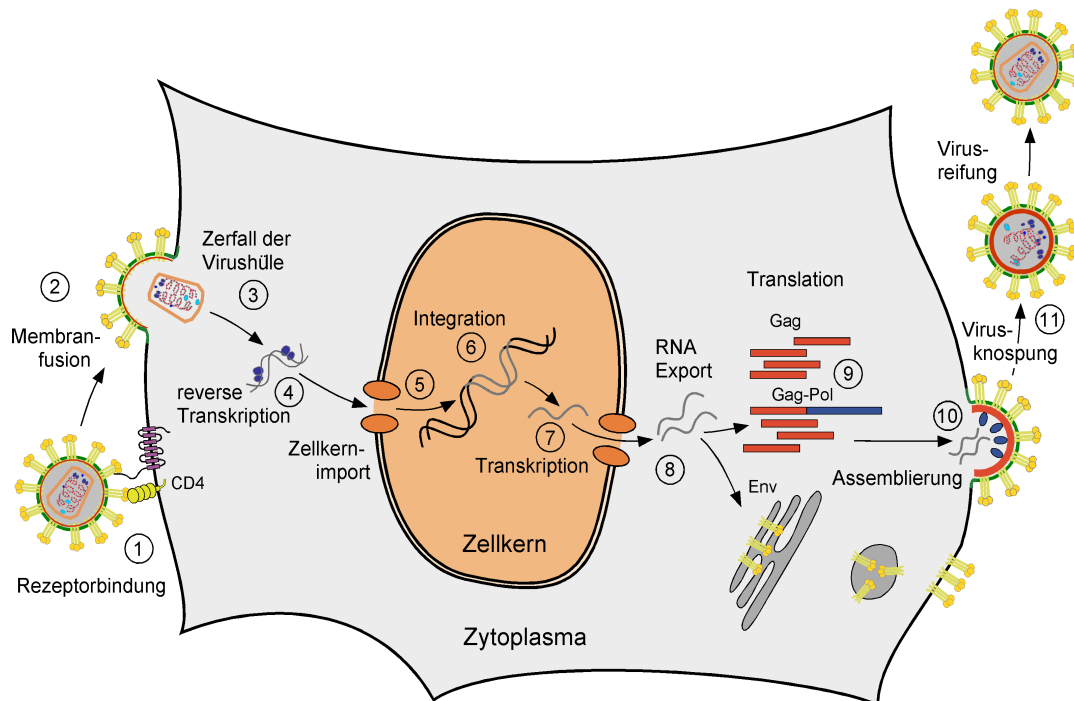


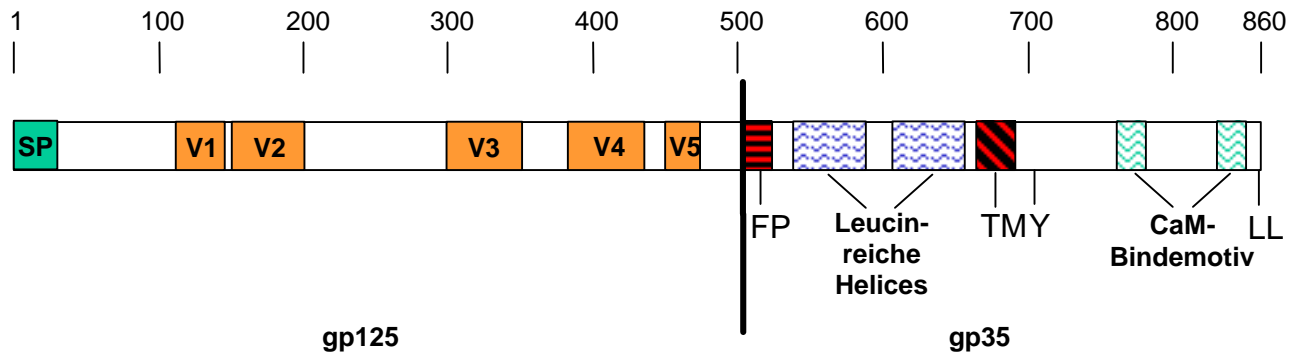
Abb. 1.3 Replikationszyklus von HIV (Fackler und Geyer, 2002).

## 1.2 Das HIV Hüllprotein

### 1.2.1 Struktur und Aufbau

Die Hüllproteine von HIV-1 und HIV-2 (*Envelope*) sind integrale Typ I Membranproteine und werden als 160 bzw. 140 kDa große Vorläuferproteine (gp160 bzw. gp140) am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert (Abb. 1.4). Nach der kotranslationalen Translokation in das Lumen des rERs finden an den Vorläuferproteinen verschiedene Modifikationen wie z.B. Glykosylierung, Disulfid-Brückenbildung und Oligomerisierung statt (Earl et al., 1991). Die gefalteten, oligomeren Vorläuferproteine werden in den Golgi-Komplex transportiert. Dort werden sie in die Oberflächen-Glykoproteine gp120 (HIV-1) bzw. gp125 (HIV-2) und die Transmembran-Glykoproteine gp41 (HIV-1) bzw. gp35 (HIV-2) gespalten (Freed et al., 1989; McCune et al., 1988). Die Spaltung wird von der zellulären Protease Furin oder von verwandten Proteasen durchgeführt (Hallenberger et al., 1997). Die Oberflächen- und Transmembran-Glykoproteine bleiben nicht-kovalent miteinander verbunden und sind über die Transmembrandomäne von gp41 bzw. gp35 in der Zellmembran verankert. Die

prozessierten *Envelope*-Proteine werden als Trimere an die Plasmamembran transportiert, wo sie in knospende Viren eingebaut werden können. Jede *Envelope*-Einheit in der Virusmembran ist ein Oligomer aus drei gp120/gp41- bzw. gp125/gp35-Monomeren (Center et al., 2001; Chan et al., 1997; Lu et al., 1995; Weissenhorn et al., 1997).

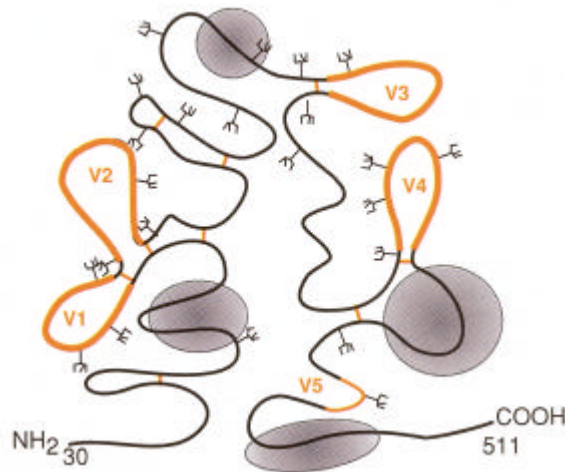


**Abb. 1.4** Schematische Darstellung HIV-2 Hüllproteins als Vorläuferprotein. SP = Signalpeptid; V1-V5 = Variable Schleifen 1-5; FP = Fusionspeptid; TM = Transmembrandomäne; Y = Tyrosin-basierendes Endozytose-Motiv; CaM = Calmodulin; LL = Dileucin-Motiv

Sowohl das Oberflächen-Glykoprotein von HIV-1 als auch von HIV-2 enthält fünf variable Regionen (V1-V5), die zwischen konservierten Domänen liegen (Myers et al., 1996; Abb.1.4). Die variablen Regionen V1-V4 bilden exponierte Schleifen, die an ihrer Basis durch Disulfid-Bindungen stabilisiert werden (Leonard et al., 1990; Abb. 1.5). Der gp120-Kern (ohne variable Schleifen) besteht aus einer inneren und äußeren Domäne und einem sogenannten „*Bridging Sheet*“. Alle drei Strukturelemente tragen zur CD4- und Korezeptor-Bindung bei (Kwong et al., 1998). Ein großer Teil der zugänglichen Oberfläche von gp120 im Trimer besteht aus stark glykosylierten Kern- und variablen Schleifen-Strukturen, die die Rezeptorbindebereiche umgeben (Wyatt et al., 1998). Dadurch sind diese vor Angriffen des Immunsystems geschützt. Bereiche im HIV-1 gp120, die an der Bindung von CD4 und des Korezeptor beteiligt sind, sind in den *Envelope*-Proteinen von HIV-2 und SIV hoch konserviert (Kwong et al., 1998; Rizzuto et al., 1998), was bedeutet, dass diese Proteine wahrscheinlich ähnliche Strukturen besitzen.

Die Transmembran-Glykoproteine von HIV und SIV bestehen aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer C-terminalen intrazellulären Domäne (Abb. 1.4). Die extrazelluläre Domäne enthält am N-Terminus ein hydrophobes, Glycin-reiches Fusionspeptid, das essentiell für den Fusionsprozess ist. Weiterhin beinhaltet die extrazelluläre Domäne zwei hydrophobe Leucin-reiche Bereiche. Diese Sequenzmotive sind charakteristisch für die Ausbildung helikaler Strukturen und spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Fusion. Die intrazelluläre Domäne des Transmembran-Glykoproteins enthält Motive für Endozytose und basolaterale Sortierung und zwei amphipatische, helikale Regionen. Verschiedene Studien zeigen, dass die Strukturen der Transmembran-Glykoproteine von HIV-1 und SIV sehr ähnlich sind (Blacklow et al., 1995; Chan et al.,

1997; Lu et al., 1995; Weissenhorn et al., 1997; Yang et al., 1999), was es wahrscheinlich macht, dass das Transmembran-Glykoprotein von HIV-2 diesen beiden Proteinen ebenfalls sehr ähnlich ist.



**Abb. 1.5** Schematische Darstellung der Faltung des HIV-Oberflächen-Glykoproteins. Die verästelten Strukturen bezeichnen N-verknüpfte Glykosylierungen. Die grauen Bereiche bezeichnen Regionen, die an der CD4-Bindung beteiligt sind. NH<sub>2</sub> = Aminoterminus; COOH = Carboxyterminus (Coffin et al. (eds.), *Retroviruses*, CSHL Press, 1997).

## 1.2.2 Interaktion mit dem Rezeptor CD4

Das *Envelope*-Protein von HIV ist hauptsächlich für den Eintritt des Virus in die Zelle verantwortlich. Der erste Schritt zur Einleitung der Fusion der viralen mit der zellulären Membran ist die Bindung an CD4. CD4 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und hat vier extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen (D1 bis D4), eine Transmembranregion und eine zytoplasmatische Domäne, die mit der Kinase p56<sup>lck</sup> assoziiert ist. CD4 wird hauptsächlich auf T-Helfer-Zellen exprimiert und interagiert mit MHC-Klasse II-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen. Dabei bildet es einen Teil des T-Zellrezeptor-Komplexes und spielt eine Rolle bei der Antigen-Erkennung. CD4 wird auch auf Zellen wie z.B. Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, die alle von HIV infiziert werden können. Die natürliche Rolle von CD4 auf diesen Zellen ist unklar.

Die Bereiche in gp120, die mit CD4 interagieren, stammen von mehreren diskontinuierlichen Sequenzen. Die Bindung an CD4 induziert Konformationsänderungen im Kern von gp120 und die Verschiebung der variablen Schleifen. Dies hat die Bildung und/oder Hervorhebung einer hochkonservierten Domäne in der „*Bridging Sheet*“-Region von gp120 zur Folge, die wichtig für die Korezeptorbindung ist (Rizzuto et al., 1998). Viele Bereiche in dieser Region sind zwischen HIV-1, HIV-2 und SIV konserviert. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die CD4-Bindung im HIV-2 *Envelope* ähnliche Konformationsänderungen auslöst. CD4 ist sowohl für HIV-1 als auch für HIV-2 der Primärrezeptor. Dennoch konnten einige HIV-Isolate beschrieben werden, die Zellen unabhängig von CD4 infizieren können (Reeves et al., 1999).



### 1.2.3 Interaktion mit den Korezeptoren

Die hochkonservierte Korezeptorbindestelle, die durch die Interaktion von gp120 mit CD4 freigelegt wird, liegt an der Basis zwischen den variablen Schleifen V1/V2 und V3 (Kwong et al., 1998; Rizzuto et al., 1998). Sowohl diese Bindestelle, als auch die variablen Schleifen V1/V2 und V3 tragen zur Wahl des Korezeptors bei (Choe et al., 1996; Bieniasz und Cullen 1998; Cho et al., 1998; Hoffman und Doms 1998; Hoffman et al., 1998). Die wichtigsten Korezeptoren für die HIV-Infektion sind CCR5 und CXCR4. CCR5 und CXCR4 gehören zu den Chemokin-Rezeptoren. Sie besitzen sieben Transmembrandomänen und sind G-Protein-gekoppelt. Diese Rezeptoren spielen eine Rolle bei der Chemotaxis von hämatopoetischen Zellen entlang spezifischer Chemokin-Gradienten. Durch die Bindung von gp120 an den Korezeptor werden Konformationsänderungen in gp120 ausgelöst, die zu Umlagerungen in gp41 führen, die schließlich den Fusionsprozess einleiten.

Durch die Benutzung eines bestimmten Korezeptors wird der Tropismus des Virus bestimmt. HIV kann entweder CCR5 oder CXCR4 oder beide als Korezeptoren für den Eintritt in CD4 positive Zellen benutzen (Bron et al., 1997; Deng et al., 1997; Hill et al., 1997; Pleskoff et al., 1997; Rucker et al., 1997; Sol et al., 1997). Alle HIV-Stämme können primäre CD4-positive T-Zellen infizieren, jedoch können sie sich im Tropismus für Makrophagen und T-Zelllinien unterscheiden und werden aufgrund dessen in drei Gruppen unterteilt. Viren, die CXCR4 benutzen, können CD4-positive T-Zelllinien infizieren, induzieren Synzytien und replizieren relativ schnell und zu hohen Titern. Sie werden X4-trop genannt. Viren, die CCR5 als Korezeptor benutzen, können Makrophagen infizieren, induzieren keine Synzytien in infizierten primären T-Zellen und replizieren langsam und zu relativ niedrigen Titern. Diese Viren werden als R5-trop bezeichnet. Viren der dritten Gruppe können sowohl Makrophagen als auch T-Zelllinien infizieren und werden deshalb als dualtrop bezeichnet. Sie können sowohl CCR5 als auch CXCR4 als Korezeptor benutzen. Eine Ausnahme bilden primäre Synzytium-induzierende Isolate, die Makrophagen über CXCR4 infizieren können (Simmons et al., 1998). Somit wird der Tropismus von HIV zu einem großen Teil durch die Benutzung der Korezeptoren bestimmt, obwohl eine Reihe anderer Faktoren wie z.B. die Rezeptordichte und -konformation und Ereignisse nach dem Eintritt des Virus in die Zelle die Virusinfektion beeinflussen können.

Viele HIV-2 Stämme können zusätzlich noch andere Korezeptoren für *in vitro* Infektionen benutzen, teilweise genauso effizient wie CCR5 und CXCR4 (Guillon et al., 1998; McKnight et al., 1998; Owen et al., 1998; Reeves et al., 1999; Unutmaz et al., 1998). CCR1, CCR4, CCR2b, CCR3 und CCR8 sind einige dieser alternativen Korezeptoren von HIV-2, aber es ist nicht klar, ob die Benutzung dieser Chemokin-Rezeptoren *in vivo* relevant ist. Auch für HIV-1 konnte die Benutzung alternativer Korezeptoren, wie z.B. CXCR6/Bonzo oder CCR8 *in vitro* beobachtet werden (Sharron et al., 2000; Lee et al., 2000). Aber auch hier existiert kein Hinweis darauf, dass diese Rezeptoren für die Replikation *in vivo* benutzt werden.

## 1.2.4 CD4-unabhängige Virusinfektion

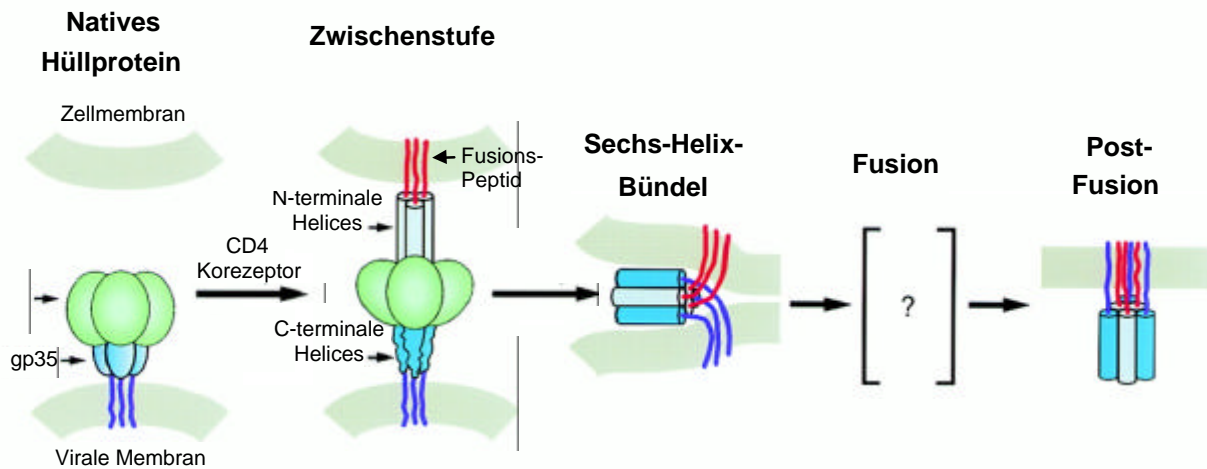
Einer der größten Unterschiede zwischen HIV-1 und HIV-2 ist, dass die HIV-1 Infektion gewöhnlich sowohl CD4 als auch einen Korezeptor benötigt, während viele primäre HIV-2 Isolate einen gewissen Grad an CD4-Unabhängigkeit aufweisen (Reeves et al., 1999). Sogar HIV-2 Stämme, die typischerweise CD4 für die Infektion benötigen, können durch Vorbehandlung mit löslichem CD4 dazu gebracht werden, CD4-negative Zellen zu infizieren (Clapham et al., 1992; Reeves et al., 1999). Zusätzlich können CD4-unabhängige HIV-2 Varianten *in vitro* spontan in chronisch infizierten T-Zelllinien entstehen (Clapham et al., 1992; Endres et al., 1996). Diese Viren benutzen typischerweise CXCR4 für die Infektion von CD4-negativen Zellen, können aber auch andere Rezeptoren wie z.B. CCR3, CCR5 und CCR8 benutzen (Endres et al., 1996; Lin et al., 2001; Reeves et al., 1997; Simmons et al., 2000). Dagegen konnten bisher nur wenige CD4-unabhängige HIV-1 Stämme *in vitro* selektiert werden (Dumonceaux et al., 1998; Kolchinsky et al., 1999; LaBranche et al., 1999).

Die für die CD4-Unabhängigkeit verantwortlichen Determinanten im *Envelope* eines HIV-2 Stammes (ROD-B) wurden detailliert untersucht (Lin et al., 2001; Reeves und Schulz, 1997). Nur insgesamt vier Mutationen werden benötigt, um aus dem CD4-abhängigen HIV-2 ROD-A ein effizientes CD4-unabhängiges HIV-2 ROD-B zu gewinnen (Reeves und Schulz, 1997). Diese Mutationen erhöhen außerdem die Fusogenität des *Envelopes* und die Sensitivität des *Envelopes*, durch lösliches CD4 induzierte konformationelle Veränderungen einzugehen. Die CD4-Unabhängigkeit von HIV-1 Stämmen kann teilweise auf ähnliche Mutationen zurückgeführt werden (LaBranche et al., 1999). Die Tatsache, dass HIV-2 und SIV eher CD4-negative Zellen infizieren können als HIV-1, lässt vermuten, dass die Korezeptor-Bindestelle im HIV-2- bzw. SIV-*Envelope* zumindest zum Teil auch in der Abwesenheit von CD4 frei liegt, so dass ein direkter Kontakt mit dem Korezeptor ermöglicht wird. Dies erklärt auch die erhöhte Sensibilität dieser Viren gegenüber neutralisierenden Antikörpern (Puffer et al., 2002).

## 1.2.5 Fusionsprozess

Die Bindung von gp120 an den Korezeptor verursacht Konformationsänderungen im Transmembran-Glykoprotein gp41 bzw. gp35, die die Fusion der viralen mit der zellulären Membran zur Folge haben (Abb. 1.6). Zunächst wird das hydrophobe aminoterminal Fusionspeptid der extrazellulären Domäne von gp41 bzw. gp35 exponiert und interagiert mit der Membran der Zielzelle. Die ganz in der Nähe des Fusionspeptides liegenden aminoterminalen Leucin- und Isoleucin-reichen Domänen der drei gp41-Untereinheiten liegen als Helices vor, die umeinander gewunden sind. Diese *Coiled Coil*-Struktur enthält hydrophobe Taschen, in welche sich die carboxyterminalen Leucin-reichen Domänen der drei gp41 Untereinheit, die ebenfalls als *Coiled Coil*-Struktur arrangiert sind, antiparallel einpassen. Somit wird ein „Sechs-Helix-Bündel“ gebildet, wodurch sich die virale und zelluläre Membran aneinander annähern. Die Veränderung der freien Energie, die bei diesem Prozess induziert wird, reicht aus, um eine Fusionspore zu bilden (Melikyan et al., 2000). Die Fusion ist ein kooperativer Prozess und man vermutet, dass vier bis sechs CCR5 Rezeptoren (Kuhmann et al., 2000), viele CD4-Moleküle (Layne

et al., 1990) und drei bis sechs *Envelope*-Trimere benötigt werden, um eine Fusionspore bilden zu können.



**Abb. 1.6** Modell der Membran-Fusion von HIV, modifiziert nach Chan und Kim (1998).

## 1.2.6 Funktionen der zytoplasmatischen Domäne

Die intrazelluläre Domäne des *Envelopes* ist bei HIV bzw. bei Lentiviren im Vergleich zu anderen Retroviren ungewöhnlich lang und hoch konserviert, was auf eine wichtige Funktion schließen lässt. Tatsächlich enthält sie mehrere Motive, die Hinweise auf ihre Funktion liefern (Abb. 1.4). So konnten z.B. in HIV-1 zwei Motive identifiziert werden, die als Bindestellen für Clathrin-Adapter-Moleküle dienen. An dem Tyrosin-basierenden Internalisierungssignal Tyr712, das sich in der unmittelbaren Nähe der Transmembrandomäne befindet, bindet AP-2 (Berlioz-Torrent et al., 1999; Boge et al., 1998; Ohno et al., 1997). Es ist für die Internalisierung des *Envelopes* von der Plasmamembran zuständig. Für die Bindung von AP-1 ist ein C-terminales Dileucin-Motiv wichtig. AP-1 rekrutiert Membranproteine in Clathrin-umhüllte Vesikel, die sich vom Trans-Golgi Netzwerk und von endosomalen Kompartimenten abschnüren. Diese beiden Motive könnten somit dazu beitragen, die subzelluläre Lokalisation und die Menge an Hüllprotein auf der Zelloberfläche zu regulieren (Wyss et al., 2001).

Weiterhin befindet sich in der zytoplasmatischen Domäne des Hüllproteins ein Tyrosin-haltiges Sortierungsmotiv, das mit dem oben beschriebenen Endozytosemotiv überlappt. An dieses Motiv kann das Gag-Protein binden, wodurch die Zusammenlagerung (*Assembly*) von Gag in polarisierten Epithelzellen zur basolateralen Membran dirigiert wird (Lodge et al., 1994, 1997; Owens et al., 1991).

Für den Einbau des Hüllproteins in virale Partikel wird ebenfalls die Wichtigkeit von Interaktionen zwischen der zytoplasmatischen Domäne des Hüllproteins und dem Gag-Protein diskutiert. Für HIV-1 konnte gezeigt werden, dass durch Zerstörung des Bindemotivs im Matrix-Protein der Einbau von Hüllproteinen mit normal langen zytoplasmatischen Domänen inhibiert wird (Freed und Martin, 1996). Andererseits werden Hüllproteine mit einer verkürzten zytoplasmatischen Domäne jedoch effizient eingebaut. Außerdem können generell eine Reihe anderer viraler *Envelope*-Proteine und zellulärer

Glykoproteine in HIV-Partikel eingebaut, was die Notwendigkeit von *Envelope*-Gag-Interaktionen für den Einbau des HIV-Hüllproteins in Frage stellt.

Eine weitere Studie liefert Hinweise, dass die Interaktion von Gag mit der zytoplasmatischen Domäne des *Envelopes* einen Einfluss auf seine Fusions Eigenschaften hat. Murakami et al. (2004) postulieren ein Modell, demzufolge die Interaktion des Matrix-Proteins mit dem zytoplasmatischen Bereich des *Envelopes* im unreifen Virion die Fusionsaktivität des *Envelopes* blockiert. Erst durch Konformationsänderungen im Matrix-Protein, die bei der Reifung des Virus durch die Spaltung von Gag durch die Protease ausgelöst wird, wird die Matrix-*Envelope*-Interaktion inhibiert, und das *Envelope* wird fusionsaktiv. Durch diesen Mechanismus würden z.B. abortive Reinfektionen der Wirtszelle verhindert.

Am Carboxyterminus der zytoplasmatischen Domäne des *Envelopes* sind zwei hydrophobe helikale Bereiche zu finden. Diese positiv geladenen amphipatischen Helices binden Calmodulin und inhibieren Calmodulin-regulierte Proteine (Srinivas et al., 1993). Durch die Bindung von zellulärem Calmodulin könnte das *Envelope*-Protein bestimmte Calmodulin-regulierte zelluläre Funktionen beeinflussen und somit die Replikationseffizienz von HIV in diesen Zellen verbessern.

Eine besondere Eigenschaft des HIV-2 *Envelopes* ist, dass es zum Teil die Funktion von Vpu übernimmt. Vpu ist nur in HIV-1 und nicht in HIV-2 oder SIVmac zu finden und kann die Freisetzung von viralen Partikeln aus infizierten humanen Zelllinien erhöhen. Die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne von Vpu sind dabei essentiell für diese Funktion (Schubert et al. 1996). Das HIV-2 *Envelope*-Protein kann ähnlich wie Vpu in HIV-1 die Freisetzung von HIV-2 (und HIV-1) Partikeln erhöhen (Bour et al., 1996a und b). Die dafür verantwortliche Region ist die zytoplasmatische Domäne (Ritter et al., 1996).

Obwohl die lange zytoplasmatische Domäne des *Envelope*-Proteins hochkonserviert ist und auch mehrere Funktionen mit ihr assoziiert zu sein scheinen, ist ihre Rolle bzw. Notwendigkeit bei der Virusreplikation nicht klar. Gerade im Falle von HIV-2 werden immer wieder Stämme isoliert, die eine verkürzte zytoplasmatische Domäne haben, aber trotzdem replikationskompetent sind. Weiterhin kann für die *in vitro* Replikation von SIV auf die komplette zytoplasmatische Domäne verzichtet werden (Johnston et al., 1993; Spector et al., 1990; Zingler und Littman, 1993).

### **1.2.7 Rolle des Hüllproteins beim *Attachment***

Die Notwendigkeit der Bindung des *Envelopes* an CD4 und Korezeptor zur Einleitung der Fusion ist unbestritten. Doch sprechen einige Hinweise dafür, dass CD4 nicht (immer) den ersten Kontakt zwischen Virus und Zelle vermittelt. Zum einen gibt es die CD4-unabhängigen HIV-Stämme, zum anderen haben CD4-abhängige Primärisolate meist niedrige Affinitäten zu CD4. Außerdem besitzen einige Zielzellen der *in vivo* Infektion von HIV wie z.B. Makrophagen und dendritische Zellen nur geringe Mengen an CD4. In diesen Situationen könnte die Bindung (*Attachment*) von gp120 an andere zelluläre Moleküle dazu dienen, das Virus auf der Zelloberfläche zu konzentrieren und somit die Wahrscheinlichkeit der *Envelope*-Rezeptor-Interaktion erhöhen. Das Hüllprotein könnte über seine Zuckergruppen mit anderen Zuckern oder Lektin-ähnlichen Domänen in zellulären Rezeptoren, wie

z.B. dem Mannose-spezifischen Makrophagen-Endozytose-Rezeptor interagieren (Larkin et al., 1989). So gibt es eine Reihe von zellulären Molekülen, für die postuliert wurde, dass sie das *Attachment* von HIV an die Zelle vermitteln.

Das Protein DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*), das ein C-Typ Lektin ist und in bestimmten Populationen submukosaler dendritischer Zellen exprimiert wird (Geijtenbeek et al., 2000), hat die Fähigkeit gp120 mit hoher Affinität zu binden (Curtis et al., 1992). HIV-1 wird so an die Oberfläche von dendritischen Zellen gebunden. Diese werden nicht selbst infiziert, sondern präsentieren das Virus, nachdem sie in die Lymphknoten eingewandert sind, den dort anwesenden T-Zellen, die dann effizienter infiziert werden (Kwon et al., 2002). Somit wird die Ausbreitung der Virusinfektion von Schleimhäuten in lymphatische Organe erleichtert. Für HIV-2 und SIV konnten ähnliche Daten gewonnen werden (Ignatius et al., 1998; Pohlmann et al., 2001a). Ein mit DC-SIGN nah verwandter Rezeptor DC-SIGNR wird auf Endothelzellen exprimiert und bindet HIV in ähnlicher Weise (Pohlmann et al., 2001b).

gp120 bindet auch das Glykolipid Gal-C und sein sulfatiertes Derivat Sulphatide (Fantini et al., 1993; Harouse et al., 1991). Diese Moleküle werden in Neuronen und Gliazellen im Gehirn (Harouse et al., 1991), auf Colon-Epithelzelllinien (Fantini et al., 1993) und auf Makrophagen exprimiert (Seddiki et al., 1994). Gal-C bindet gp120 mit hoher Affinität und unterstützt die ineffiziente Infektion bestimmter CD4-unabhängiger HIV-1 Stämme (Delezay et al., 1997). Da die Infektion trotz Gal-C immer noch sehr ineffizient ist, bleibt die physiologische Relevanz dieses Moleküls als Rezeptor unklar.

Zahlreiche Studien zeigen, dass Heparinsulfat-Proteoglykane (HSPGs) HIV binden können, und dass diese eine Rolle bei Bindung und Eintritt des Virus in die Zelle spielen könnten (Mondor et al., 1998; Patel et al., 1993; Rider et al., 1994; Roderiquez et al., 1995). HIV-1-Virionen können z.B. über die Interaktion von gp120 mit dem Glykosaminoglykan (GAG) Heparansulfat an HeLa-Zellen binden (Mondor et al., 1998). Dies gilt für X4- und R5X4-trope Viren, ist aber weniger effizient für R5-trope Viren, denn die Interaktion wird hauptsächlich durch den positiv geladenen V3-Bereich der CXCR4-spezifischen *Envelopes* und die negativen Sulfatgruppen auf Glykosaminoglykanen (GAGs) vermittelt (Moulard et al., 2000). Die Rolle von HSPGs beim *Attachment* scheint also Isolat-spezifisch zu sein. Außerdem besitzen Makrophagen als wichtige Zielzellen der HIV-Infektion nur sehr wenig HSPGs auf ihrer Oberfläche. Dies stellt die Relevanz der HSPGs bei der *in vivo* Infektion in Frage.

Auch die Interaktion von gp120 mit Glykosphingolipiden (GSL) in der zellulären Membran scheint eine Rolle beim Eintritt des Virus in die Zelle zu spielen. Die Inhibierung der GSL-Biosynthese beeinträchtigt die HIV-1 *Envelope*-vermittelte Zell-Zell-Fusion (Puri et al., 1998a). Durch Hinzufügen von GSLs kann die Fusion wieder ermöglicht werden (Puri et al., 1998b). Hammache et al. (1999) konnten außerdem zeigen, dass gp120 nach der Interaktion mit CD4 mit den GSLs Gb3 (Globotriaosylceramid) und GM3 (Monosialogangliosid) interagiert. Es wird daher vermutet, dass GSL-Microdomänen in der zellulären Membran bevorzugte Stellen der Fusion sind (Hammache et al., 1999; Puri et al., 1999; Hug et al., 2000). Dies geht mit Beobachtungen weiterer Arbeitsgruppen einher, die zeigen, dass die Fusion von HIV-1 wahrscheinlich in Lipid Rafts stattfindet, die neben Cholesterol und Sphingomyelinen auch einen hohen Anteil an Glykosphingolipiden aufweisen. So findet wahrscheinlich die gp120-induzierte Zusammenlagerung von CD4 und Korezeptoren in Rafts statt (Manes et al., 2000; Popik et al., 2002; Viard et al., 2002). Durch die Interaktion von gp120 mit GSLs

könnte das Virus bevorzugt in Lipid Raft-Mikrodomänen der Zellmembran dirigiert werden. Dort würde das Hüllprotein die Konzentrierung und Zusammenlagerung von HIV-spezifischen Rezeptormolekülen initiieren, wodurch die Infektionseffizienz in Zellen, die wie Makrophagen relativ wenig Rezeptoren exprimieren, erhöht werden könnte.

## 1.2.8 Aktivierung von Signalkaskaden durch das Hüllprotein

Zahlreiche Studien haben untersucht, ob die Bindung von HIV an seine Rezeptoren CD4, CCR5 oder CXCR4 Signalkaskaden auslöst, die die Virusinfektion beeinflussen. Die Beobachtung, dass die Aktivierung von Signalkaskaden durch die natürlichen Liganden der Chemokinrezeptoren (RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und SDF-1) die HIV-Replikation in T-Zellen und Makrophagen beeinflussen kann, spricht dafür, dass das Virus selbst Signale auslösen könnte, um seine Replikation zu erleichtern (Cocchi et al., 1995; Kelly et al., 1998; Kinter et al., 1998). Die durch die Bindung von HIV induzierten Signale könnten an der Regulation von Zellfunktionen (z.B. Wachstum oder Differenzierung) beteiligt sein. Auch Modifikationen des Zytoskeletts könnten die Folge sein, die den Eintritt des Virus und die folgende Ausbreitung in der uninfizierten Zelle erleichtern (Bukrinskaya et al., 1998; Iyengar et al., 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des HIV-Hüllproteins an CD4 die Phosphorylierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie z.B. p56<sup>lck</sup> auslöst, die die Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase-Signalkaskaden stimulieren. Dadurch werden Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- $\kappa$ B aktiviert, was das Fortschreiten des Zellzyklus und damit auch die Virusproduktion stimuliert (Briand et al., 1997; Briant et al., 1998; Popik und Pitha, 1996; Popik et al., 1998). Obwohl viele dieser Studien in artifiziellen Systemen durchgeführt wurden, kann eine Bedeutung der Signalaktivierung durch die Bindung des Hüllproteins an CD4 für die *in vivo* Infektion nicht ausgeschlossen werden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Replikation von R5- und X4-tropem HIV-1 in ruhenden primären CD4-positiven T-Zellen die Aktivierung von MAPK (*mitogen activated protein kinase*) -Signalkaskaden benötigt (Popik und Pitha, 2000a).

Vor allem die Bedeutung der durch die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 ausgelösten Signalkaskaden wird kontrovers diskutiert. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Bindung des Hüllproteins an die Korezeptoren CCR5 oder CXCR4 G-Protein abhängige Signaltransduktionswege aktiviert, die zur Calcium-Mobilisierung, Aktivierung der Tyrosin-Kinase pyk2 und der Kinase FAK (*focal adhesion kinase*) und zu Zell-Chemotaxis führen (Cicala et al., 1999; Davis et al., 1997; Misse et al., 1999; Popik und Pitha, 2000b; Weissman et al., 1997). Eine Reihe von Studien gelangten jedoch zur Annahme, dass die von HIV initiierte Korezeptor-vermittelte Signalaktivierung in transformierten Zelllinien nicht für die HIV-Infektion nötig ist. So konnte gezeigt werden, dass die Blockade der CCR5-vermittelten Signalweiterleitung, etwa durch Blockierung der G $\alpha$ i-Untereinheit des G-Proteins durch Pertussis-Toxin oder durch gezielte Mutation der intrazellulären Domäne von CCR5, nicht die Fähigkeit von CCR5 beeinflusst, den Eintritt von R5-Viren in die Zelle zu vermitteln (Alkhatib et al., 1997; Aramori et al., 1997; Cocchi et al., 1996; Farzan et al., 1997; Gosling et al., 1997). Ähnliche Mutationen in CXCR4 konnten ebenfalls nicht die Korezeptorfunktion *in vitro* beeinträchtigen (Amara

et al., 1997; Lu et al., 1997; Tokunaga et al., 2001). Dennoch sprechen einige Beobachtungen dafür, dass die Korezeptor-vermittelte Signalaktivierung die HIV-Infektion in primären Zellen tatsächlich beeinflussen könnte. So konnte gezeigt werden, dass die Desensibilisierung von CCR5 durch z.B. Pertussis-Toxin den Eintritt von R5-tropen HIV-1 Isolaten in primäre, aktivierte T-Lymphozyten verhinderte, ohne dass die Expression von CCR5 und CD4 an der Zelloberfläche gestört wurde (Alfano et al., 1999; Guntermann et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von R5-tropen HIV-1 Viren in Makrophagen zu replizieren mit der Fähigkeit des Virus, durch CCR5 ein Signal auslösen zu können, korreliert. Dies führte zur Hypothese, dass die Korezeptoraktivierung den Verlauf der HIV-Replikation in diesen Zellen bestimmt (Arthos et al., 2000). Schließlich konnten Francois und Klotman (2003) zeigen, dass die Aktivität der PI3-Kinase für eine produktive Infektion von CD4-positiven T-Lymphozyten und Makrophagen benötigt wird. Die Aktivierung der PI3-Kinase konnte durch Blockierung der Chemokinrezeptoren teilweise verhindert werden, was für eine Rolle der Korezeptoren bei der Signalweiterleitung spricht. Dagegen konnten Amara et al. (2003) wiederum zeigen, dass die G-Protein-abhängige Signalaktivierung durch CCR5 nicht für eine effiziente Infektion von primären T-Lymphozyten und Makrophagen mit R5-tropen HIV-1 Isolaten benötigt wird.

Grundsätzlich ist es möglich, dass jedes Rezeptormolekül an der Oberfläche, mit dem HIV interagiert, Signale auslösen könnte, die die Virusinfektion beeinflussen. So ist z.B. zwar die Rolle von HSPGs bei der Signalaktivierung durch HIV unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Bindung von RANTES an Glykosaminoglykane Tyrosin-Kinase abhängige Signalkaskaden aktiviert werden (Gordon et al., 1999; Trkola et al., 1999). So werden z.B. verschiedene Kinasen der src-Familie, p125-FAK und Mitglieder der p44/p42 MAPK-Familie aktiviert (Chang et al., 2002). Auf diese Weise kann RANTES die Replikation von X4-Viren verstärken (Schmidtmayerova et al., 1996; Dolei et al., 1998; Kinter et al., 1998). Deshalb erscheint es auch wahrscheinlich, dass HIV selbst die Signaltransduktionswege verschiedener Rezeptormoleküle induzieren und für seine Zwecke ausnutzen könnte.

### 1.2.9 Einfluss des Hüllproteins auf Ereignisse nach der Fusion

Das Schicksal von gp120 nach der Aktivierung von gp41 zur Einleitung der Fusion ist ungewiss. So ist z.B. nicht klar, ob gp120 bei der Bildung eines Rings aus *Envelope*-Trimeren um die Fusionspore mitwirkt, oder ob das *Envelope* noch eine Rolle bei Ereignissen direkt nach der Fusion spielt. Wie bereits beschrieben könnten durch die Interaktion des Hüllproteins mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche Signalkaskaden ausgelöst werden, die Vorgänge innerhalb der Zelle beeinflussen. Andererseits gibt es einige Studien, die zeigen konnten, dass die Interaktion des Hüllproteins mit seinem Korezeptor ebenfalls Einfluss auf die Replikation des Virus nach der Fusion in der Zelle hat. Chackerian et al. (1997) konnten beobachten, dass eine Phase der HIV-Replikation nach dem Eintritt in die Zelle dadurch beeinflusst wird, welchen Korezeptor das Virus zur Fusion mit der Zelle benutzt hat. HIV-1 kann in Makaken-Zellen, die humanes CD4-exprimieren, zwar eintreten, aber keine produktive Infektion etablieren. Die Blockierung der Replikation findet dabei vor oder nach der reversen Transkription und vor der Translokation des Präintegrationskomplexes (PIC) in den Kern

statt. Interessant ist, dass die Blockierung der Replikation durch die Expression eines humanen Allels des Korezeptors in diesen Zellen aufgehoben werden kann. Das bedeutet, dass HIV-1 den entsprechenden Makaken-Korezeptor zum Eintritt in die Zelle benutzen kann, dies aber zur Blockierung der Replikation nach dem Eintritt des Virus in die Zelle führt. Das heißt, dass das Hüllprotein durch die Interaktion mit dem Korezeptor das Schicksal des Virus nach dem Eintritt in die Zelle beeinflusst. Dies geschieht möglicherweise, indem die verschiedenen Korezeptoren das Virus auf unterschiedlichen Routen in die Zelle schleusen, die in einem Fall die Virus-Replikation begünstigen, im anderen Fall blockieren.

Schmidtmayerova et al. (1998) gelangten durch Untersuchung der Restriktion von X4-tropen Viren in Makrophagen zu ähnlichen Erkenntnissen. X4-trope Viren können gewöhnlich in Makrophagen nicht replizieren. Dieser Tropismus wird durch das Hüllprotein bestimmt (vgl. Kapitel 1.2.3). Dennoch konnten sie zeigen, dass diese X4-tropen Viren effizient in Makrophagen eintreten und dabei die Rezeptoren CD4 und CXCR4 benutzen. Die Blockierung der Replikation erfolgt erst nach der reversen Transkription beim Import des PICs in den Kern. Dies bedeutet, dass durch eine Eigenschaft des Hüllproteins (hier X4-Tropismus) das Schicksal des PICs in der Zelle bestimmt wird. Da das Hüllprotein aber nicht ein Teil des PICs ist, muss das Schicksal des PICs in der Zelle schon an der Zelloberfläche durch die Interaktion des Hüllproteins mit dem Korezeptor bestimmt werden. Schmidtmayerova et al. (1998) vermuten, dass die Benutzung des CXCR4-Korezeptors in Makrophagen das Viruspartikel in ein intrazelluläres Kompartiment dirigiert, das den Import des Virus in den Kern nicht unterstützt.

Eine Studie mit SIV konnte ebenfalls eine Beeinflussung von Vorgängen innerhalb der Zelle durch Hüllprotein-Korezeptor-Interaktionen berichten. Die unterschiedliche Benutzung von CCR5 durch verschiedene SIV Stämme bestimmte das Schicksal der viralen Infektion von Makrophagen zu einem Zeitpunkt nach dem Eintritt des Virus in die Zelle (Edinger et al., 1997).

Somit häufen sich Hinweise, dass das Hüllprotein durch Interaktionen mit Rezeptoren an der Zelloberfläche die Virus-Replikation nach dem Eintritt in die Zelle beeinflussen kann. Die Untersuchung solcher Phänomene könnte helfen, die unmittelbaren Ereignisse nach der Fusion, wie *Uncoating*, Bildung und Transport des PICs zu erforschen, über die wenig bekannt ist (Dvorin und Malim, 2003).

### **1.3 Antivirale Strategien des Wirtsorganismus**

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten, d.h. sie sind auf eine Wirtszelle angewiesen, um sich replizieren zu können. Sie haben keinen eigenen Stoffwechsel, weshalb sie die Proteinsynthesemaschinerie der Wirtszelle benutzen müssen, um die Komponenten, aus denen sie aufgebaut sind, herstellen zu können. Um ihre Vermehrung gewährleisten zu können, bringen Viren die Erbinformation für ihre Strukturkomponenten, und je nachdem wie komplex sie sind, zusätzlich noch für regulatorische Proteine (z.B. Transaktivatoren) und Enzyme (z.B. Proteasen, Polymerasen) mit. So können Viren die zellulären Systeme für ihre eigenen Zwecke ausnutzen und im Extremfall so modulieren, dass die Zelle nur noch Viren produziert und ihre ursprünglichen Aufgaben nicht mehr



verrichtet. Die Effizienz einer Virus-Infektion bzw. der Tropismus des Virus wird somit hauptsächlich dadurch beeinflusst, ob das Virus fähig ist, die in einer Zelle gegebenen Mittel für seine Replikation ausnutzen zu können. Um sich gegen virale Infektionen zu schützen, haben die Wirtsorganismen jedoch im Laufe ihrer Koevolution mit den Viren eine Reihe von antiviralen Strategien entwickelt. Dazu gehört zum einen das nichtadaptive Immunsystem, das von Mono- und Granulozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen und löslichen Komponenten, wie den Akutphaseproteinen, Faktoren des Komplementsystems, Zytokinen und Interferonen gebildet wird, und eine erste unspezifische Abwehr gegen alle möglichen Eindringlinge inklusive Viren ermöglicht. Etwas später tritt dann das adaptive Immunsystem durch die Bildung von spezifisch gegen den Erreger gerichteten T- und B-Zellen in Aktion, die sogenannte zelluläre und humorale Immunantwort. So können Erreger und infizierte Zellen vom Immunsystem erkannt und vernichtet werden. Doch nicht nur der Organismus an sich, sondern auch jede einzelne Zelle hat Strategien zur Erkennung von viralen Infektionen entwickelt. In einigen Fällen beinhalten die antiviralen Aktionen ein drastisches Zurückstufen von Wirtszellfunktionen bis hin zum programmierten Zelltod (Apoptose). In anderen Fällen findet eine selektive Blockierung der viralen Replikation oder Genexpression statt. Dazu gehören z.B. Faktoren die durch Interferone induziert werden, wie die Doppelstrang-RNA-abhängige Protein Kinase PKR, welche die Translation in infizierten Zellen durch Phosphorylierung von eIF-2a (*eukaryotic initiation factor 2a*) inhibiert (Der et al., 1997), oder die oligoA Synthetasen, welche die Ribonuklease (RNase) L aktivieren, die dann mRNAs und ribosomale RNAs degradiert (Player et al., 1998; Kerr et al., 1978).

In letzter Zeit gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass Zellen auch sehr spezifisch wirkende, nicht-immunologische antivirale Aktivitäten entwickelt haben, um virale Infektionen kontrollieren zu können. Durch die konstitutive Expression von dominanten Restriktionsfaktoren, können gezielt virale Proteine und/oder Schritte der Replikation angegriffen und somit die Vermehrung eines bestimmten Virus inhibiert werden. Für Retroviren bzw. HIV-1 wurden bisher die zellulären Restriktionsfaktoren ZAP, APOBEC3G und Fv1, Ref1 und Lv1 beschrieben. Die Expression solcher Restriktionsfaktoren in einer bestimmten Zelle äußert sich darin, dass das betreffende Virus in dieser Zelle nicht, oder schlechter replizieren kann als in Zellen, die den Restriktionsfaktor nicht exprimieren. Die Erforschung von Restriktionen der Virusinfektion trägt dabei maßgeblich zur Aufklärung von Virus-Zell-Interaktionen bei und liefert letztendlich neue Angriffspunkte, die zur Entwicklung von zielgerichteten antiviralen Therapien benutzt werden können.

### 1.3.1 Retrovirale Restriktionsfaktoren

#### 1.3.1.1 ZAP

ZAP (*zinc-finger antiviral protein*) ist ein Faktor mit anti-retroviraler Funktion, der von Gao et al. (2002) aus einer Ratten-cDNA-Bibliothek isoliert werden konnte. Zellen, die dieses Protein exprimieren, sind gegen die Replikation von MLV (*murine leukemia virus*) resistent, was sich in einer dramatischen Reduktion der Menge an produzierten Nachkommen-Viren äußert. Bei sehr hohen MOIs (*multiplicity of infection*) kann die Restriktion überwunden werden, was vermuten lässt, dass die Blockierung der

Virusreplikation nicht absolut ist. ZAP inhibiert die Expression von retroviralen Genen. Es hat dabei keine offensichtlichen negative Effekte auf die Lebensfähigkeit der Zelle bzw. auf ihre Physiologie, denn es eliminiert spezifisch die zytoplasmatische Fraktion der viralen mRNA, ohne einen Effekt auf zelluläre mRNAs zu haben.

ZAP enthält eine Gruppe von vier potentiellen, ungewöhnlichen CCCH-Typ Zinkfinger-Motiven, die auch in einigen anderen RNA-Bindeproteinen gefunden werden konnten. Das RNA-Bindeproteine TTP (Tristetraprolin) bindet z.B. an AU-reiche Sequenzen im 3'UTR von TNF- $\alpha$  mRNA (Lai et al., 1999 und 2001) und rekrutiert das Exosom um die mRNA zu degradieren (Chen et al., 2001). Dies lässt vermuten, dass ZAP ebenfalls direkt mit der viralen mRNA interagiert und so ihre Degradation veranlasst. Weiterhin ist auch ungeklärt, ob ZAP noch andere Retroviren wie z.B. HIV blockieren kann.

### 1.3.1.2 APOBEC3G

Ein weiterer antiviraler Faktor, der spezifisch die Replikation von HIV-1 inhibiert, konnte mit Hilfe des Phänotyps von Vif-minus HIV-Partikeln identifiziert werden. Vif-minus Partikel können nicht in sogenannten nicht-permissiven Zellen wie z.B. H9-, CEM-Zelllinien und PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) replizieren. Vif-positive Viren können in diesen Zellen dagegen problemlos replizieren. In diesen nicht-permissiven Zellen wird der antivirale Faktor APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*) exprimiert, der spezifisch die Replikation von Vif-minus Viren inhibiert (Sheehy et al., 2002). APOBEC3G ist ein Enzym, das zur Familie der Cytidin-Deaminasen gehört. Es wird in beträchtlichen Mengen in Vif-minus Viren eingebaut. Wenn diese Viren neue Zellen infizieren, wird APOBEC3G aktiv und deaminiert zahlreiche Cytosin-Reste im ersten (minus-) DNA-Strang, während dieser von der reversen Transkriptase synthetisiert wird. APOBEC3G ist somit bei einzelsträngiger DNA aktiv und wandelt ca. 1%-2% aller Cytosin-Reste der viralen DNA in Uracil-Reste um. Eine Möglichkeit, wie die Virusreplikation durch diese Modifikationen beeinträchtigt werden könnte, ist, dass die virale DNA von der zellulären Uracil-DNA-Glykosidase, die Uracil-Reste in DNA entfernt, erkannt wird. Die Stellen, an denen die Uracil-Reste entfernt wurden, könnten dann von DNA-Reparatur-Enzymen erkannt werden, welche die Spaltung und Degradation der viralen DNA veranlassen könnten. Dieser Hypothese entsprechend ist die Menge an viraler DNA nach der Infektion mit Vif-minus Viren niedrig bzw. geht schnell nach ihrer Synthese verloren (Mangeat et al., 2003; Fouchier et al., 1996; Mariani et al., 2003). Zum anderen könnte, nachdem die virale DNA in das Wirtsgenom eingebaut worden ist, die starke C zu U Konversion im Minusstrang zu einer entsprechend massiven G zu A Hypermutation im Plusstrang führen. Das provirale Genom wäre so stark mutiert, dass es keine funktionalen viralen Proteine mehr kodieren kann (Harris et al., 2003; Lecossier et al., 2003; Mangeat et al., 2003; Mariani et al., 2003; Zhang et al., 2003).

Der Mechanismus, wie das virale Vif-Protein der antiviralen Aktivität von APOBEC3G entgegenwirkt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Vif kann APOBEC3G offensichtlich binden (Mariani et al., 2003). Es reduziert außerdem drastisch die Menge an APOBEC3G-Protein, die in die viralen Partikel eingebaut wird.

Das humane APOBEC3G inhibiert HIV-1 und SIV und ist auch bei den weiter verwandten Retroviren EIAV (*equine infectious anemia virus*) und MLV aktiv (Mangeat et al., 2003). Die APOBEC3G-Homologe von Mäusen, Chinesischen Hamstern und den meisten Primaten sind gegenüber HIV-1 Vif relativ resistent und können so sogar die Replikation von Vif-positiven (Wildtyp) HIV-1 Viren inhibieren. Dies lässt vermuten, dass Vif entstanden sein könnte, um den humanen Restriktionsfaktor APOBEC3G zu inhibieren und somit die Replikation von HIV-1 in Menschen und den nah verwandten Schimpansen zu erlauben.

### 1.3.1.3 Fv1, Lv1 und Ref1

Die Faktoren Fv1, Lv1 und Ref1 sind eine weitere Klasse zellulärer Inhibitoren, die fähig sind, die Infektion vieler verschiedener Retroviren zu blockieren, wobei die Existenz von Ref1 bisher nur postuliert aber noch nicht nachgewiesen wurde. Fv1, Lv1 und Ref1 zeichnen sich durch eine Reihe gemeinsamer Eigenschaften aus. Die Inhibition der Infektion ist bei einer niedrigen MOI am größten. Bei hohen MOIs ist die Infektion kooperativ. Das heißt, dass die Infektion eines normalerweise restringierten Virus durch die Anwesenheit weiterer restringierter Viruspartikel wesentlich erleichtert wird. Dies bedeutet, dass diese Restriktionsfaktoren abgesättigt werden können (Decleve et al., 1975; Duran-Troise et al., 1977; Tennant et al., 1979; Besnier et al., 2002; Cowan et al., 2002; Towers et al., 2002). Weiterhin greifen alle drei am Kapsid des in die Zelle eintretenden Virus an und blockieren die Virusreplikation zu einem Zeitpunkt vor (Lv1, Ref1) oder nach (Fv1) der reversen Transkription, bevor die Integration des Provirus in das Wirtszellgenom stattfindet (Jolicoeur und Baltimore, 1976; Pryciak und Varmus, 1992; Towers et al., 2000; Besnier et al., 2002; Cowan et al., 2002). Die Restriktion kann nicht durch die Pseudotypisierung der restringierten viralen Partikel mit dem Hüllprotein VSV-G (Vesikuläres Stomatitis Virus-Glykoprotein) aufgehoben werden, was bedeutet, dass sie vom Hüllprotein und von der Eintrittsrouten des Virus unabhängig ist (Hofmann et al., 1999). Über den Mechanismus der Restriktion ist ansonsten nichts bekannt.

Die Restriktionsfaktoren Fv1, Lv1 und Ref1 unterscheiden sich durch ihr Vorkommen in verschiedenen Zellen bzw. Spezies und teilweise auch durch ihre Spezifität für bestimmte Retroviren. Fv1 (*friend virus susceptibility factor 1*) wird in Mauszellen exprimiert und inhibiert deren Infektion durch verschiedene Stämme von MLV. Von Fv1 gibt es zwei Haupt-Allele, die Fv1<sup>n</sup> und Fv1<sup>b</sup> genannt werden. N-tropes MLV kann keine Zellen infizieren, die Fv1<sup>b</sup> exprimieren, und B-tropes MLV kann keine Zellen mit Fv1<sup>n</sup> infizieren (Odaka et al., 1965; Lilly et al., 1967; Hartley et al., 1970; Pincus et al., 1971). Zellen verschiedener Säuger-Spezies, wie z.B. von Kühen, Hunden, Schweinen, Hamstern und einige Primaten inklusive des Menschen können ebenfalls spezifisch die Restriktion von N-MLV inhibieren, weshalb sie mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Fv1-ähnlichen Restriktionsfaktor exprimieren, der Ref1 genannt wird (*restriction factor 1*) (Towers et al., 2000; Hatzioannou et al., 2003). Lv1 (*lentivirus susceptibility factor 1*) kommt in nicht-humanen Primatenzellen vor. Seine Existenz wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen postuliert, die zeigen konnten, dass die Resistenz von Primatenzelllinien gegenüber der HIV-1 Infektion ähnliche Eigenschaften hat wie die von Fv1-vermittelte MLV-Resistenz in Mauszelllinien (Cowan et al., 2002; Besnier et al., 2002; Münk et al.,

2002). Lv1 vermittelt außerdem Resistenz gegenüber N-MLV und weiteren Lentiviren, inklusive HIV-2 und SIVmac.

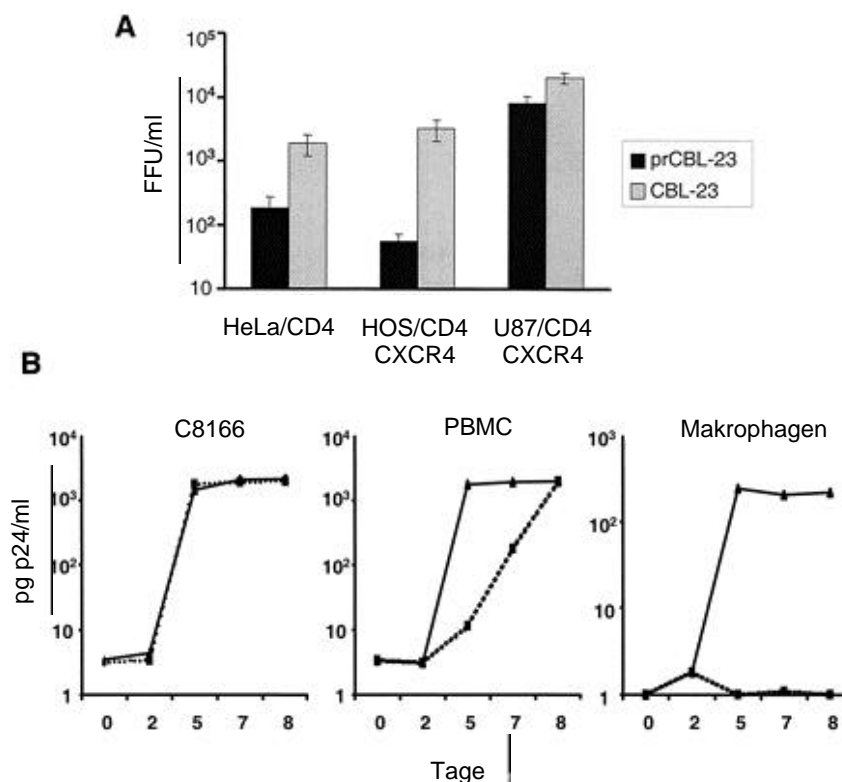
Von diesen drei Faktoren konnten bisher nur Fv1 und Lv1 identifiziert werden. Fv1 ist ein ca. 450 Aminosäuren langes Protein und besitzt ca. 60% Sequenzhomologie zur Kapsid-ähnlichen Domäne einer Familie endogener Retroviren (ERV-L = *endogenous retrovirus-like elements*). Für den Restriktionsfaktor Lv1 konnten Stremlau et al. (2004) das Kandidatengen TRIM5a identifizieren, dessen Genprodukt für die Restriktion von HIV-1 in Rhesus-Affen verantwortlich ist. Es bleibt abzuwarten, welches Gen für die Ref1-vermittelte Restriktion im Menschen identifiziert werden kann. In humanen Zellen konnte kein Gen mit starker Sequenzhomologie zu Fv1 gefunden werden, und das humane TRIM5a-Homolog zeigt keine antivirale Aktivität. Die verwandtschaftliche Beziehung zwischen Fv1, Lv1 und Ref1 konnte auch durch Infektionsstudien noch nicht eindeutig geklärt werden. Eine Möglichkeit wäre, dass es sich um verschiedene Restriktionsfaktoren handelt, die sich unabhängig voneinander in verschiedenen Spezies entwickelt haben. Es könnte aber auch sein, dass insbesondere Lv1 und Ref1 dieselben Faktoren sind, und dass die unterschiedlichen Restriktionseigenschaften der verschiedenen Primatenzellen einfach die Auseinanderentwicklungen aus einem einzigen Vorläufer-Gen widerspiegeln.

Die Tatsache, dass verschiedenste Primaten-Zelllinien Fv1-ähnliche Restriktionsfaktoren exprimieren, lässt vermuten, dass das Auftreten von retroviralen Restriktionsfaktoren in Primaten weitverbreitet und wahrscheinlich ein altes Phänomen ist.

### 1.4 Fragestellung

McKnight et al. (2001) konnten eine zuvor nicht beschriebene Restriktion der HIV-2 Replikation in bestimmten humanen Zelllinien beobachten. Durch Infektionsstudien mit dem primären HIV-2 Isolat prCBL23 und dem T-Zelllinien adaptierten Isolat CBL23 konnten sie zeigen, dass die Infektion von prCBL23 in HOS- und HeLa-Zelllinien und primären Makrophagen im Vergleich zur CBL23-Infektion restringiert ist. Im Gegensatz dazu können die beiden HIV-2 Isolate in U87/CD4/X4-Zellen, PBMCs und C8166-T-Zellen mit vergleichbarer Effizienz replizieren (Abbildung 1.7). Die Restriktion tritt somit nicht in allen humanen Zellen auf. Die Zell-Typen, welche die Restriktion von prCBL23 vermitteln, exprimieren die für prCBL23 und CBL23 nötigen Rezeptoren CD4 und CXCR4. Um auszuschließen, dass die Restriktion darauf beruht, dass prCBL23 CXCR4 nicht effizient als Korezeptor benutzen kann, wurde eine Reihe von HOS/CD4-Zellen getestet, die die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR3 und CCR4 exprimieren, die von prCBL23 als alternative Korezeptoren benutzt werden können. Diese HOS/CD4-Zellen vermitteln ebenfalls eine Restriktion gegenüber prCBL23, so dass eine ineffiziente Korezeptornutzung als Ursache der Restriktion ausgeschlossen werden kann. In Ergänzung dazu konnten McKnight et al. (2001) noch weitere Hinweise liefern, dass die Restriktion nicht auf einem ineffizienten Eintritt von prCBL23 in die restriktiven Zellen beruht. Zum einen können durch die Kokultur von prCBL23-infizierten C8166-Zellen mit den restriktiven HeLa/CD4- bzw. HOS/CD4/CXCR4-Zellen Synzytien induziert werden, was bedeutet, dass das Hüllprotein von prCBL23 Zell-Zell-Fusion vermitteln kann. Weiterhin können sowohl in restriktiven als auch in nicht-

restriktiven Zellen für prCBL23 und CBL23 ähnliche Mengen an vervollständigten viralen DNA-Transkripten nachgewiesen werden, was bedeutet, dass die reverse Transkription von prCBL23 nicht beeinträchtigt ist, und die Restriktion der Infektion nach der reversen Transkription stattfinden muss. Die Pseudotypisierung von prCBL23 mit dem Hüllprotein von VSV (VSV-G) kann die Restriktion umgehen, was bedeutet, dass die restriktiven Zellen die Replikation von prCBL23 nach seinem Eintritt in den Zellkern vollständig unterstützen. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Blockierung der Replikation von prCBL23 recht früh und vor seinem Import in den Kern stattfindet. HIV Partikel, die VSV-G tragen, treten über einen endozytotischen Weg in die Zelle ein, da dies die normale Route der VSV-Infektion ist (Aiken et al., 1997; Matlin et al., 1982). Somit schleust VSV-G das prCBL23-Partikel durch den endozytotischen Weg vermutlich um die Restriktion herum und ermöglicht prCBL23 den Eintritt in den Zellkern. McKnight et al. (2001) stellten deshalb die Hypothese auf, dass der Präintegrationskomplex (PIC) von prCBL23 in einem zellulären Kompartiment festsetzt, das seinen Transport zum Nukleus und somit auch die Integration des proviralen Genoms ins Wirtsgenom verhindert bzw. nicht unterstützt.



**Abb. 1.7** Infektionsstudien mit den HIV-2 Isolaten prCBL23 und CBL23 (McKnight et al., 2001).

Dass das Einschleusen des viralen Partikels in das richtige Kompartiment der Zelle ein kritischer Schritt in der Virusreplikation ist, wird auch durch andere Studien bestätigt. Nach der Fusion der viralen mit der zellulären Membran muss das virale Partikel z.B. aktiv durchs Zytoplasma transportiert werden, wozu Elemente des Zytoskeletts gebraucht werden (Bukrinskaya et al., 1998). Die Fähigkeit eines viralen Partikels, diese Transportmaschinerie ausnutzen zu können, könnte von seiner Eintritts-Route in die Zelle abhängen. Auch andere Studien liefern Hinweise, dass die Lieferung des viralen

Partikels in das richtige Kompartiment für die weiteren Replikationsschritte nach der Fusion kritisch ist, und dass dabei die Interaktion des Hüllproteins mit seinem Rezeptor eine wichtige Rolle spielen könnte (Chackerian et al., 1997; Schmidtmayerova et al., 1998; Edinger et a., 1997; siehe Kapitel 1.2.9).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die für die Restriktion des HIV-2 Isolates prCBL23 verantwortlichen viralen Determinanten zu bestimmen und den Mechanismus der Restriktion zu untersuchen. Dazu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

**(i) Wird die Restriktion des HIV-2 Isolates prCBL23 vom Hüllprotein vermittelt?**

Die Hüllproteine zweier molekularer Klone von prCBL23 und CBL23 sollten in Infektionsstudien mit pseudotypisierten HIV-2 Partikeln charakterisiert werden.

**(ii) In welcher Phase des Replikationszyklus findet die Restriktion der Infektion statt?**

Zum einen sollte die Effizienz des Eintritts der mit prCBL23-Env und CBL23-Env pseudotypisierten Partikel in die restriktiven Zellen und zum anderen ihre reverse Transkription in diesen Zellen untersucht werden.

**(iii) Wie vermittelt das Hüllprotein die Restriktion?**

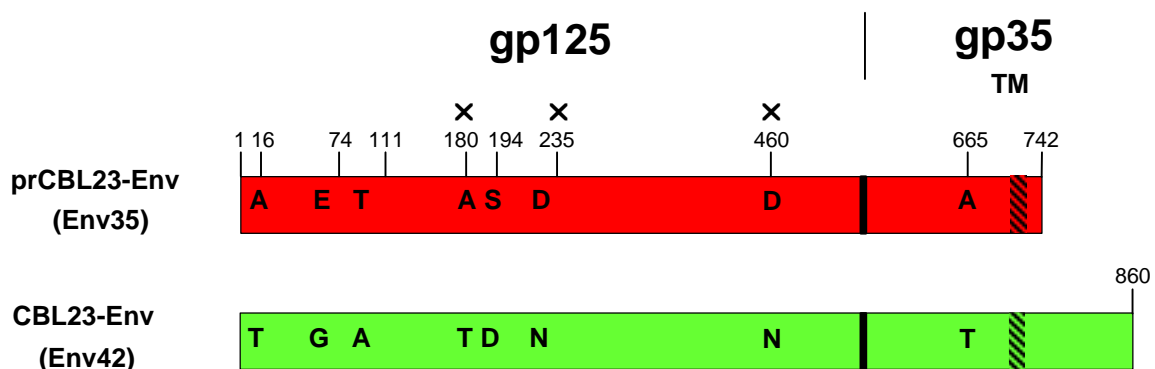
Durch verschiedene Ansätze sollte die Beteiligung von Hüllprotein-induzierten Signalkaskaden untersucht werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Charakterisierung der Hüllproteine prCBL23-Env und CBL23-Env

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die beschriebene Restriktion des HIV-2 Isolates prCBL23 im Vergleich zum Isolat CBL23 durch vorhandene Unterschiede in den Hüllproteinen prCBL23-Env und CBL23-Env vermittelt wird. McKnight et al. (2001) konnten in Infektionsstudien zeigen, dass das primäre Isolat prCBL23 in einigen humanen Zelllinien eine Restriktion der Infektion erfährt, während das T-Zell adaptierte CBL23 in diesen Zellen nicht restringiert ist. Während sich die Infektionseffizienzen der beiden Isolate in U87/CD4/X4-Zellen nicht wesentlich unterscheiden, ist die Infektionseffizienz von prCBL23 in HOS/CD4/CXCR4- (GHOST/X4-) Zellen und HeLa/CD4- (HeLaP4-) Zellen im Vergleich zu CBL23 signifikant reduziert (vgl. Abb. 1.7). Die Erforschung der viralen Determinanten dieser Restriktion ist ein wichtiger Schritt für die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus, der wiederum Einblicke in Virus-Zell-Interaktionen liefern könnte.

Die Sequenzierung der molekularen Klone von prCBL23 und CBL23 zeigte die Unterschiede zwischen den beiden Isolaten auf molekularer Ebene. Neben einer Deletion im *nef*-Gen von prCBL23 und verschiedenen, über das ganze Genom verteilten Nukleotidaustauschen, weisen auch die beiden Hüllproteine Sequenzunterschiede auf (Abbildung 2.1). Zunächst beinhaltet der Leserahmen von prCBL23-Env ein vorzeitiges Stop-Kodon, was die Expression eines verkürzten Transmembranproteins gp35 zur Folge hat. Die zytoplasmatische Domäne von prCBL23-Env ist nur 42 Aminosäuren lang, während die zytoplasmatische Domäne von CBL23-Env 160 Aminosäuren besitzt. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Hüllproteinsequenzen in 14 einzelnen Nukleotiden, wovon 8 die Aminosäuresequenz beeinflussen. 7 dieser Aminosäureunterschiede zwischen prCBL23-Env und CBL23-Env liegen in der Oberflächendomäne gp125, eine im extrazellulären Bereich von gp35. Drei dieser Aminosäureaustausche (Positionen 180, 235 und 460) zerstören potentielle Glykosylierungsmotive in prCBL23-Env (Abb. 2.1).

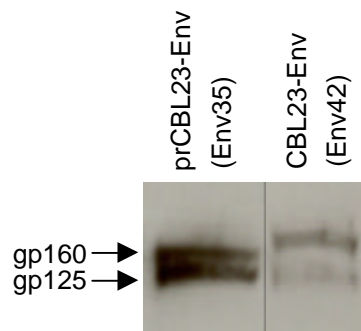


**Abb. 2.1** Schematische Darstellung der Hüllproteine prCBL23-Env und CBL23-Env in der unprozessierten Form. Großbuchstaben zeigen Unterschiede in den Aminosäuresequenzen (Ein-Buchstaben-Code) an den angegebenen Positionen auf. TM = Transmembrandomäne; X = Glykosylierungsmotive, die durch die Unterschiede in der Aminosäuresequenz beeinflusst werden.

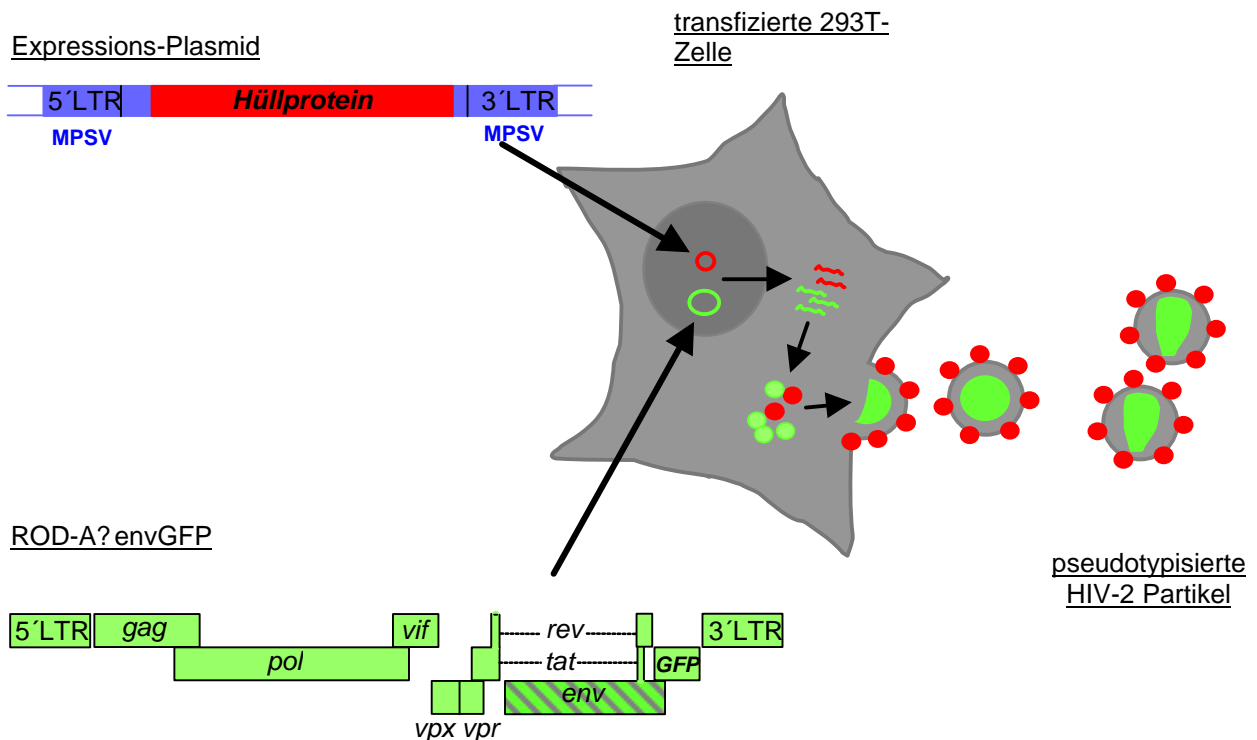
### 2.1.1 HIV-2 Partikel lassen sich mit Env35 und Env42 pseudotypisieren

Um die Bedeutung der oben beschriebenen Unterschiede zwischen prCBL23-Env (Env35) und CBL23-Env (Env42) für die Restriktion der Infektion beurteilen zu können, sollten die beiden Hüllproteine in Infektionsstudien charakterisiert werden. Dazu sollten HIV-Partikel hergestellt werden, die mit Env35 bzw. Env42 pseudotypisiert sind. Env35 und Env42 wurden zunächst in den Expressionsvektor pMP11 subkloniert. Die Expression der beiden Proteine wurde getestet, indem 293T-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und nach drei Tagen im ECL-Western Blot (anti HIV-2, Gemisch von Seren HIV-2-Infizierter Personen) analysiert wurden.

**A**



**B**



**Abb. 2.2 A** ECL-Western Blot (anti HIV-2) zur Kontrolle der Expression von prCBL23-Env und CBL23-Env in transfizierten 293T-Zellen. **B** Schematische Darstellung des Prinzips der Herstellung von pseudotypierten Partikeln. Erläuterung im Text.



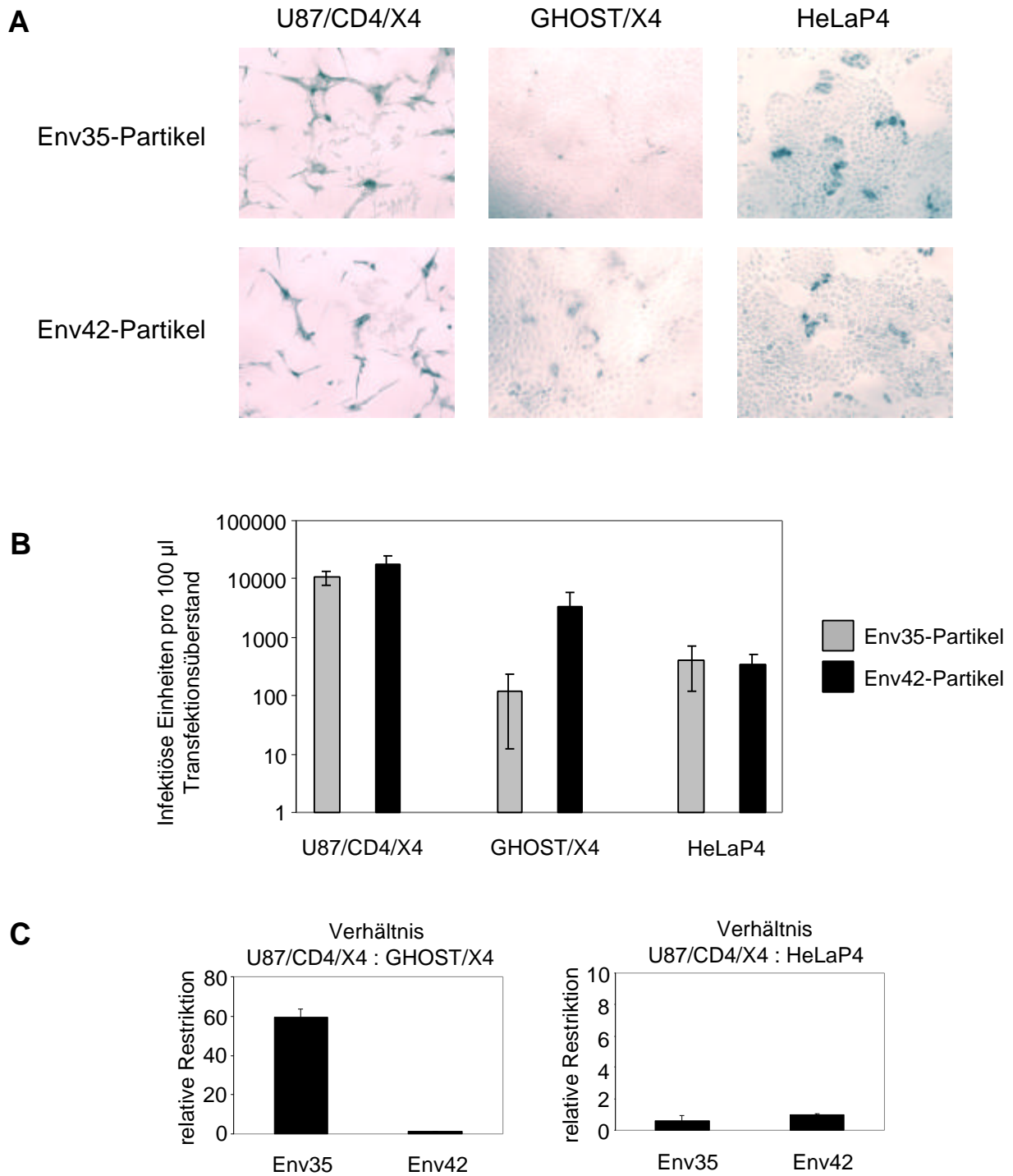
Abbildung 2.2A zeigt, dass beide Hüllproteine exprimiert werden. Das Vorläuferprotein (gp160) von Env35 läuft im SDS-Polyacrylamidgel aufgrund seiner verkürzten zytoplasmatischen Domäne etwas weiter als das Vorläuferprotein von Env42. Die gp125-Banden unterscheiden sich ebenfalls ein wenig in ihrer Laufhöhe, was durch eine unterschiedliche Glykosylierung der beiden Proteine erklärt werden könnte.

Zur Herstellung von pseudotypisierten HIV-Partikeln wurden  $3 \times 10^6$  293T-Zellen mit 3 µg des jeweiligen Hüllprotein-Expressionsplasmides und 3 µg des proviralen Plasmides ROD-A $\Delta$ envGFP kotransfiziert (Abb. 3.2B). ROD-A $\Delta$ envGFP stammt vom Plasmid ACR23 ab, welches das provirale Genom von ROD-A, einem Prototypen von HIV-2, enthält. Das provirale Plasmid kodiert dabei alle viralen Proteine, außer dem Hüllprotein, das vom entsprechenden Expressionsplasmid exprimiert wird, und dem Nef-Protein, dessen offener Leserahmen (ORF, *open reading frame*) größtenteils durch die kodierende Sequenz von ehGFP (*enhanced humanized green fluorescent protein*) ersetzt worden ist. Die so entstehenden viralen Partikel unterscheiden sich nur im Hüllprotein, abhängig davon, welches Expressionsplasmid kotransfiziert wurde. Dies hat den Vorteil, dass man die Eigenschaften der Hüllproteine in einem konstanten genetischen Hintergrund untersuchen kann, und alle Unterschiede in der Infektionseffizienz dieser Partikel direkt auf das Hüllprotein zurückführen kann.

Die auf diese Weise produzierten pseudotypisierten Partikel erreichten auf U87/CD4/X4-Zellen durchschnittlich Titer von  $1 \times 10^5$  infektiösen Einheiten pro ml Kotransfektionsüberstand.

### 2.1.2 Env35 vermittelt eine Restriktion der Infektion in GHOST/X4-Zellen

Um die Hüllproteine Env35 und Env42 charakterisieren und ihre Bedeutung für die von McKnight et al. (2001) beobachtete Restriktion untersuchen zu können, wurden folgende Infektionsstudien durchgeführt. U87/CD4/X4-, GHOST/X4- und HeLaP4-Zellen wurden mit den pseudotypisierten Env35- und Env42-Partikeln infiziert, indem die Zellen mit gleichen Mengen an Zellkulturüberstand aus den entsprechenden Kotransfektionen zur Herstellung dieser Partikel inkubiert wurden. Drei Tage später wurden die Zellen fixiert und mit einer Immunfärbung (Methodenteil) markiert. Zellen, die infiziert worden sind, exprimieren virale Proteine und werden durch die Inkubation mit HIV-2-Patientenserum (anti HIV-2) und durch die Verwendung eines an  $\beta$ -Galaktosidase gekoppelten Zweitantikörpers und X-Gal als Substrat blau gefärbt. Abbildung 2.3A zeigt Ausschnitte der mit Env35- und Env42-Partikeln infizierten U87/CD4/X4-, GHOST/X4- und HeLaP4-Zellkulturen. In Abbildung 2.3B sind die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Infektionen von U87/CD4/X4-, GHOST/X4- und HeLaP4-Zellen mit Env35- und Env42-Partikeln als Anzahl infektiöse Einheiten pro 100 µl Kotransfektionsüberstand dargestellt. Die viralen Partikel Env35 und Env42 infizieren die Referenzzelllinie U87/CD4/X4 mit etwa gleicher Effizienz (ca.  $10^4$  infizierte Zellen pro 100 µl Transfektionsüberstand). Im Falle der GHOST/X4-Zellen ist die Infektionseffizienz von Env35- und Env42-Partikeln signifikant unterschiedlich, entsprechend der für die beiden Isolate prCBL23 und CBL23 beobachteten Infektionseffizienzen (vgl. Abb. 1.7). Env35-Partikel sind mit ca.  $10^2$  infizierten GHOST/X4-Zellen pro 100 µl Transfektionsüberstand im Vergleich zu Env42-Partikeln mit ca.  $3 \times 10^3$  infizierten GHOST/X4-Zellen pro 100 µl Transfektionsüberstand mehr als eine logarithmische Einheit



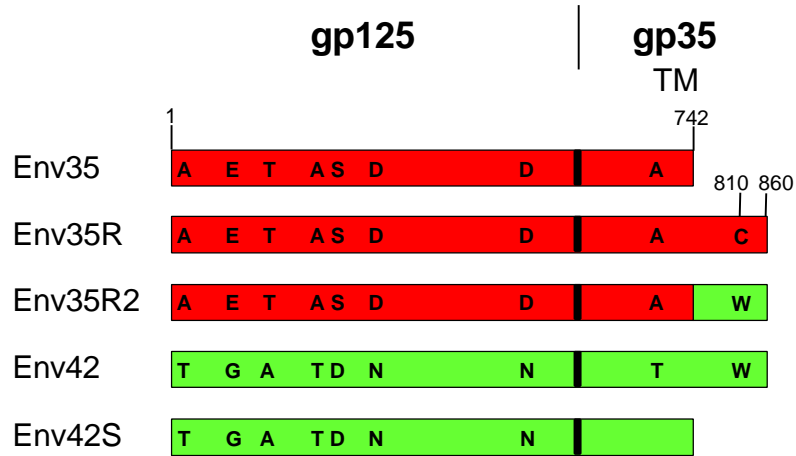
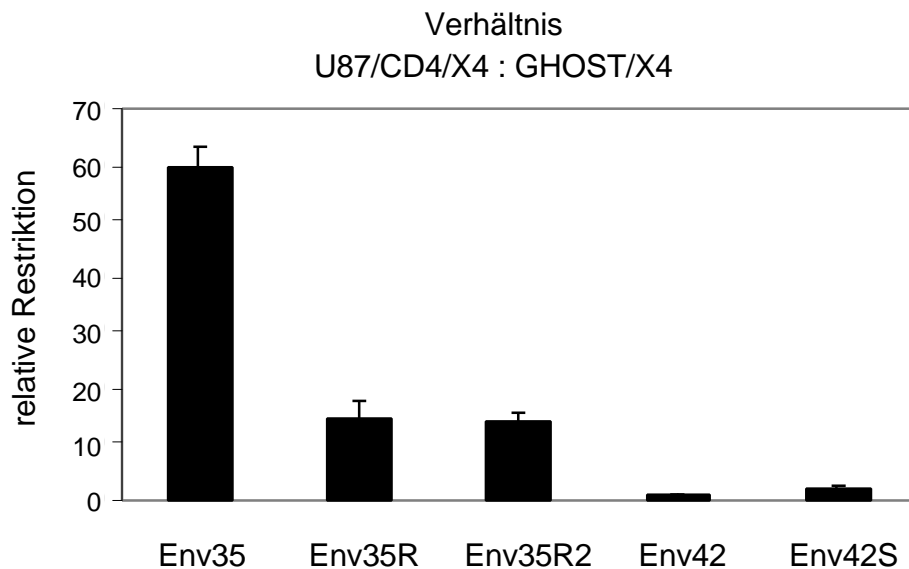
**Abb. 2.3** Infektionsstudien mit den pseudotypisierten Partikeln Env35 und Env42. **A** Beispiel einer Immunfärbung (anti HIV-2; anti hu-IgG-β-Gal) von U87/CD4/X4-, GHOST/X4- und HeLaP4-Zellen, die mit Env35- und Env42-Partikeln infiziert worden sind. Blaue Zellen sind von den entsprechenden viralen Partikeln erfolgreich infiziert worden. **B** Grafische Darstellung der Ergebnisse aus A. Die Balken zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Infektionen, dargestellt als Anzahl infektiöser Einheiten pro 100 µl Transfektionsüberstand. **C** Darstellung der Ergebnisse von je drei unabhängigen Infektionen als Quotient der Anzahl infizierter U87/CD4/X4- und GHOST/X4 bzw. HeLaP4-Zellen. Der Quotient, der sich aus der Infektion mit Env42-Partikeln ergibt, wurde =1 gesetzt. Daraus ergibt sich für Env35-Partikel eine relative Restriktion.

weniger infektiös. Dies bedeutet, dass das Hüllprotein von prCBL23 eine Restriktion auf GHOST/X4-Zellen vermittelt. In HeLaP4-Zellen wurde keine Restriktion von Env35-Partikeln gegenüber Env42-Partikeln festgestellt, die Infektion mit jeweils 100 µl Transfektionsüberstand ergab für beide pseudotypisierte Partikel etwa  $4 \times 10^2$  infizierte HeLaP4-Zellen. Dies deckt sich nicht mit den Beobachtungen von McKnight et al. (2001), die außer in GHOST/X4-Zellen auch in HeLaP4-Zellen eine Restriktion von prCBL23 gegenüber CBL23 sehen konnten. In Abbildung 2.3C sind die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Infektionen als Quotient aus der Anzahl an infizierten U87/CD4/X4- und GHOST/X4- bzw. U87/CD4/X4- und HeLaP4-Zellen dargestellt. Die U87/CD4/X4-Zellen dienen als Referenzzelllinie, da sich hier die Infektionseffizienzen von Env35- und Env42-Partikeln nicht wesentlich unterscheiden. Im Falle der Env42-Partikel, die keine Restriktion zeigen, wird der ermittelte Quotient =1 gesetzt. Daraus ergibt sich eine relative Restriktion für Env35-Partikel gegenüber Env42-Partikeln in GHOST/X4- bzw. HeLaP4-Zellen. Aus der Abbildung geht hervor, dass Env35-Partikel im Vergleich zu Env42-Partikeln in GHOST/X4-Zellen eine 60fache Restriktion und in HeLaP4-Zellen keine Restriktion zeigen. Dies bedeutet, dass das Hüllprotein Env35 (prCBL23-Env) in GHOST/X4-Zellen eine Restriktion der Infektion vermitteln kann, nicht aber in HeLaP4-Zellen. Diese 60fache Restriktion in GHOST/X4-Zellen konnte unabhängig von der zur Infektion eingesetzten Menge an infektiösen Partikeln beobachtet werden. Sie trat sowohl bei hoher als auch bei niedriger MOI (*multiplicity of infection*) auf.

### **2.1.3 Die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne von Env35 ist nicht für die Restriktion verantwortlich**

Als nächstes wurde untersucht, ob die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne von Env35 für die auf den GHOST/X4-Zellen beobachtete Restriktion verantwortlich ist. Dazu wurden verschiedene Env35- und Env42-Mutanten konstruiert, die in Abbildung 2.4A schematisch dargestellt sind. Bei Env35R (R = *repair*) wurde das vorzeitige Stop-Kodon TAG an Position 742 durch das entsprechende Aminosäuren-Kodon (TGG = Tryptophan) von Env42 an dieser Position ersetzt, so dass ein Hüllprotein mit einer langen zytoplasmatischen Domäne entstand. Abbildung 2.4A zeigt, dass dadurch an Position 810 in der verlängerten zytoplasmatischen Domäne von Env35R ein weiterer Aminosäurenunterschied zu Env42 auftritt. Um die Bedeutung dieses Unterschiedes beurteilen zu können, wurde Env35R2 konstruiert, dessen extrazelluläre Domäne identisch mit der von Env35 und dessen zytoplasmatische Domäne identisch mit der von Env42 ist. Als Umkehrmutante von Env35R2 wurde schließlich noch Env42S (S = *short*) konstruiert, deren extrazellulärer Teil dem von Env42 entspricht, und die den intrazellulären Teil von Env35 und somit eine verkürzte zytoplasmatische Domäne hat.

Diese Konstrukte wurden auf ihre Infektionseffizienz getestet. Dazu wurden mit den entsprechenden Hüllprotein-Mutanten wie beschrieben pseudotypisierte Viruspartikel hergestellt und dann U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen infiziert und ausgewertet. Abbildung 2.4B zeigt die Ergebnisse drei unabhängiger Infektionen als relative Restriktion der verschiedenen pseudotypisierten Partikel in GHOST/X4-Zellen im Vergleich zu Env42-Partikeln. Env35R-Partikel zeigen trotz der langen

**A****B**

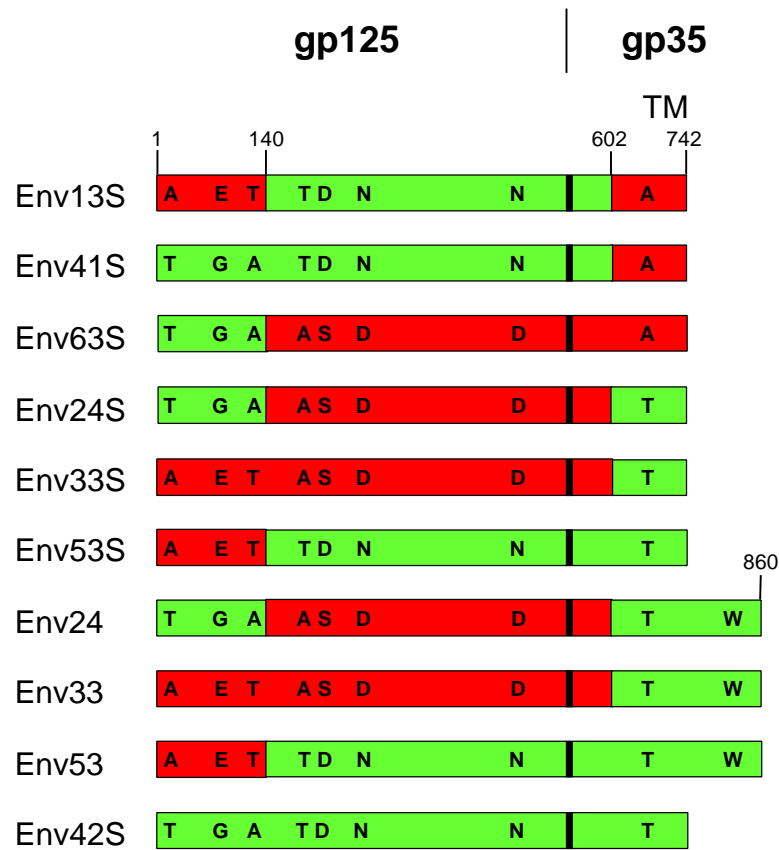
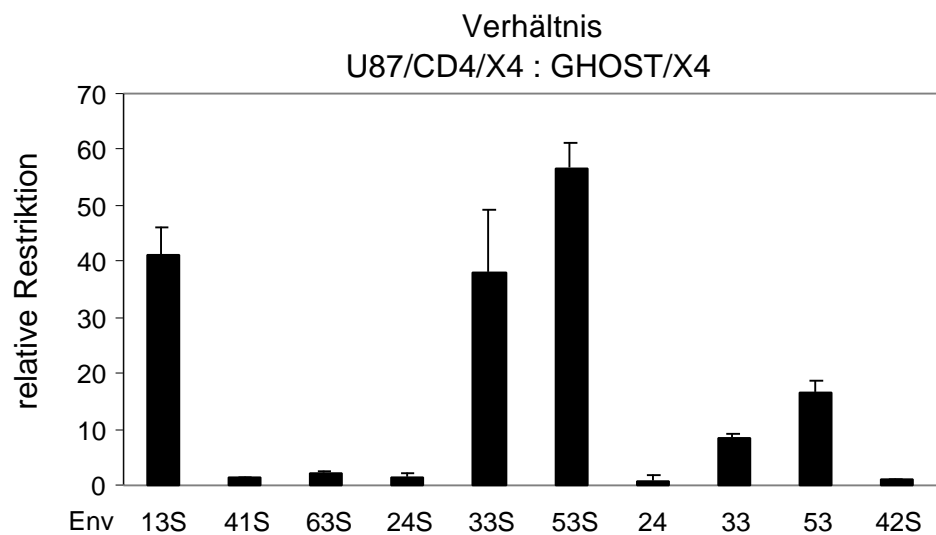
**Abb. 2.4 A** Schematische Darstellung der benutzten Hüllprotein-Mutanten im Vergleich zu den parentalen Hüllproteinen Env35 und Env42. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind durch die entsprechenden Großbuchstaben (Ein-Buchstaben-Kode) dargestellt. Zur Verdeutlichung sind Regionen, die aus Env35 stammen, rot dargestellt, Bereiche in Grün stammen von Env42. **B** Infektionsstudien mit viralen Partikeln, die mit den Hüllproteinen aus A pseudotypisiert wurden. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Infektionen, dargestellt als Quotienten aus der Anzahl infizierter U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen. Der Quotient für Env42-Partikel wurde =1 gesetzt, somit ergibt sich für die restlichen viralen Partikel eine relative Restriktion auf GHOST/X4-Zellen.

zytoplasmatischen Domäne ihres Hüllproteins eine Restriktion im Vergleich zu Env42-Partikeln. Die Restriktion kann also nicht durch Entfernung des Stop-Kodons an Position 742 in Env35 aufgehoben werden. Im Vergleich zu Env35-Partikeln (60fache Restriktion) ist die Restriktion von Env35R-Partikeln (15fache Restriktion) aber viermal niedriger. Demnach hat die zytoplasmatische Domäne einen gewissen Einfluss auf die Restriktion. Env35R2-Partikel zeigen genauso wie Env35R-Partikel eine 15fache Restriktion, somit scheint der Aminosäurenunterschied an Position 810 in der zytoplasmatischen Domäne der Hüllproteine keinen Einfluss auf die Infektionseffizienz zu haben. Die Ergebnisse der Infektionen mit Env42S-Partikeln zeigen, dass das Fehlen der zytoplasmatischen Domäne nicht die Ursache für die Restriktion ist. Obwohl ihr Hüllprotein Env42S eine kurze intrazelluläre Domäne hat, sind sie in der Infektion genauso effizient wie Env42-Partikel. Diese Ergebnisse zeigen, dass das vorzeitige Stop-Kodon in Env35 (prCBL23-Env) und somit die Verkürzung seiner intrazellulären Domäne nicht der bestimmende Faktor für die Restriktion von Env35-Partikeln auf GHOST/X4-Zellen ist. Die für die Restriktion kritische Determinante muss deshalb ein Unterschied in der extrazellulären Domäne des Hüllproteins sein.

#### **2.1.4 Der für die Restriktion kritische Bereich liegt am aminoterminalen Ende der Oberflächendomäne von Env35**

Um die für die Restriktion verantwortliche Region weiter einzugrenzen, wurden aus den beiden parental Hüllproteinen Env35 und Env42 verschiedene Chimären konstruiert, d.h. größere Bereiche der beiden Hüllproteine wurden gegeneinander ausgetauscht. Abbildung 3.5A zeigt die schematische Darstellung der Hüllprotein-Konstrukte. Rot gekennzeichnete Bereiche stammen von Env35 ab, grün gekennzeichnete von Env42. Die Bezeichnung der Konstrukte ergab sich aus den Klonnummern, und „S“ („*short*“) steht für eine kurze zytoplasmatische Domäne.

Im folgenden wurden die Infektionseigenschaften der chimären Hüllproteine getestet. Dazu wurden wie in Kapitel 2.1.1 und 2.1.2 beschrieben die entsprechenden pseudotypisierte Viruspartikel hergestellt und dann U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen infiziert und ausgewertet. Abbildung 2.5B zeigt die Ergebnisse dieser Infektionsstudien. Dargestellt ist die relative Restriktion der verschiedenen pseudotypisierten Partikel in GHOST/X4-Zellen im Vergleich zu Env42S-Partikeln. Alle chimären Hüllproteine, die den aminoterminalen Teil von Env35 (Rot) besitzen (Env13S, Env33S, Env53S, Env33 und Env53), vermitteln eine Restriktion im Vergleich zu Env42S. Env13S (41fache Restriktion), Env33S (38fache Restriktion) und Env53S (56fache Restriktion), die zusätzlich noch eine kurze zytoplasmatische Domäne besitzen, liegen dabei in der gleichen Größenordnung wie Env35 (60fache Restriktion, vgl. Abb. 2.4B). Env33 (8fache Restriktion) und Env53 (17fache Restriktion), die eine lange zytoplasmatische Domäne haben, liegen in der Größenordnung von Env35R bzw. Env35R2 (15fache Restriktion, vgl. Abb. 2.4B). Somit führt auch im Falle von Env33S und Env53S wie bei Env35 die Verlängerung der zytoplasmatischen Domäne zur Verminderung, aber nicht zur Aufhebung der Restriktion. Alle Chimären, die den aminoterminalen Bereich von Env42 (Grün) haben (Env41S, Env63S, Env24S und Env24), vermitteln keine Restriktion auf GHOST/X4-Zellen. Dabei verdeutlichen die Ergebnisse für die Konstrukte Env24S (1,5fache Restriktion), Env41S (1,4fache Restriktion) und

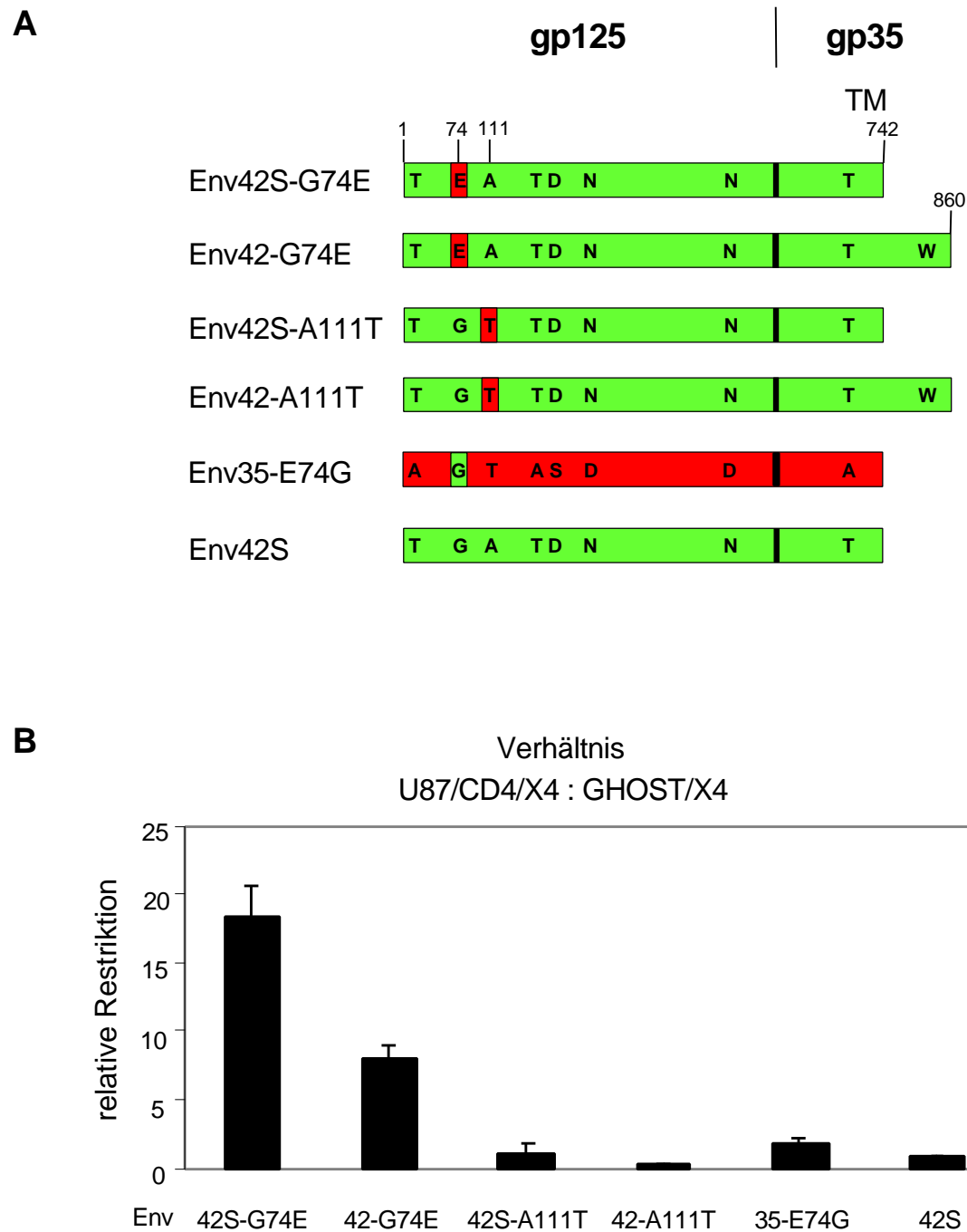
**A****B**

**Abb. 2.5 A** Schematische Darstellung der benutzten Hüllprotein-Mutanten im Vergleich zu den parentalen Hüllproteinen Env35 und Env42. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind durch die entsprechenden Großbuchstaben (Ein-Buchstaben-Kode) dargestellt. Zur Verdeutlichung sind Regionen, die aus Env35 stammen, rot dargestellt, Bereiche in Grün stammen von Env42. **B** Infektionsstudien mit viralen Partikeln, die mit den Hüllproteinen aus A pseudotypisiert wurden. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Infektionen, dargestellt als Quotienten aus der Anzahl infizierter U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen. Der Quotient für Env42S-Partikel wurde =1 gesetzt, somit ergibt sich für die restlichen viralen Partikel eine relative Restriktion auf GHOST/X4-Zellen.

Env63S (2fache Restriktion), die eine kurze zytoplasmatische Domäne besitzen und trotzdem keine Restriktion zeigen, dass die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne nicht die Hauptdeterminante für die Restriktion ist. Da alle chimären Hüllproteine, die eine Restriktion vermitteln, nur den aminoterminalen Bereich von Env35 gemeinsam haben, bedeutet dies, dass einer oder eine Kombination der drei Aminosäurenunterschiede im aminoterminalen Bereich von Env35 für die Restriktion der Infektion von Env35-Partikeln auf GHOST/X4-Zellen verantwortlich sein muss.

### **2.1.5 Die Aminosäure Glutaminsäure an Position 74 in Env35 ist die kritische Determinante für die Restriktion**

Die aminoterminalen Region von Env35, die die Restriktion auf GHOST/X4-Zellen vermittelt, enthält drei Aminosäurenunterschiede (Positionen 16, 74 und 111, vgl. Abb. 2.1) im Vergleich zu Env42, das keine Restriktion zeigt. Um herauszufinden, welche dieser drei Aminosäuren für die Restriktion der Env35-Partikel essentiell sind, wurden diese zwischen Env35 und Env42 ausgetauscht. Der Aminosäureunterschied an Position 16 wurde nicht untersucht, da dieser im Bereich des Signalpeptides liegt, das während der Translation des Hüllproteins am rauen ER enzymatisch entfernt wird. Dieser Bereich ist somit im fertigen Viruspartikel nicht vorhanden und spielt bei der Infektion folglich keine Rolle. Durch die Austausch der beiden verbleibenden Aminosäuren an den Positionen 74 und 111 ergaben sich die Hüllprotein-Konstrukte Env42-G74E, Env42S-G74E, Env42-A111T, Env42S-A111T und Env35-E74G, die in Abbildung 2.6A schematisch dargestellt sind. Bereiche bzw. Aminosäuren in Rot stammen von Env35 und Bereiche in Grün stammen von Env42. Mit diesen Konstrukten wurden analog zu den vorigen Kapiteln pseudotypisierte Partikel hergestellt, U87/CD4/X4- bzw. GHOST/X4-Zellen infiziert und analysiert. Abbildung 2.6B zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Infektionen als relative Restriktion der getesteten pseudotypisierten Partikel in GHOST/X4-Zellen im Vergleich zu Env42S-Partikeln. Virale Partikel mit den Hüllproteinen Env42-A111T und Env42S-A111T, bei denen an Position 111 Alanin durch Threonin (von Env35) ersetzt wurde, zeigen keine Restriktion. Dies bedeutet, dass Threonin an Position 111 in Env35 nicht die kritische Determinante für die Restriktion ist. Partikel mit den Hüllproteinen Env42-G74E und Env42S-G74E, bei denen an Position 74 Glutaminsäure von Env35 anstelle von Glycin gesetzt wurde, zeigen jedoch eine Restriktion. Auch hier wird die Restriktion durch das Vorhandensein der zytoplasmatischen Domäne bei Env42-G74E (8fache Restriktion) im Vergleich zu Env42S-G74E (18fache Restriktion) etwas vermindert. Die 18fache Restriktion von Env42S-G74E-Partikeln ist nicht so hoch, wie die von Env35- (60fach, vgl. Abb. 2.4) und Env53S-Partikeln (56fach, vgl. Abb. 2.5). Dies zeigt, dass die Position 74 zwar essentiell, aber nicht alleine an der Restriktion beteiligt ist. Betrachtet man das Ergebnis für virale Partikel mit dem Hüllprotein Env35-E74G, bei dem Glutaminsäure an Position 74 in Env35 durch Glutamin von Env42 ersetzt wurde, so wird deutlich, dass diese eine Aminosäure fähig ist, die Restriktion von Env35-Partikeln aufzuheben (von 60fach zu 2fach). Daraus ist zu schließen, dass die Glutaminsäure an Position 74 in der Oberflächendomäne von Env35 die für die Restriktion auf GHOST/X4-Zellen kritische Determinante ist.



**Abb. 2.6 A** Schematische Darstellung der benutzten Hüllprotein-Mutanten im Vergleich zu den parentalen Hüllproteinen Env35 und Env42. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind durch die entsprechenden Großbuchstaben (Ein-Buchstaben-Code) dargestellt. Zur Verdeutlichung sind Regionen, die aus Env35 stammen, rot dargestellt, Bereiche in Grün stammen von Env42. **B** Infektionsstudien mit viralen Partikeln, die mit den Hüllproteinen aus A pseudotypisiert wurden. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Infektionen, dargestellt als Quotienten aus der Anzahl infizierter U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen. Der Quotient für Env42S-Partikel wurde =1 gesetzt, somit ergibt sich für die restlichen viralen Partikel eine relative Restriktion auf GHOST/X4-Zellen.

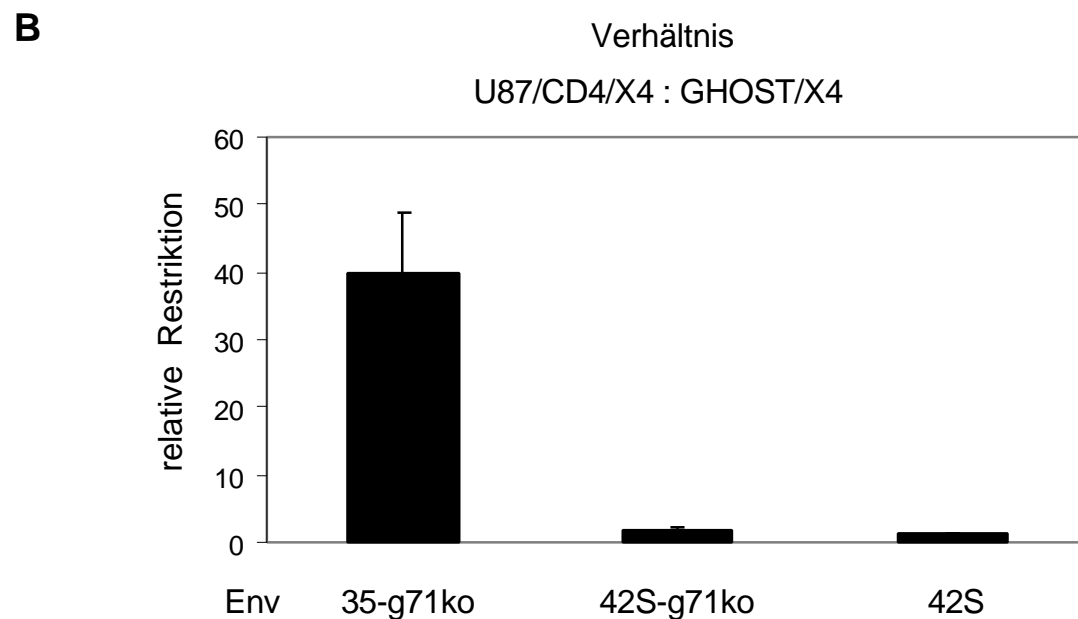
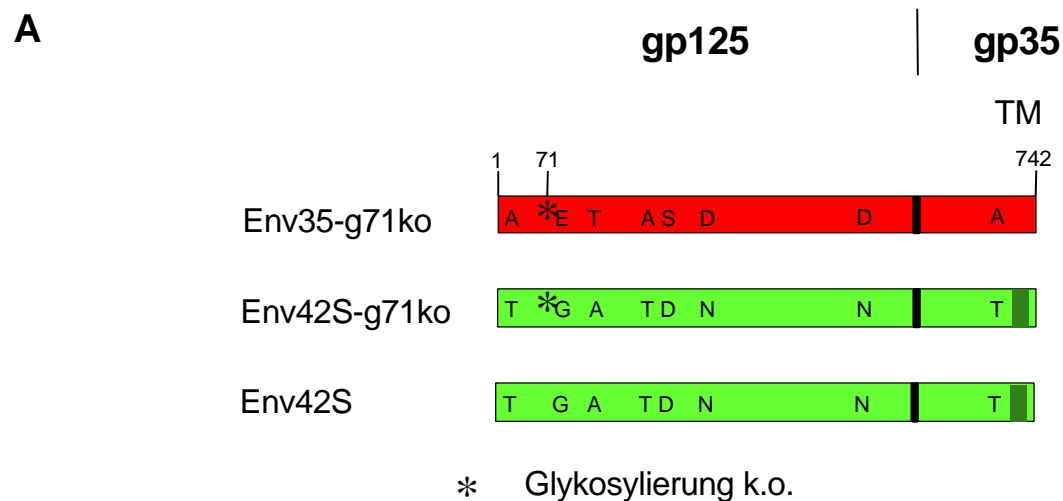


### **2.1.6 Die potentielle Glykosylierungsstelle an Position 71 in Env35 und Env42 hat keinen Einfluss auf die Restriktion**

In der Nähe der für die Restriktion kritischen Position 74 im Hüllprotein von Env35 und Env42 befindet sich eine potentielle Glykosylierungsstelle. Durch die unterschiedlichen Eigenschaften von Glutaminsäure gegenüber Glycin, könnte die Struktur des Hüllproteins an Position 74 lokal variieren, was wiederum einen Einfluss auf die Glykosylierung an Position 71 haben könnte. Da eine Veränderung der Glykosylierung die Eigenschaften des Hüllproteins maßgeblich beeinflussen kann, wurde untersucht, ob durch die Entfernung des Glykosylierungsmotives an Position 71 in den Hüllproteinen Env35 und Env42 deren Restriktionseigenschaften in GHOST/X4-Zellen beeinflusst werden. Die DNA-Sequenz wurde in beiden Hüllproteinen so mutiert, dass an Position 71 anstelle von Asparagin Glutamin eingebaut und somit das Glykosylierungsmotiv NVT zerstört wurde. Abbildung 2.7A zeigt die schematische Darstellung der so entstandenen Hüllprotein-Mutanten Env35-g71ko und Env42S-g71ko. Die Infektionen von U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen mit den entsprechenden pseudotypisierten Partikeln und die Auswertung der Ergebnisse wurde wie in den vorigen Kapitel beschrieben durchgeführt. Als Referenz dienten Infektionen mit Env42S-Partikeln, die keine Restriktion zeigen. Abbildung 2.7B verdeutlicht, dass Env35-g71ko-Partikel in GHOST/X4-Zellen ähnlich wie Env35-Partikel eine starke Restriktion zeigen (40fach im Vgl. zu 60fach), während Env42S-g71ko-Partikel genauso wie Env42S-Partikel keine Restriktion zeigen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ausschaltung der potentiellen Glykosylierungsstelle an Position 71 keinen Einfluss auf die Restriktionseigenschaften von Env35- und Env42S-Partikeln hat.

### **2.2 Bestimmung der Phase des Replikationszyklus, in der die Restriktion stattfindet**

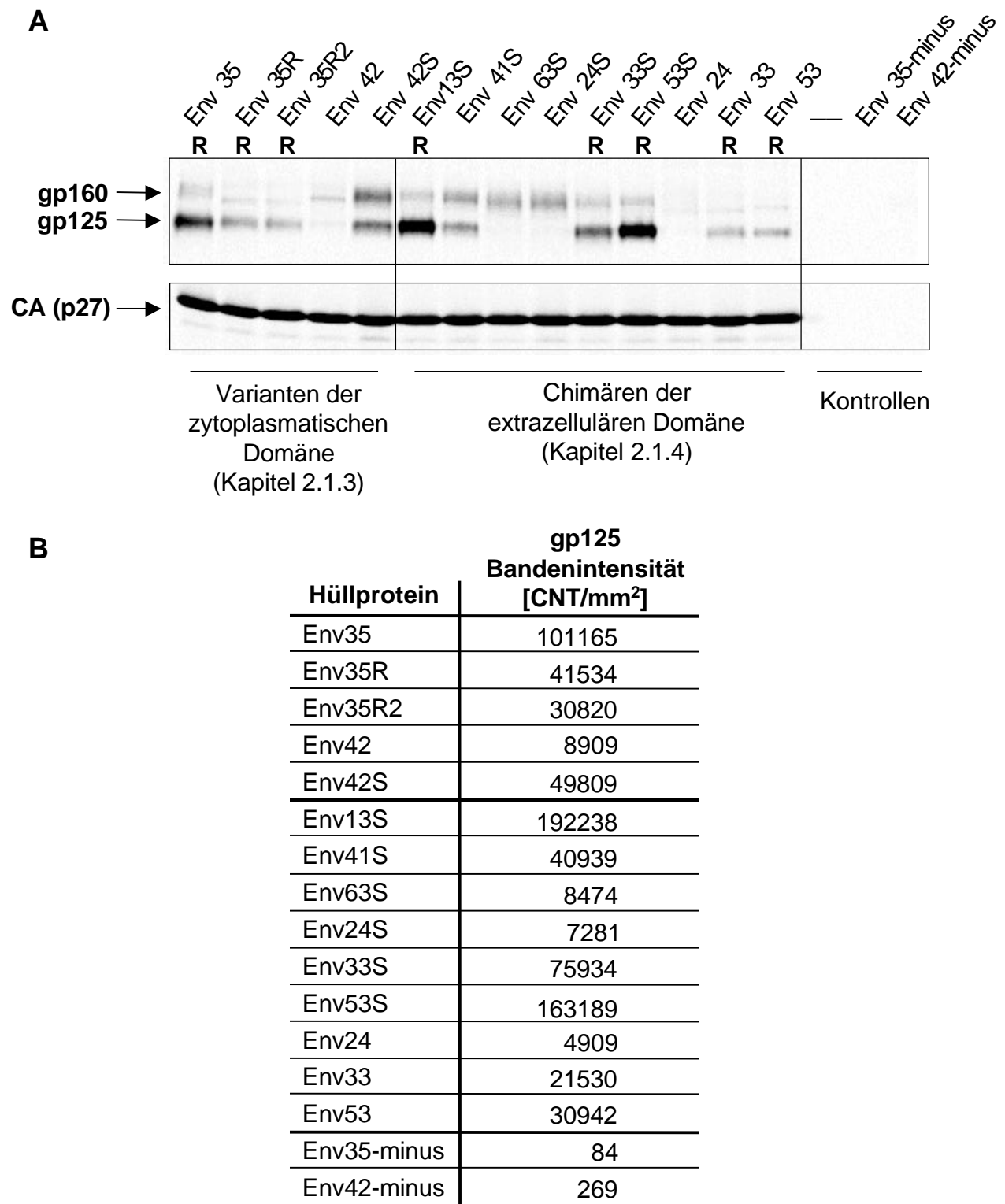
Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, in welcher Phase des Replikationszyklus sich die Restriktion von Env35-Partikeln in GHOST/X4-Zellen manifestiert. Aufgrund der Tatsache, dass die hier beschriebene Restriktion vom Hüllprotein vermittelt wird, wurde zunächst der Einbau der Hüllproteine in die pseudotypisierten Partikel untersucht. Anschließend wurden die Effizienzen, mit denen die verschiedenen Hüllproteine die Fusion der viralen mit der zellulären Membran vermitteln, miteinander verglichen. Auf den Beobachtungen von McKnight et al. (2001) basierend, die die Manifestation der Restriktion des Isolates prCBL23 in GHOST/X4-Zellen auf einen Zeitpunkt nach der reversen Transkription und vor dem Import des Präintegrationskomplexes in den Zellkern begrenzen konnten, wurde abschließend untersucht, ob sich die Restriktion der Env35-Partikel in GHOST/X4-Zellen ebenfalls erst nach der reversen Transkription manifestiert.



**Abb. 2.7 A** Schematische Darstellung der benutzten Hüllprotein-Mutanten im Vergleich zu den parentalen Hüllproteinen Env35 und Env42. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind durch die entsprechenden Großbuchstaben (Ein-Buchstaben-Kode) dargestellt. Zur Verdeutlichung sind Regionen, die aus Env35 stammen, rot dargestellt, Bereiche in Grün stammen von Env42. **B** Infektionsstudien mit viralen Partikeln, die mit den Hüllproteinen aus A pseudotypisiert wurden. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Infektionen, dargestellt als Quotienten aus der Anzahl infizierter U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen. Der Quotient für Env42S-Partikel wurde =1 gesetzt, somit ergibt sich für die restlichen viralen Partikel eine relative Restriktion auf GHOST/X4-Zellen.

## 2.2.1 Die Menge der verschiedenen Hüllprotein-Mutanten in den viralen Partikeln korreliert nicht mit deren Restriktionseigenschaften

Um auszuschließen, dass die hier beschriebene Restriktion der Infektion auf dem schlechteren Einbau des entsprechenden Hüllproteins in die viralen Partikel beruht, wurde die Menge an Hüllprotein in den viralen Partikeln untersucht. Dazu wurden 293T-Zellen zur Herstellung pseudotypisierter Partikel wie beschrieben mit dem proviralen Plasmid ROD-A $\Delta$ envGFP und dem entsprechenden Hüllprotein-Expressionsplasmid kotransfiziert und gleichzeitig mit einem  $^{35}\text{S}$ -markiertem Cystein-Methionin-Gemisch inkubiert. Die unter diesen Bedingungen entstandenen pseudotypisierten Partikel wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert und die viralen Proteine anschließend mit HIV-2-Patientenserum (anti HIV-2) immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten viralen Proteine wurden mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) und anschließender Autoradiographie analysiert (Abbildung 2.8A). Als Kontrollen wurden nur die Hüllproteine Env35 und Env42, ohne ROD-A $\Delta$ envGFP transfiziert (Env35-minus, Env42-minus). Sie ergaben keine sichtbaren gp125- bzw. gp160-Banden, so dass man davon ausgehen kann, dass die Hüllproteine, die man in den verschiedenen Ansätzen sieht, in den pseudotypisierten Partikeln eingebaut waren, und nicht aus zellulären Membranen wie z.B. Mikrovesikeln stammten, die bei der Ultrazentrifugation zusammen mit den viralen Partikeln pelletiert werden können. Die Kapsid-Banden CA (p27) dienten als Ladungskontrolle, um die Menge der Hüllproteine der einzelnen Ansätze auf gleiche Anzahl virale Partikel beziehen zu können. In Abbildung 2.8B sind die Werte der gp125-Banden als Anzahl der Schwärzungspunkte pro Flächeneinheit (CTS/mm<sup>2</sup>) nach Abzug des Hintergrundes und bezogen auf gleiche Kapsid-Werte dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit der QuantityOne Software von BioRad. Abbildung 2.8A zeigt, dass das Vorläuferprotein gp160 in alle virale Partikel mehr oder weniger stark eingebaut wird. Leichte Unterschiede in der Laufhöhe sind auf die unterschiedliche Länge der zytoplasmatischen Domänen und wahrscheinlich unterschiedliche Glykosylierung zurückzuführen. Es fällt auf, dass insbesondere im Fall der nicht-restringierten Hüllproteine mindestens genauso viel (oder mehr) gp160 wie gp125 in die Partikel eingebaut wird. Beim Einbau der verschiedenen gp125-Varianten sind teilweise bis zu 40fache Unterschiede zu sehen. Den stärksten Einbau können Env13S und Env53S (192238 bzw. 163189 CTS/mm<sup>2</sup>) verzeichnen, am schwächsten wird Env24 (4909 CTS/mm<sup>2</sup>) eingebaut. Weiterhin fällt auf, dass Hüllproteine mit einer verkürzten zytoplasmatischen Domäne etwa 2 bis 6mal besser eingebaut werden als die entsprechenden langen Hüllproteine (vgl. Env35 mit Env35R und Env35R2; Env42S mit Env42; Env24S mit Env24; Env33S mit Env33; Env53S mit Env53). Außer der zytoplasmatischen Domäne müssen aber noch andere Faktoren in der extrazellulären Domäne eine Rolle spielen, denn auch wenn zwei verschiedene Hüllprotein-Mutanten gleichlange zytoplasmatische Domänen haben werden sie teilweise unterschiedlich gut eingebaut (vgl. z.B. Env42S mit Env13; Env35R mit Env42). Die Abbildungen 2.8A und B verdeutlichen außerdem, dass Hüllproteine, die eine Restriktion auf GHOST/X4-Zellen vermitteln (mit R gekennzeichnet), nicht schlechter, sondern oft sogar noch besser eingebaut werden, als Hüllproteine, die keine Restriktion zeigen. So wird z.B. Env35 ca. 11mal besser als Env42 und ca. 2mal besser als Env42S eingebaut. Dies bedeutet, dass keine Korrelation zwischen Restriktion und schlechtem Einbau des Hüllproteins besteht. Das heißt, die Restriktion beruht nicht auf der Einbaueffizienz des Hüllproteins.



**Abb. 2.8** Quantifizierung des Einbaus der verschiedenen Hüllproteinmutanten in virale Partikel. **A** Autoradiogramm von immunpräzipitierten und mittels SDS-PAGE aufgetrennten viralen Proteinen aus radioaktiv markierten pseudotypisierten Partikeln. **B** Die Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mit der QuantityOne Software von BioRad. Dargestellt ist die Intensität der gp125-Banden in CNT/mm<sup>2</sup> (Schwärzungspunkte pro Flächeneinheit) nach Abzug des Hintergrunds (1500 CNT/mm<sup>2</sup>) und bezogen auf gleiche Stärke der Kapsid-Banden. R=Restriktion; CA=Kapsid

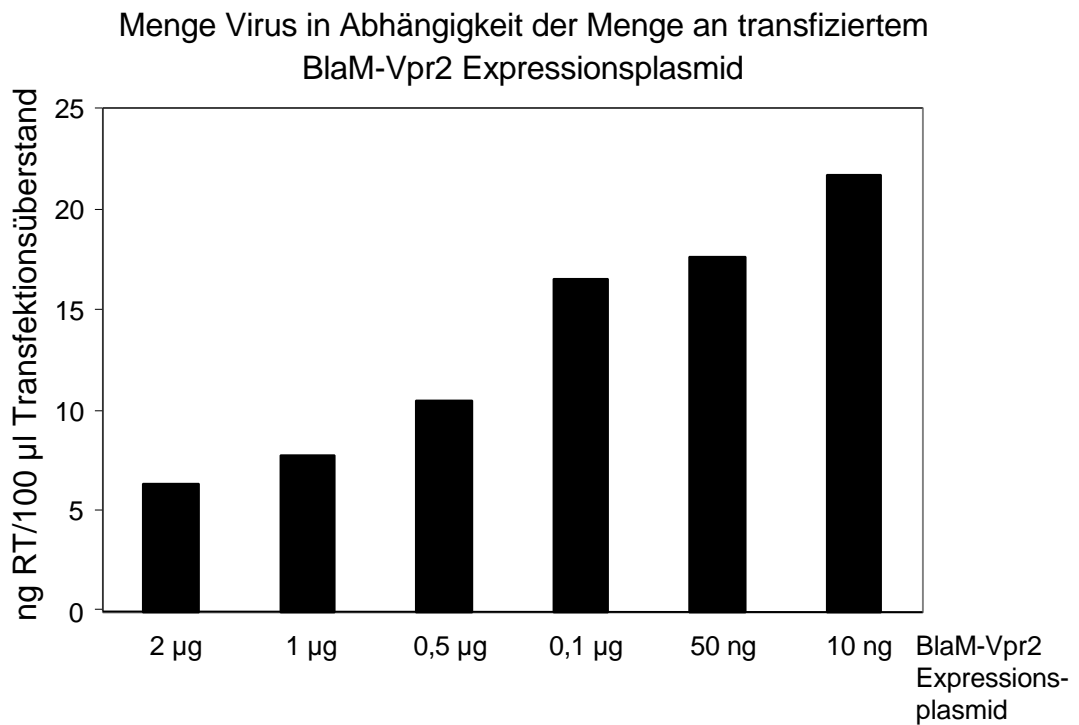
## 2.2.2 Bestimmung der Effizienz des Eintritts der viralen Partikel in die Zelle mit Hilfe des BlaM-Assays

Im Folgenden wurde untersucht, ob der Eintritt der Viruspartikel in die Zelle der Angriffspunkt der Restriktion ist. Dazu musste zunächst der sogenannte BlaM-Assay etabliert werden, der auf einem  $\beta$ -Lactamase-Reporter-System beruht. Mit diesem Assay kann der Eintritt der viralen Partikel in das Zytosol der Zelle durch die Anwesenheit des  $\beta$ -Lactamase-Vpr2 (BlaM-Vpr2) Fusionsproteins im viralen Partikel quantifiziert werden. Nach der Fusion der viralen mit der zellulären Membran wird das BlaM-Vpr2 Fusionsprotein zusammen mit dem viralen Kapsid ins Zytoplasma der Zelle freigesetzt. Die Zellen werden nun mit dem Farbstoff CCF2 beladen, der von der  $\beta$ -Lactamase gespalten werden kann. Nach Anregung mit Licht bei einer Wellenlänge von 409 nm emittiert ungespaltenes CCF2 bei einer Wellenlänge von 520 nm, gespaltenes CCF2 bei 447 nm. Durch Messung der Fluoreszenzintensität bei diesen Wellenlängen kann das Verhältnis von gespaltenem zu ungespaltenem CCF2 ermittelt werden, was wiederum Aufschluss über die Menge an BlaM-Vpr2 Fusionsprotein in der Zelle gibt, bzw. über die Menge der viralen Partikel, die mit der Zelle fusioniert haben (siehe auch Methodenteil). Somit wurde untersucht, ob die beiden Hüllproteine Env35 und Env42 (und ihre Varianten) die viralen Partikel mit unterschiedlicher Effizienz in die Zelle bringen, d.h. die Fusion der viralen mit der zellulären Membran unterschiedlich gut vermitteln.

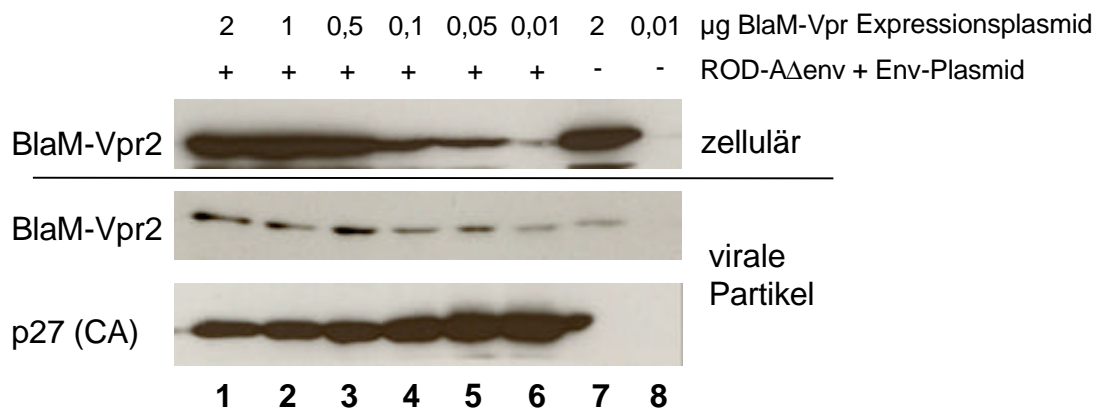
### 2.2.2.1 Optimierung des Einbaus von $\beta$ -Lactamase-Vpr2 in virale Partikel

Zunächst musste die Herstellung pseudotypisierter Partikel, die das Fusionsprotein BlaM-Vpr2 inkorporieren, optimiert werden. Bei der Produktion dieser Partikel muss das BlaM-Vpr2-Expressionsplasmid kotransfiziert werden, wobei das Mengenverhältnis der einzelnen Plasmide zueinander wichtig ist. Die Anwesenheit des BlaM-Vpr2 Expressionsplasmides hat einen negativen Einfluss auf die Zahl der infektiösen Partikel, die produziert werden. Deshalb musste ein Mengenverhältnis der Plasmide zueinander gefunden werden, das den ausreichenden Einbau von BlaM-Vpr2 in die Partikel ermöglicht und gleichzeitig möglichst viele infektiöse Partikel ergibt. Um das optimale Mengenverhältnis zu ermitteln, wurden gleichbleibende Mengen des Hüllprotein-Expressionsplasmides Env42 (3  $\mu$ g) und des proviralen Plasmides ROD-A $\Delta$ env (3  $\mu$ g) mit unterschiedlichen Mengen des BlaM-Vpr2 Expressionsplasmides (2  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g, 0,1  $\mu$ g, 50 ng und 10 ng) für die Transfektion von 293T-Zellen eingesetzt. Die entstehenden viralen Partikel wurden zum einen mit einem RT-Assay quantifiziert und zum anderen durch Ultrazentrifugation pelletiert und dann im ECL-Western Blot analysiert. Der RT-Assay (Abbildung 2.9A) zeigt, dass die Anzahl der viralen Partikel im Überstand mit abnehmender Menge an kotransfiziertem BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid steigt. Der für die Kotransfektion von 10 ng BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid errechnete Wert von 22 ng RT/100  $\mu$ l Transfektionsüberstand ist vergleichbar mit den Werten, die erzielt werden, wenn pseudotypisierte Partikel ohne BlaM-Vpr2 hergestellt werden. Auch die Analyse der viralen Partikel im Western Blot (anti HIV-2 bzw. anti  $\beta$ -Lactamase) zeigt, dass die Menge der

**A**



**B**

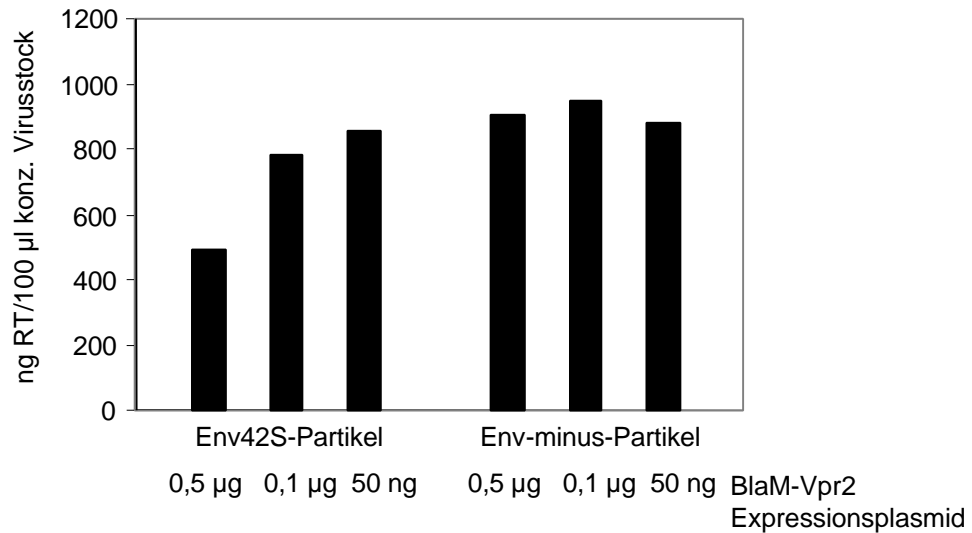
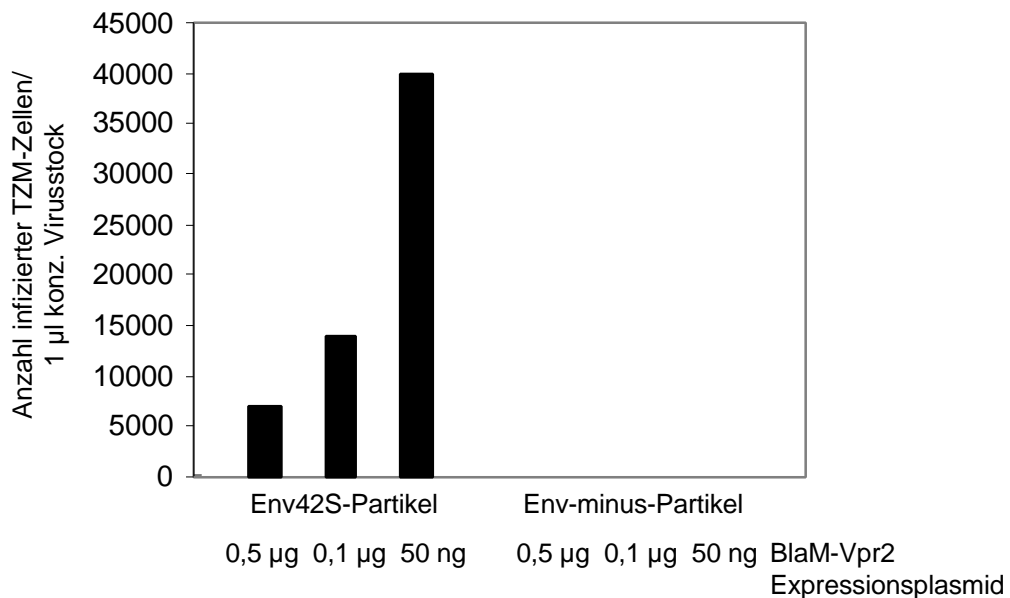


**Abb. 2.9 A** RT-Assay zur Quantifizierung der Produktion von Env42-Partikeln in 293T-Zellen, in Abhängigkeit der kotransfizierten Menge an BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid. **B** ECL-Western Blot (anti  $\beta$ -Lactamase bzw. anti HIV-2) zur Kontrolle des Einbaus von BlaM-Vpr2 in Env42-Partikel in Abhängigkeit der kotransfizierten Menge an BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid. Der obere Teil zeigt die Expression von BlaM-Vpr2 in 293T-Zellen. Der untere Teil zeigt die Menge an BlaM-Vpr2 in viralen Partikeln im Vergleich zur Menge Kapsid (p27).

viralen Partikel, gemessen an p27 (CA), umgekehrt proportional zur Menge an kotransfiziertem BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid ansteigt (Abbildung 2.9B). Aus der Abbildung wird außerdem ersichtlich, dass BlaM-Vpr2 zwar in Abhängigkeit der Menge an kotransfiziertem Expressionsplasmid in die Partikel eingebaut wird, jedoch sind die Unterschiede insbesondere ab einer Menge von 0,5 µg kotransfiziertem BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid aufwärts nicht mehr sehr deutlich. Als Kontrollen wurden 293T-Zellen mit 2 µg und 10 ng BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid alleine transfiziert. Die Überstände aus diesen Transfektionen wurden ebenfalls durch Ultrazentrifugation pelletiert und dann im Western Blot analysiert (Spur 7 und 8). Dadurch konnte festgestellt werden, ob die BlaM-Vpr2 Fusionsproteine, die man im Western Blot sieht, tatsächlich virusassoziiert waren, oder ob sie auch in Abwesenheit von viralen Partikeln (z.B. über Vesikel) pelletiert werden konnten. Tatsächlich ist bei der Transfektion von 2 µg BlaM-Vpr2-Expressionsplasmid eine Bande zu sehen (Spur 7), die jedoch schwächer ist als die entsprechende virusassoziierte Bande (Spur 1). Wurden nur 10 ng BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid alleine transfiziert (Spur 8), war nur bei längerer Exposition des Western Blots eine Bande zu sehen (ohne Abbildung), die somit ebenfalls schwächer als die entsprechende virusassoziierte Bande war (Spur 6). Es muss also berücksichtigt werden, dass ein kleiner Teil der BlaM-Vpr2 Banden in Abbildung 2.9B nicht virusassoziiert war.

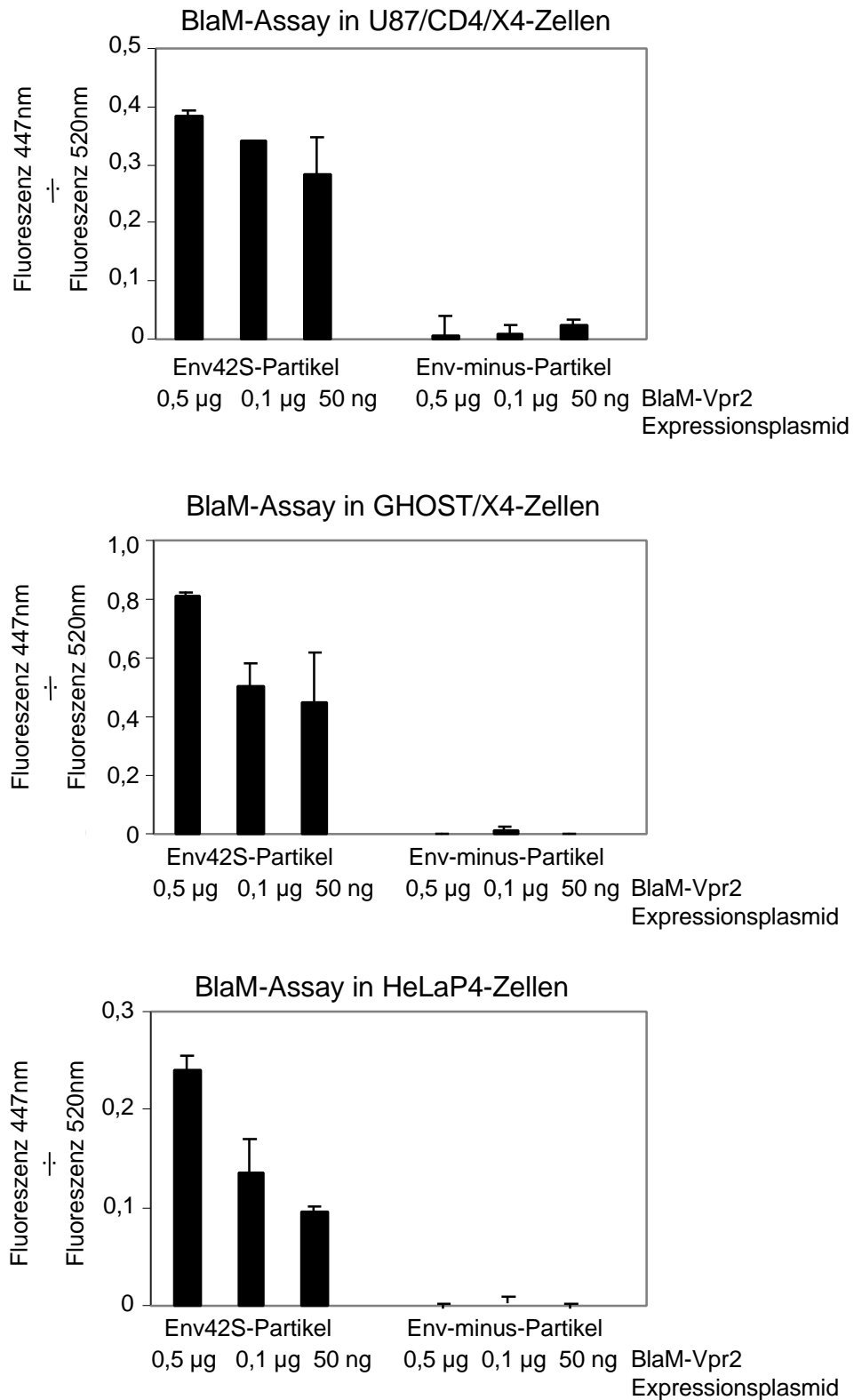
Im folgenden wurde getestet, bei welcher Menge an kotransfiziertem BlaM-Vpr2-Expressionsplasmid die besten Werte im BlaM-Assay erzielt werden. Dazu wurden Env42S-Partikel und als Kontrolle Env-minus-Partikel generiert, jeweils in Anwesenheit von 0,5 µg, 0,1 µg und 50 ng BlaM-Vpr2-Expressionsplasmid. Die Virusstocks wurden nach ihrer Ernte durch Ultrazentrifugation 20fach konzentriert. Anschließend wurde die Menge der viralen Partikel in den konzentrierten Virusstocks mit einem RT-Assay bestimmt. Abbildung 2.10A zeigt die Menge der viralen Partikel, die in Abhängigkeit der Menge an BlaM-Vpr2-Expressionsplasmid produziert wurden. Wie bereits in Abbildung 2.9A gezeigt, steigt auch hier die Menge der viralen Partikel, je weniger BlaM-Vpr2- Expressionsplasmid kotransfiziert wird. Dieses Ergebnis wird auch durch eine Titerbestimmung der konzentrierten Virusstocks bestätigt. Dazu wurden TZM-Zellen mit gleichen Volumina der konzentrierten Virusstocks infiziert und ausgewertet (siehe Methodenteil S. 77). Abbildung 2.10B zeigt, dass die Anzahl der infektiösen Partikel ansteigt, je weniger BlaM-Vpr2-Plasmid bei der Herstellung der viralen Partikel kotransfiziert wird.

Um zu testen, welcher der drei Ansätze (0,5 µg, 0,1 µg oder 50 ng BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid) die besten Werte im BlaM-Assay erzielt, wurden U87/CD4/X4-Zellen mit je 2,5 µl und GHOST/X4- und HeLaP4-Zellen mit je 100 µl der entsprechenden Virusstocks infiziert und dann mit dem Farbstoff CCF2 beladen. Die Ergebnisse der Fluorometer-Messung sind in Abbildung 2.11 dargestellt. Nach Abzug des Hintergrundes der einzelnen Signale wurde der Quotient aus der Menge an gespaltenem und ungespaltenem CCF2, gemessen als Fluoreszenz bei 447 nm und 520 nm, gebildet. Durch die Bildung dieses Verhältnisses werden eventuell vorhandene Unterschiede in der Zelldichte und der Beladung mit CCF2 zwischen den einzelnen Ansätzen ausgeglichen, so dass man die Werte direkt miteinander vergleichen kann. Je größer der Wert des Quotienten, umso mehr virale Partikel haben mit der Zelle fusioniert. Wie zu erwarten, ist mit der Negativkontrolle Env-minus-Partikel kein signifikanter Anstieg des Fluoreszenz-Quotienten über den Hintergrund zu erkennen. Mit Env42S-Partikeln ist in allen drei getesteten Zelllinien ein deutlicher Anstieg des Fluoreszenz-Quotienten zu

**A****Menge Virus in Abhängigkeit der Menge an transfiziertem BlaM-Vpr2 Plasmid****B****Anzahl infektiöse Partikel in Abhängigkeit der Menge an transfiziertem BlaM-Vpr2 Plasmid**

**Abb. 2.10 A** RT-Assay zur Quantifizierung der Produktion von Env42S- und Env-minus-Partikeln in 293T-Zellen in Abhängigkeit der kotransfizierten Menge an BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid. Die Virusstocks sind zuvor durch Ultrazentrifugation 20fach ankonzentriert worden. **B** Infektion von TzM-Zellen mit den Virusstocks aus A, dargestellt als Anzahl infizierter Zellen pro 1 µl konzentriertem Virusstock. Die Auswertung der infizierten TzM-Zellen erfolgte mit Hilfe einer X-Gal-Färbung.



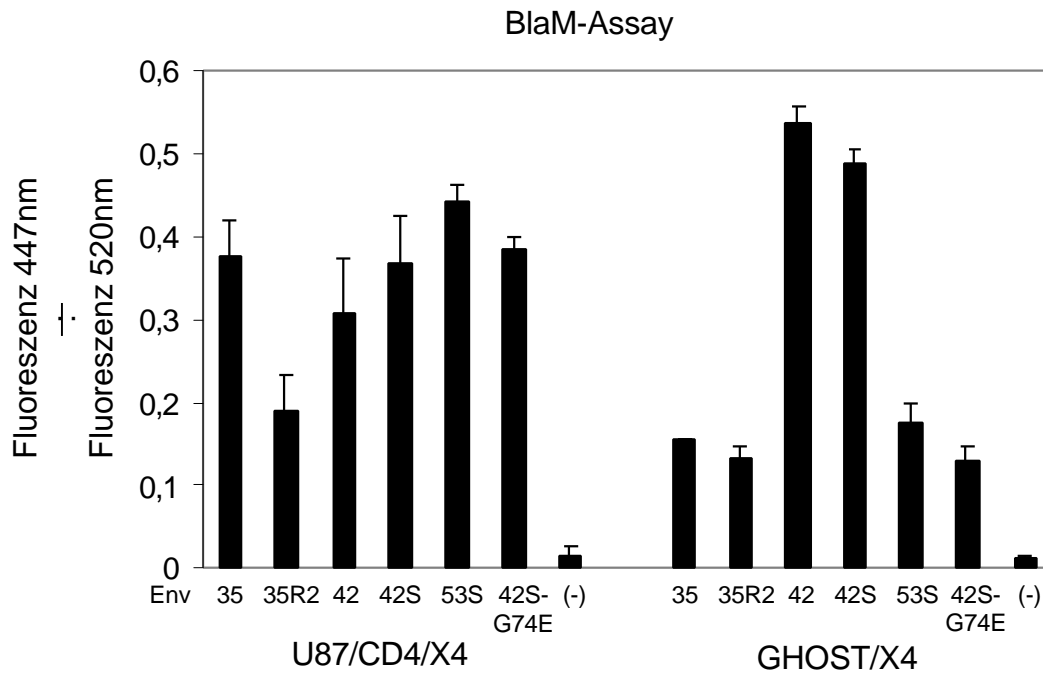
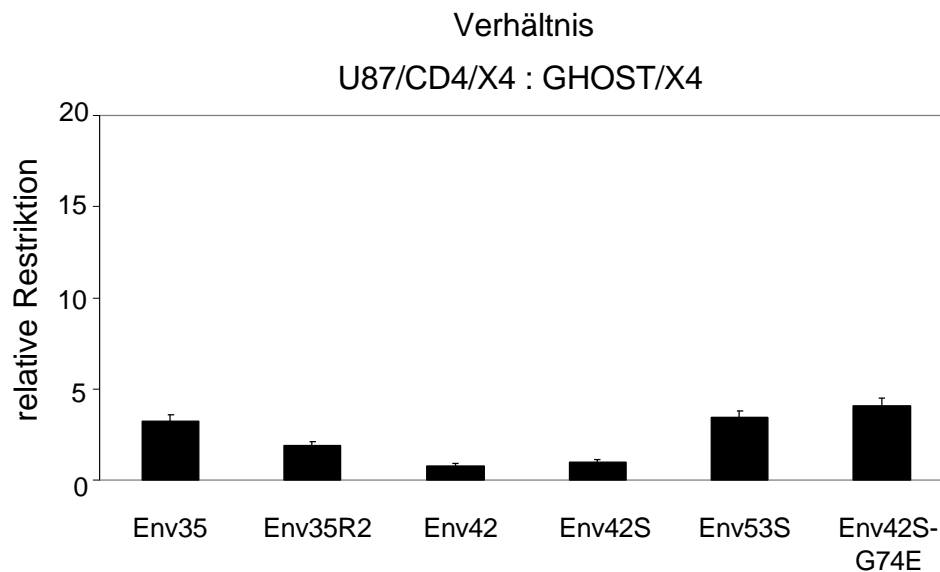


**Abb. 2.11** BlaM-Assay mit den konzentrierten Virusstocks aus Abbildung 2.10. Die drei Zelllinien wurden mit Env42S- und Env-minus-Partikeln infiziert (U87/CD4/X4-Zellen mit 2,5 µl Virusstock, GHOST/X4- und HeLaP4-Zellen mit je 100 µl Virusstock) und im Fluorometer ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Infektionen, dargestellt als Quotient aus den gemessenen Fluoreszenzen bei 447nm und 520nm.

verzeichnen. Der Ansatz mit 0,5 µg BlaM-Vpr2 Plasmid erzielte dabei in allen drei Zelllinien die höchsten Werte, obwohl dies laut TZM-Infektion und RT-Assay (Abb. 2.10) der Virusstock mit den wenigsten infektiösen Partikeln im Vergleich zu den 0,1 µg- und 50 ng-Ansätzen war. Daraus wurde geschlossen, dass sich bei der Kotransfektion von 0,5 µg BlaM-Vpr2 Expressionsplasmid für den BlaM-Assay das günstigste Verhältnis aus Anzahl produzierter Viruspartikel und Menge an eingebautem BlaM-Vpr2 ergibt. Für die folgenden Versuche wurden zur Produktion von viralen Partikeln jeweils 0,5 µg β-Lactamase-Vpr2-Expressionsplasmid mit 3 µg ROD-AΔenv und 3 µg Hüllprotein-Plasmid kotransfiziert. Dies entspricht einem molaren Verhältnis von 0,9 (BlaM-Vpr2 Plasmid) : 2,25 (ROD-AΔenv) : 4,5 (Hüllprotein-Plasmid).

### **2.2.2.2 Env35 vermittelt den Eintritt in GHOST/X4-Zellen mit ähnlicher Effizienz wie Env42**

Um zu klären, ob die auf GHOST/X4-Zellen beobachtete Restriktion darauf zurückzuführen ist, dass das entsprechende Hüllprotein Env35 den Eintritt in die Zelle weniger effizient vermittelt als Env42, wurden die verschiedenen Hüllproteine Env35, Env35R2, Env42, Env42S, Env53S und Env42S-G74E mit Hilfe des BlaM-Assays auf ihre Fusionseigenschaften untersucht (Abb. 2.12). Zunächst wurden durch Kotransfektion des BlaM-Vpr2 Expressionsplasmides wie oben beschrieben pseudotypisierte Partikel hergestellt, die das BlaM-Vpr2 Fusionsprotein inkorporiert hatten. Die viralen Partikel wurden durch Ultrazentrifugation der Zellkulturüberstände 200 bis 400fach konzentriert. Anschließend wurden U87/CD4/X4- mit 4 µl und GHOST/X4-Zellen mit 100 µl dieser konzentrierten Virusstocks infiziert, mit dem Farbstoff CCF2 beladen und im Fluorometer gemessen. Abbildung 2.12A zeigt die Ergebnisse als Quotient aus Menge an gespaltenem und ungespaltenem CCF2, gemessen als Fluoreszenz bei 447 nm und 520 nm. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Infektionen. Die Werte für den Eintritt der verschiedenen pseudotypisierten Partikel in die U87/CD4/X4-Zellen sind (mit Ausnahme des Env35R2-Wertes) in etwa gleich. Bei den GHOST/X4-Zellen zeigt sich dagegen ein etwa 2 bis 3facher Unterschied in der Fusionseffizienz zwischen Partikeln, die eine Restriktion zeigen (Env35, Env35R2, Env53S und Env42S-G74E) und Partikeln, die keine zeigen (Env42 und Env42S). Die Negativkontrollen ergaben kein signifikantes Signal. In Abbildung 2.12B sind die Ergebnisse aus Abb. 2.12A als Quotienten aus den Werten der U87/CD4/X4-Infektionen und den entsprechenden Werten der GHOST/X4-Infektion dargestellt. Analog zu den Abbildungen der Infektionsstudien aus Kapitel 2.1 wurde der Wert für Env42S-Partikel =1 gesetzt, wodurch sich für die anderen Partikel eine relative Restriktion bezüglich des Eintritts in die Zelle ergibt. Abbildung 2.12B zeigt, dass Env35-Partikel im Vergleich zu Env42S-Partikeln beim Eintritt in die Zelle ca. 3fach, Env35R2-Partikel ca. 2fach, Env53S-Partikel ca. 3fach und Env42S-G74E-Partikel ca. 4fach restringiert sind. Somit können die Hüllproteine, die eine Restriktion zeigen, die Fusion mit der Zellmembran tatsächlich weniger effizient (2-4fach) vermitteln als die Hüllproteine Env42 und Env42S, die keine Restriktion zeigen. Dieser 2 bis 4fache Unterschied in der Fusionseffizienz kann jedoch nicht den bis zu 60fachen Unterschied zwischen Env35- und Env42-Partikeln bei der Proteinexpression erklären, der in Kapitel 2.1 beobachtet werden konnte.

**A****B**

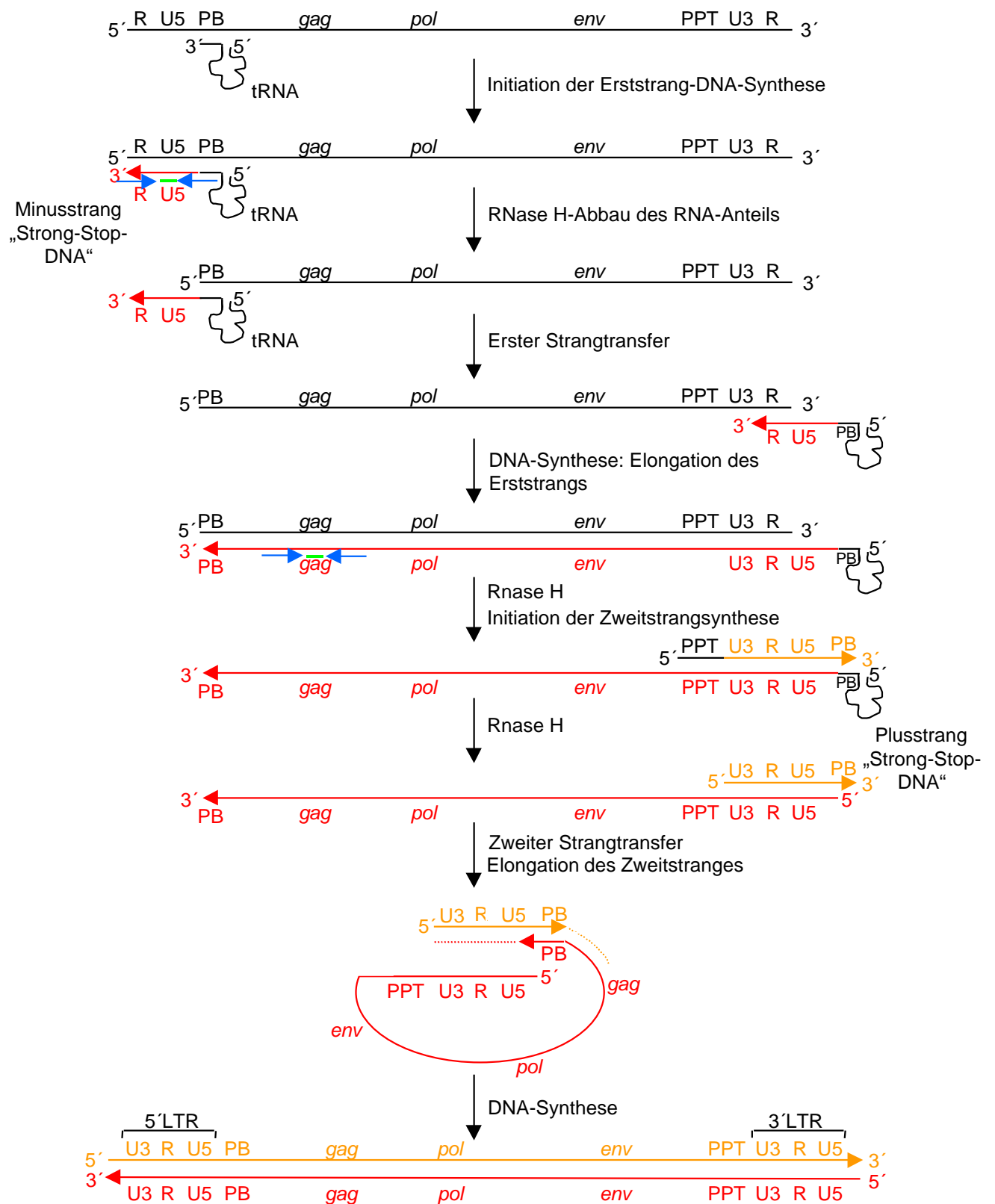
**Abb. 2.12** BlaM-Assay zur Analyse der Fusionseffizienz der verschiedenen viralen Partikel in U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen. **A** Die Ergebnisse sind dargestellt als Quotient der gemessenen Fluoreszenzen bei 447 nm und 520 nm. U87/CD4/X4-Zellen wurden mit je 4  $\mu$ l konzentriertem Virusstock infiziert, GHOST/X4-Zellen mit 100  $\mu$ l. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Infektionen. **B** Die Ergebnisse aus A sind als Quotient der U87/CD4/X4-Werte und den entsprechenden GHOST/X4-Werten dargestellt. Der Quotient für Env42S-Partikel wurde =1 gesetzt. Daraus ergibt sich für die anderen untersuchten Partikel eine relative Restriktion bezüglich ihrer Fusionseffizienz.

### 2.2.3 Quantifizierung der viralen DNA in infizierten GHOST/X4-Zellen mittels Real-Time-PCR

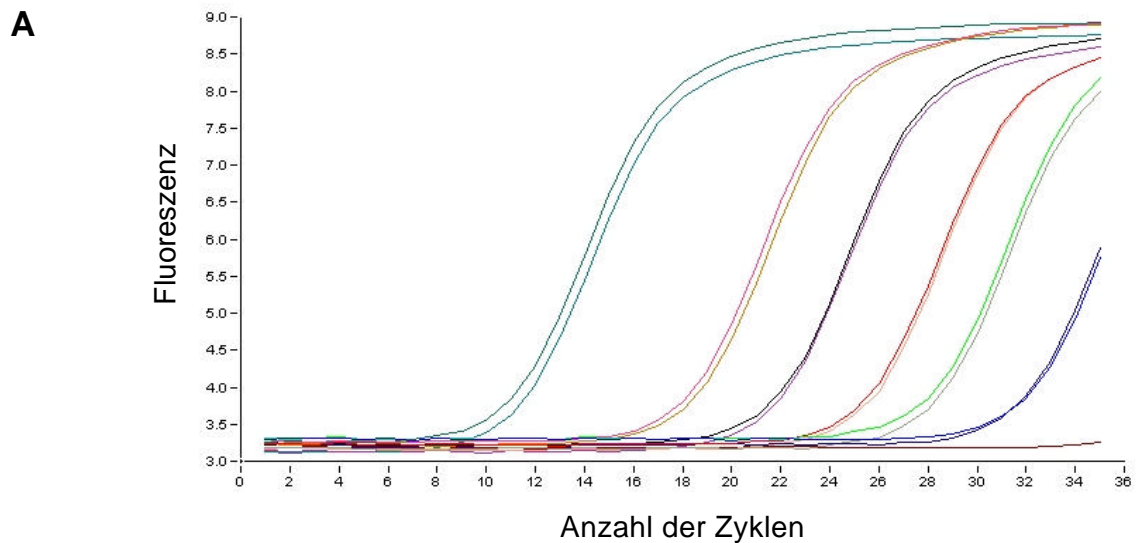
Da die Ergebnisse des BlaM-Assays aus Kapitel 2.2.2 gezeigt haben, dass sich die Restriktion von Env35-Partikeln in GHOST/X4-Zellen nach der Fusion manifestieren muss, wurde im folgenden Teil der Arbeit untersucht, ob die Restriktion vor oder nach der reversen Transkription stattfindet. Dazu wurden die viralen DNAs aus Infektionen von U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen mit verschiedenen pseudotypisierten Partikeln quantifiziert und miteinander verglichen. Die Quantifizierung wurde mit einer quantitativen PCR nach dem TaqMan-Prinzip im LightCycler durchgeführt (siehe Methodenteil). Es sollte außerdem die Möglichkeit bestehen, zwischen früher und später Phase der reversen Transkription unterscheiden zu können, um eventuelle Verzögerungen während der reversen Transkription von einer vollständigen Restriktion der reversen Transkription unterscheiden zu können. Dazu wurden zwei verschiedene quantitative PCRs benötigt (SS-PCR und Gag-PCR), deren Zielsequenzen durch die jeweiligen Primerpositionen schematisch in Abbildung 2.13 dargestellt sind. Das erste Paar (SS-Primer) erkennt die sogenannte „Strong-Stop“-DNA, ein Produkt das gleich zu Beginn der reversen Transkription entsteht. Das zweite Paar (Gag-Primer) bindet an die DNA im Bereich des Gag-Leserahmens, der relativ spät revers transkribiert wird.

#### 2.2.3.1 Evaluierung der quantitativen Gag-PCR

Zur Etablierung und Evaluierung des Systems wurde das Plasmid ACR23 benutzt, das die Zielsequenz der quantitativen Gag-PCR beinhaltet. Von diesem Plasmid wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, so dass ein Bereich von  $10^7$  bis  $10^1$  Molekülen abgedeckt wurde. Diese Verdünnungsreihe wurde später auch als Standard für die Quantifizierung der einzelnen Proben eingesetzt. Die TaqMan-Sonde Gag-TM2 wurde von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin ausgesucht und synthetisiert. Für jede TaqMan-Sonde müssen mehrere Primer-Paare auf ihre Effizienz getestet werden. Für das jeweils beste Primer-Paar muss dann noch die günstigste  $MgCl_2$ -Konzentration im Ansatz ermittelt werden. Abbildung 2.14 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Gag-PCR mit dem Primerpaar, das sich als am effizientesten erwies (Primer Nr.183/Nr.185) und bei der dafür optimierten  $MgCl_2$ -Konzentration (4 mM  $MgCl_2$ ). Als DNA-Matrize diente die Verdünnungsreihe des Kontrollplasmides ACR23. Als Kriterien für die Auswahl des besten Primer-Paares bzw. der besten  $MgCl_2$ -Konzentration dienten die Anzahl der Zyklen, bis das erste Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund tritt (Kreuzungspunkt, *Crossingpoint*), und die Steigung bzw. die Höhe der Kurven. Als weiteres Qualitätsmerkmal diente die aus den Kreuzungspunkten der Verdünnungsreihe errechnete Eichgerade (Abbildung 2.14B und C). Die Steigung der Geraden liegt mit  $-3,464$  im vom Hersteller (Roche) angegebenen optimalen Bereich ( $-2,9$  bis  $-5,7$ ), der ein Maß für die Effizienz der Reaktion ist. Außerdem liegen sämtliche Punkte genau auf oder sehr nahe an der Eichgerade. Dies bedeutet, dass mit der Gag-PCR noch Mengen bis zu  $10^1$  ACR23-Moleküle reproduzierbar (vgl. Doppelwerte)

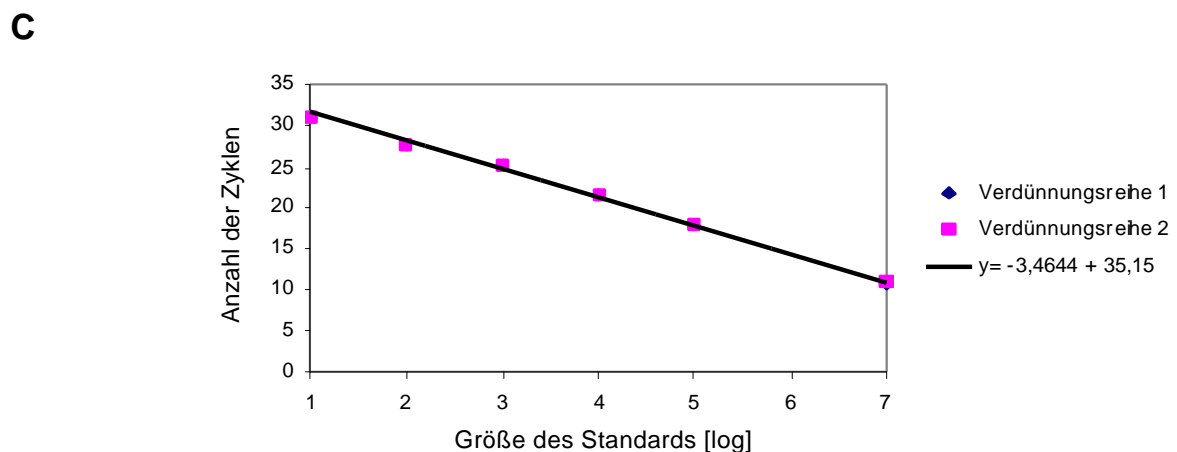


**Abb. 2.13** Schematische Darstellung der reversen Transkription von HIV, modifiziert nach Modrow und Falke. Das mRNA-Genom des Virus ist in Schwarz dargestellt. Die entstehende Minusstrang-DNA ist in Rot und die Plusstrang-DNA in Orange dargestellt. Primerpositionen für die quantitative Strong-Stop- und Gag-PCR sind mit blauen Pfeilen, die Positionen für die TaqMan-Sonden mit grünen Balken markiert.



**B**

Bezeichnung	Kreuzungs- punkt	Errechnete Anzahl der Moleküle
ACR23 10 <sup>1</sup> Moleküle	31,0	16
ACR23 10 <sup>2</sup> Moleküle	27,8	135
ACR23 10 <sup>3</sup> Moleküle	25,1	813
ACR23 10 <sup>4</sup> Moleküle	21,5	9050
ACR23 10 <sup>5</sup> Moleküle	17,9	101000
ACR23 10 <sup>7</sup> Moleküle	10,8	12200000
Repli. von ACR23 10 <sup>1</sup> Moleküle	31,0	16
Repli. von ACR23 10 <sup>2</sup> Moleküle	27,8	133
Repli. von ACR23 10 <sup>3</sup> Moleküle	25,1	740
Repli. von ACR23 10 <sup>4</sup> Moleküle	21,5	9200
Repli. von ACR23 10 <sup>5</sup> Moleküle	18,2	84600
Repli. von ACR23 10 <sup>7</sup> Moleküle	11,0	10800000
Negativkontrolle	/	/



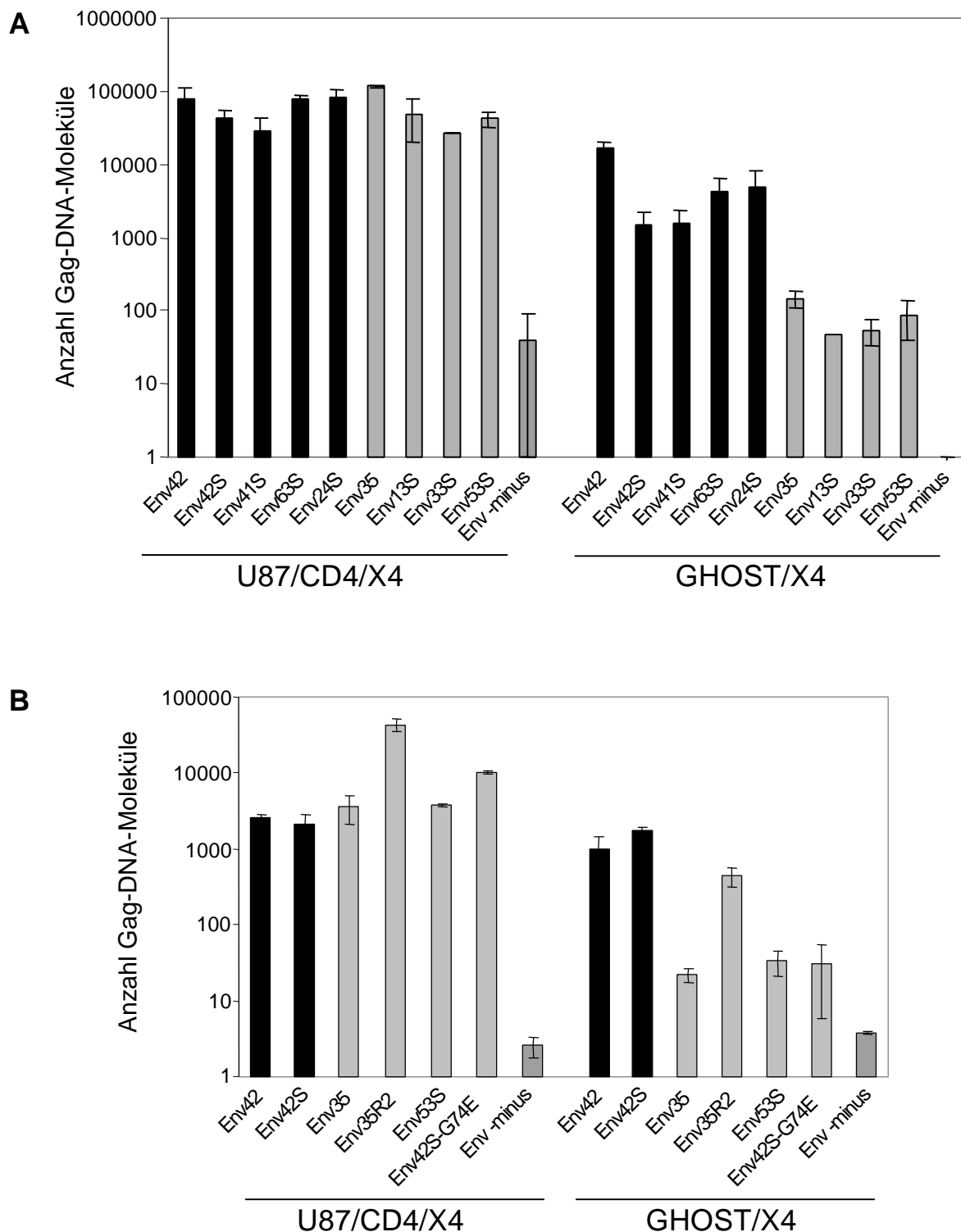
**Abb. 2.14** Evaluierung der quantitativen Gag-PCR mit Hilfe des Kontrollplasmides ACR23. **A** Grafische Darstellung der quantitativen Gag-PCR einer Verdünnungsreihe des Kontrollplasmides ACR23 im LightCycler (Roche) unter Verwendung der TaqMan-Methode. Die einzelnen Kurven beschreiben den Anstieg der synthetisierten DNA (gemessen an der steigenden Fluoreszenz der TaqMan-Sonden) im Verlauf der PCR-Zyklen. **B** Aus dem Verlauf der Kurven errechnet die LightCycler Software 3.5 für jede Standardverdünnung die Kreuzungspunkte, aus denen dann eine Eichgerade erstellt werden kann (Abb.C). **C** Die Eichgerade setzt die verschiedenen Konzentrationen des Standards mit den jeweiligen Kreuzungspunkten in Beziehung. Somit kann die DNA-Konzentration einer unbekannt Probe anhand des Kreuzungspunktes in der quantitativen PCR errechnet werden.

nachgewiesen werden konnten. Die SS-PCR wurde ebenfalls etabliert, erwies sich jedoch als weniger sensitiv und reproduzierbar als die Gag-PCR, weshalb sie ab hier nicht weiter berücksichtigt wird.

### **2.2.3.2 In GHOST/X4-Zellen können nach der Infektion mit Env35-Partikeln im Vergleich zu Env42-Partikeln weniger RT-Produkte nachgewiesen werden**

Um zu klären, ob sich die Restriktion von Env35-Partikeln vor oder nach der reversen Transkription in GHOST/X4-Zellen manifestiert, wurde die virale DNA aus infizierten Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion quantifiziert.  $1 \times 10^5$  U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen wurden mit je 5000 infektiösen Einheiten (gemessen durch Infektion von U87/CD4/X4-Zellen) der verschiedenen pseudotypisierten Partikel infiziert. 6 Stunden nach der Infektion wurden die DNAs aus den infizierten Zellen isoliert. Die Konzentration der isolierten DNAs wurde im Photometer bestimmt. Für die quantitative PCR wurden gleiche Mengen Gesamt-DNA der jeweiligen Ansätze eingesetzt. Da die zelluläre DNA im Vergleich zur viralen DNA im großen Überschuss vorhanden ist, kann durch photometrische Bestimmung der Gesamt-DNA sichergestellt werden, dass in jeder Reaktion gleich viel Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Im Falle von U87/CD4/X4-Zellen wurden 100 ng der Gesamt-DNA eingesetzt. Da GHOST/X4-Zellen schlechter infizierbar sind als U87/CD4/X4-Zellen wurden hier jeweils 250 ng der Gesamt-DNA eingesetzt. Dadurch ergaben sich größere und reproduzierbarere Werte in der quantitativen PCR. Abbildung 2.15A zeigt die Ergebnisse der Gag-PCR als Mittelwerte aus zwei unabhängigen Infektionen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der ACR23-Eichgerade quantifiziert und im Balkendiagramm als Anzahl Gag-DNA-Moleküle dargestellt. Die Gag-PCR zeigt, dass in GHOST/X4-Zellen, die mit pseudotypisierten Partikeln infiziert wurden, die eine Restriktion zeigen (Env35-, Env35R2-, Env13-, Env33S- oder Env53S-Partikel; graue Balken) die Menge an viraler DNA deutlich geringer ist (ca. 100fach) als in GHOST/X4-Zellen, die von Env42-, Env42S-, Env41-, Env63- oder Env24-Partikeln (schwarze Balken) infiziert worden sind. Währenddessen liegen die Mengen der viralen DNAs aus U87/CD4/X4-Zellen in etwa im gleichen Bereich, egal, ob mit restringierten, oder nicht-restringierten viralen Partikeln infiziert worden ist. Dies war zu erwarten, denn zum einen findet die Restriktion auf U87/CD4/X4-Zellen nicht statt, zum anderen wurden die Zellen mit gleicher Zahl infektiöser Partikel, gemessen durch U87/CD4/X4-Infektionen, infiziert.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die in GHOST/X4-Zellen beobachtete Restriktion schon vor (oder während) der reversen Transkription stattfindet, da 6 Stunden nach der Infektion mit viralen Partikeln, die eine Restriktion zeigen, weniger RT-Produkte gefunden wurden als nach der Infektion mit viralen Partikeln, die keine Restriktion zeigen. Um auszuschließen, dass die ca. 100fachen Unterschiede in den Mengen an viraler DNA nur das Ergebnis einer Verzögerung der reversen Transkription waren, die sich zu einem späteren Zeitpunkt nach der Infektion wieder ausgleichen, wurde die Menge an revers transkribierter viraler DNA zusätzlich 48 Stunden nach der Infektion quantifiziert. Dazu wurden U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen mit jeweils 5000 infektiösen Einheiten (gemessen durch Infektion von U87/CD4/X4-Zellen) der viralen Partikel Env35, Env35R2, Env53S, Env42S-G74E, Env42 und Env42S infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden, wie oben beschrieben, die DNAs aus den Zellen isoliert und in der quantitativen Gag-PCR eingesetzt. Die



**Abb. 2.15** Quantitative Gag-PCR zur Untersuchung der reversen Transkription der verschiedenen pseudotypisierten Partikel. U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen wurden mit jeweils gleichen Mengen der pseudotypisierten Partikeln infiziert. 6 (**A**) und 48 (**B**) Stunden nach der Infektion wurden die Mengen der neu synthetisierten viralen DNAs in den einzelnen Ansätzen mit Hilfe der quantitativen Gag-PCR gemessen. Im Falle der U87/CD4/X4-Zellen wurden pro PCR-Ansatz 100 ng zelluläre DNA eingesetzt, im Falle der GHOST/X4-Zellen 250 ng. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen Infektionen, dargestellt als Anzahl gemessener Gag-Moleküle.



Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 2.15B dargestellt. Auch 48 Stunden nach der Infektion ist ein deutlicher Unterschied in der Menge an viraler DNA in infizierten GHOST/X4-Zellen zu sehen. In GHOST/X4-Zellen, die mit restringierten Partikeln infiziert wurden (graue Balken), ist ca. 100mal weniger virale DNA nachweisbar, als in Zellen, die mit nicht-restringierten Partikeln infiziert wurden (schwarze Balken). Der Wert für die restringierten Env35R2-Partikel ist allerdings eine logarithmische Einheit größer als die der übrigen restringierten Partikel. Er liegt im gleichen Bereich wie die Werte der nicht-restringierten Partikel Env42 und Env42S. Aber auch für die aus der Referenzzelllinie U87/CD4/X4 isolierte virale DNA der Env35R2-Partikel konnten ca. 10mal mehr Gag-DNA-Moleküle gemessen werden als bei den anderen getesteten viralen Partikeln. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass für Env35R2-Partikel ein Fehler bei der Titerbestimmung gemacht worden ist und deshalb U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen mit mehr als 5000 infektiösen Einheiten infiziert worden sind, wodurch die größeren Werte in der quantitativen PCR entstanden sind. Die für alle anderen viralen Partikel in U87/CD4/X4-Zellen detektierten Mengen an Gag-DNA liegen wie erwartet in etwa im gleichen Bereich. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass auch 48 Stunden nach der Infektion in GHOST/X4-Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen der Menge an viraler DNA von restringierten und nicht restringierten Partikeln besteht, weshalb eine Verzögerung der reversen Transkription ausgeschlossen werden kann. Dies bedeutet, dass die Restriktion der Infektion von Env35-Partikeln in GHOST/X4-Zellen vor (oder während) der reversen Transkription stattfindet.

### **2.3 Versuche zur Aufklärung des Mechanismus der Restriktion**

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur Aufklärung des Mechanismus der Restriktion gemacht. Die auf GHOST/X4-Zellen beobachtete Restriktion von viralen Partikeln ist abhängig vom Hüllprotein, und obwohl gezeigt werden konnte, dass Partikel, die eine Restriktion zeigen, 2 bis 4fach schlechter in das Zytosol der Zelle gelangen, muss noch ein anderer Schritt im Replikationszyklus beeinträchtigt sein, der zu dem beobachteten 60fachen Unterschied bei der Proteinexpression führt. Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigen, dass die Restriktion vor der reversen Transkription stattfinden muss. Dies wirft die Frage auf, wie das Hüllprotein einen Prozess nach der Fusion innerhalb der Zelle beeinflussen kann. Um einen ersten Hinweis auf die unterschiedliche Wirkungsweise von restringiertem und nicht restringiertem Hüllprotein zu bekommen wurde untersucht, ob Env35 dominant über Env42S ist. Weiterhin wurde durch Präinkubationsversuche der Einfluss von Env42S-Partikeln auf die Infektion von Env35-Partikeln untersucht und die Aktivierung von MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) durch diese Viren analysiert.

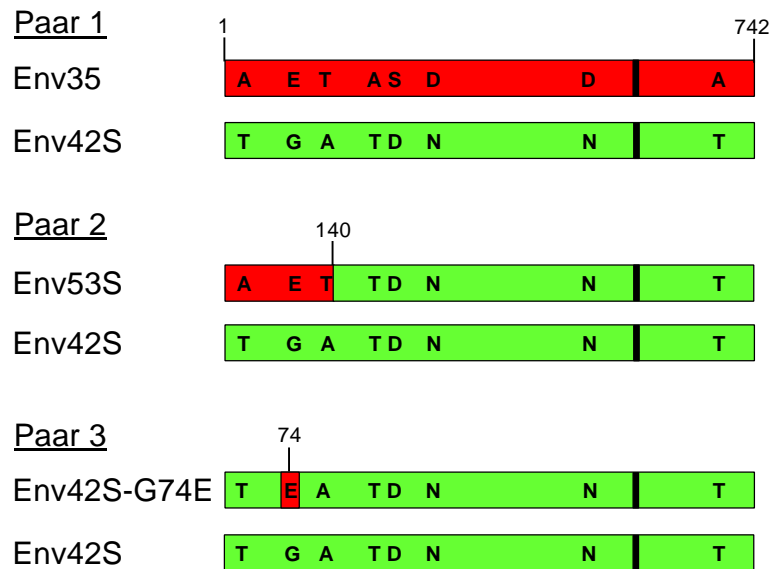
### **2.3.1 Die Anwesenheit von Env42S in Env35-Partikeln reduziert deren Restriktion drastisch**

Zunächst sollte geklärt werden, ob Env35 dominant-negativ über Env42S ist. Dazu wurde untersucht, ob durch die Anwesenheit von Env42S die Restriktion von Env35-Partikeln vermindert oder aufgehoben werden kann. Es wurden gemischte pseudotypisierte Partikel hergestellt, die sowohl restringiertes Hüllprotein (Env35, Env53S oder Env42S-G74E) als auch das nicht-restringierte Env42S in unterschiedlichen Mengenverhältnissen in ihrer Membranhülle besitzen (Abb. 2.16A). Dazu wurden bei der Herstellung der viralen Partikel die Hüllprotein-Expressionsplasmide im Mengenverhältnis 1:10, 1:1 und 10:1 zueinander kotransfiziert. Anschließend wurden U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen mit diesen viralen Partikeln infiziert. Abbildung 2.16B zeigt die Ergebnisse dieser Infektionsstudien als Quotient aus Anzahl infizierter U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen. Der Quotient aus der Infektion mit Env42S-Partikeln diente als Referenz und wurde =1 gesetzt. Daraus ergab sich für die gemischten pseudotypisierten Partikel eine relative Restriktion auf GHOST/X4-Zellen. Zum Vergleich sind zusätzlich die für Env35-, Env53S- und Env42S-G74E-Partikel ermittelten Restriktionen aus Kapitel 2.1 dargestellt. Bei den gemischten viralen Partikeln mit den Hüllproteinpaaren 1 und 2 wird die Restriktion im Vergleich zu Env35- bzw. Env53S-Partikeln schon in der Anwesenheit von nur 1/10 Env42S um mindestens die Hälfte reduziert (von 60fach auf 30fach bei Paar1 und von 56fach auf 20fach bei Paar2). Sind die Hüllproteine in gleichen Mengen im Partikel vertreten, reduziert sich die Restriktion noch drastischer, nämlich von 60fach auf 8fach bei Paar 1 und von 56fach auf 4fach bei Paar 2. Macht das nicht-restringierte Env42S 90% der Hüllproteine in den gemischten Partikel aus, so zeigen sie keine wesentliche Restriktion mehr (3fache Restriktion bei Paar 1 und 2fache bei Paar 2). Bei viralen Partikeln mit dem Hüllproteinpaar 3 nimmt die Veränderung der Restriktion einen ähnlichen Verlauf wie bei Paar 1 und 2, jedoch wird hier bei der Anwesenheit von 10% Env42S noch keine Reduktion der Restriktion im Vergleich zu Env42S-G74E-Partikeln erreicht (18fache und 27fache Restriktion). Erst bei einem Mengenverhältnis der Hüllproteine von 1:1 wird die anfängliche Restriktion um mehr als die Hälfte reduziert (von 18fach auf 8fach). Bei einem Mengenverhältnis von 90% Env42S und 10% Env42S-G74E, ist wie bei den Hüllproteinpaaren 1 und 2 nur noch eine geringe Restriktion zu erkennen (3fach). Zusammenfassend kann man sagen, dass schon ein geringer Anteil Env42S (10% im Vergleich zum restringierten Hüllprotein) in den Partikeln deren Restriktion in GHOST/X4-Zellen drastisch vermindern kann. Dies zeigt, dass Env35 nicht dominant über Env42S ist.

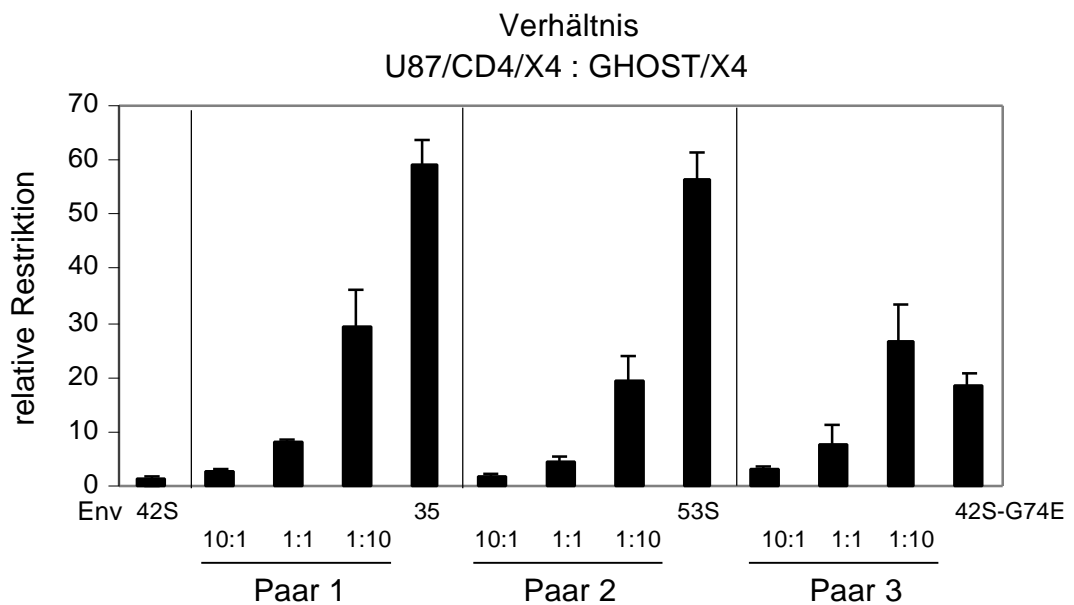
### **2.3.2 Die Infektionseffizienz von Env35-Partikeln wird nicht signifikant durch die Präinkubation von GHOST/X4-Zellen mit Env42S-Partikeln gesteigert**

Im folgenden wurde untersucht, ob die Anwesenheit von Env42S die Restriktion von Env35-Partikeln auch aufheben oder vermindern kann, wenn es sich nicht auf dem selben Viruspartikel befindet. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Hüllproteine Vorgänge im Inneren der Zelle beeinflussen können, indem sie mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren und dadurch Signalkaskaden in

**A**



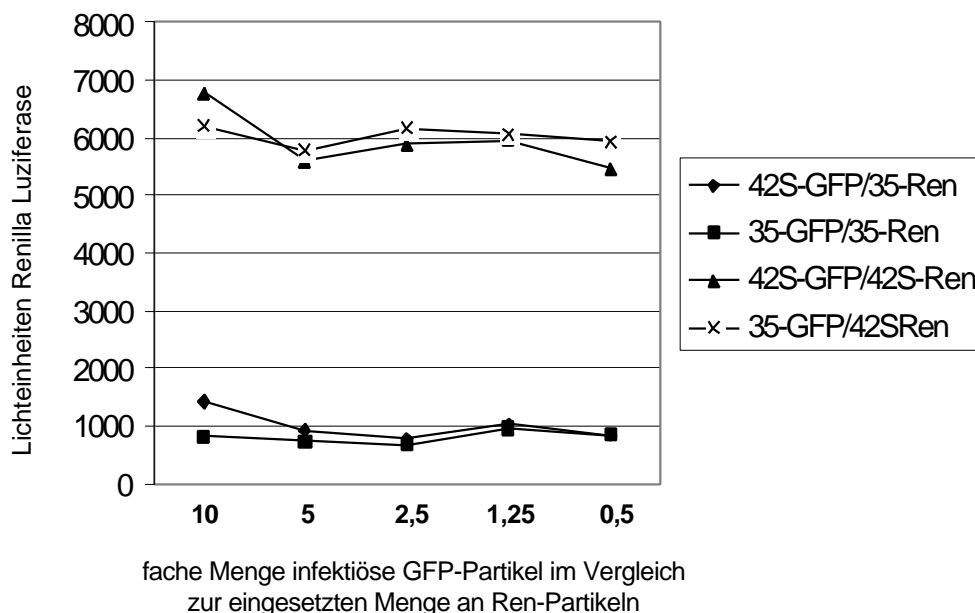
**B**



**Abb. 2.16** Infektionsstudien mit pseudotypisierten Partikeln, die zwei verschiedene Hüllproteine besitzen. **A** Schematische Darstellung der benutzten Hüllprotein-Paare. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind durch die entsprechenden Großbuchstaben (Ein-Buchstaben-Kode) dargestellt. Zur Verdeutlichung sind Regionen, die aus Env35 stammen, rot dargestellt, Bereiche in grün stammen von Env42. **B** Infektionsstudien mit viralen Partikeln, die mit den Hüllprotein-Paaren aus A in den angegebenen Verhältnissen pseudotypisiert wurden. Als Vergleich dienen Infektionen mit viralen Partikeln, die nur ein entsprechendes Hüllprotein besitzen. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Infektionen, dargestellt als Quotienten aus der Anzahl infizierter U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen. Der Quotient für Env42S-Partikel wurde =1 gesetzt, somit ergibt sich für die restlichen viralen Partikel eine relative Restriktion auf GHOST/X4-Zellen.

der Zelle auslösen, die die Infektion in positiver oder negativer Weise beeinflussen können (vgl. Kapitel 1.2.8). Dieser Versuch soll Aufschluss darüber geben, ob Env42S im Gegensatz zu Env35 fähig ist, Signalkaskaden zu aktivieren, und somit eine Restriktion in GHOST/X4-Zellen umgehen bzw. aufheben kann.

Bevor GHOST/X4-Zellen mit gleichbleibenden Mengen an Env35-Partikeln infiziert wurden, die das Renilla-Luziferase Gen als Reporter in ihrem Genom besaßen (Env35-Ren-Partikel), wurden sie vier Stunden lang mit unterschiedlichen Mengen an Env42S-Partikeln inkubiert, die GFP als Reporter gen in ihrem Genom besaßen (Env42S-GFP-Partikel). Dabei hatte die höchste eingesetzte Menge an GFP-Partikeln etwa 10mal mehr infektiöse Einheiten als die eingesetzten Ren-Partikel. Nach drei Tagen wurde die Infektion der GHOST/X4-Zellen mit Hilfe eines Luziferase Reporter Assays ausgewertet. Dadurch wurden nur Infektionsereignisse gemessen, die durch Viren mit Renilla-Luziferase als Reporter verursacht wurden. Die Infektion mit den GFP-Viren wurde nicht erfasst. Auf diese Weise kann man beobachten, wie die Inkubation von GHOST/X4-Zellen mit Env42S-GFP-Partikeln die Infektion mit Env35-Ren-Partikeln beeinflusst. Abbildung 2.17 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches als Stärke der Infektion mit Renilla-Luziferase-Partikeln in Abhängigkeit der Menge an GFP-Partikeln, mit denen die Zellen präinkubiert wurden. Als Kontrollen wurden die Kombinationen Env35-GFP/Env35-Ren, Env35-GFP/Env42S-Ren und Env42S-GFP/Env42S-Ren getestet. Durch die



**Abb. 2.17** Infektionsstudien zur Beurteilung des Einflusses von Env42S-Partikeln auf die Infektionseffizienz von Env35-Partikeln in GHOST/X4-Zellen. GHOST/X4-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen von Env42S-GFP-Partikeln (und als Kontrolle mit Env35-GFP-Partikeln) präinkubiert, und anschließend mit gleichbleibenden Mengen an Env35-Ren-Partikeln (als Kontrolle Env42S-Ren-Partikel) infiziert. Dargestellt ist die Infektionseffizienz der Ren-Partikel in Abhängigkeit der Menge an GFP-Partikeln, mit der die GHOST/X4-Zellen präinkubiert wurden. Die Infektionseffizienz der Ren-Partikel wurde über die Aktivität der in infizierten Zellen exprimierten Renilla-Luziferase gemessen.

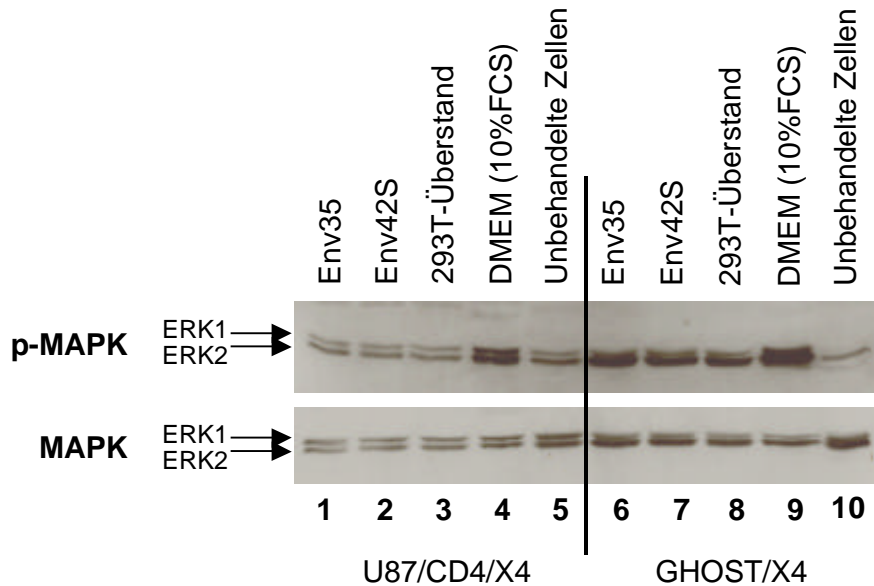
Präinkubation der GHOST/X4-Zellen mit Env42S-GFP-Partikeln wurde die Infektion mit Env35-Ren-Partikeln im Vergleich zur Kontrolle Env35-GFP/Env35-Ren nur geringfügig und auch nur bei der höchsten der getesteten Virusmengen gesteigert. Außerdem wurde die Infektion mit Env42S-Ren-Partikeln in gleicher Weise durch die Vorinkubation mit Env42S-GFP-Partikeln gesteigert. Um auszuschließen, dass nach 4 Stunden Präinkubation ein von Env42S möglicherweise induzierter Effekt nicht mehr wirkt, wurde der Versuch wiederholt, wobei GFP- und Renilla-Partikel gleichzeitig auf die GHOST/X4-Zellen gegeben wurden. Aber auch bei gleichzeitiger Inkubation der GFP- und Renilla-Partikel konnte keine wesentliche Steigerung der Infektion beobachtet werden (ohne Abbildung). Dies bedeutet, dass die Präinkubation mit Env42S-GFP im Vergleich zur Präinkubation mit Env35-GFP die Infektionseffizienz von sowohl Env35-Ren- als auch Env42S-Ren-Partikeln nur geringfügig steigern kann, wobei eine Beteiligung von durch Env42S induzierten Signalkaskaden nicht ausgeschlossen werden kann. Der Effekt ist jedoch nicht stark genug, um die Restriktion der Env35-Partikel im Vergleich zu Env42S-Partikeln aufzuheben.

### **2.3.3 Die Inkubation von GHOST/X4-Zellen mit Env35- und Env42S-Partikeln führt nicht zur unterschiedlichen Aktivierung von MAP-Kinase**

In diesem Versuch wurde mit molekularbiologischen Methoden untersucht, ob die Inkubation mit Env35-Partikeln (zeigen eine Restriktion) und Env42S-Partikeln (zeigen keine Restriktion) zu einer unterschiedlichen Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 (*extracellular-signal regulated kinase 1*; p44 MAPK) und ERK2 (*extracellular-signal regulated kinase 2*; p42 MAPK) in U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen führt. Diese MAPKs (*mitogen activated protein kinase*) werden durch eine Vielzahl extrazellulärer Signale wie Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine stimuliert und sind an der Regulation der Zellproliferation, -differenzierung und -entwicklung beteiligt. Ihre Stimulation könnte demzufolge den Aktivierungsstatus der Zelle und/oder die HIV-Replikation in der Zelle beeinflussen. Zahlreiche Studien zeigen außerdem, dass gp120 durch Interaktion mit den Rezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5 diese MAPKs aktivieren kann (Kinet et al., 2002; Stantchev und Broder, 2001; Popik et al., 1998; Misse et al., 1999).

U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen wurden 30 Minuten lang mit gleichen Mengen an viralen Partikeln (gemessen am RT-Gehalt des Virusstocks) inkubiert, und anschließend im ECL-Western Blot (anti MAPK und anti p-MAPK) auf die Expression von phosphorylierter MAPK untersucht. Die benutzten Virusstocks sind in Medium mit nur 0,1% FCS produziert worden. Die U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen sind vor der Stimulation mit Virus 24 Stunden in Medium mit 0,1% FCS gehalten worden. Als Negativkontrollen für die Aktivierung der MAPK dienten Zellen die nicht stimuliert wurden („unbehandelte Zellen“), und Zellen, die mit Zellkulturüberstand (0,1% FCS) von untransfizierten 293T inkubiert wurden („293T Überstand“). Als Positivkontrolle diente Zellkulturmedium mit 10%FCS. Abbildung 2.18 zeigt, dass das von der Positivkontrolle erzeugte Signal (phosphorylierte MAPK) sowohl in U87/CD4/X4- als auch in GHOST/X4-Zellen deutlich stärker ist (Spur 4 und 9), als das von den beiden Negativkontrollen induzierte Signal (Spur 3, 5, 8 und 10). Die Inkubation mit Env35 und Env42S-Partikeln ergibt jedoch in beiden Zelllinien keine unterschiedliche Aktivierung der MAPK, die

Banden der p-MAPK haben jeweils die gleiche Stärke (Spur 1, 2, 6 und 7). Weiterhin löst die Inkubation mit den viralen Partikeln überhaupt keine spezifische Phosphorylierung der MAPK, da in beiden Zelllinien die von der Negativkontrolle „293T-Überstand“ erzeugte p-MAPK-Bande genauso stark ist (Spur 3 und 8). Als Ladungskontrolle wurden die gleichen Proben ebenfalls im Western Blot mit einem Antikörper gegen unphosphorylierte (nicht aktivierte) MAPK analysiert. Somit konnte dieser Versuch keinen Hinweis darauf geben, dass Env35 und Env42S eine unterschiedliche Aktivierung von MAPK induzieren.



**Abb. 2.18** ECL-Western Blot (anti p-MAPK und anti MAPK) zur Bestimmung des Aktivierungsstatus von MAPK in U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen nach Inkubation mit Env35- bzw. Env42S-Partikeln. Vor der Inkubation wurden die Zellen 24 Stunden in DMEM- Medium mit 0,1% FCS gehalten. Die zur Inkubation benutzen Überstände und Virusstocks enthielten mit Ausnahme der Positivkontrolle (DMEM, 10% FCS) ebenso nur 0,1% FCS.

### 3. Diskussion

Die Erforschung von Restriktionen der HIV-Infektion hat eine große Bedeutung für die Aufklärung und das Verständnis von Virus-Zell-Interaktionen. Restriktionen erleichtern die Identifikation von zellulären Interaktionspartnern und für das Virus essentielle Strategien, welche wiederum neue Ansatzpunkte für eine antivirale Therapie liefern. McKnight et al. (2001) konnten eine zuvor noch nicht beschriebene Restriktion der HIV-2-Infektion auf humanen Zelllinien und humanen Primärzellen aufzeigen. Das primäre HIV-2-Isolat prCBL23 zeigt im Vergleich zum T-Zell-adaptierten Isolat CBL23 eine signifikant reduzierte Infektionseffizienz in GHOST/X4 und HeLaP4-Zellen, während bei der Infektion von U87/CD4/X4 keine bedeutenden Unterschiede bestehen (vgl. Abb. 1.7). Weiterhin kann prCBL23 im Gegensatz zu CBL23 nicht in Makrophagen replizieren. Das interessante dabei ist, dass diese Restriktion der HIV-Infektion in humanen Zellen stattfindet. Dies unterscheidet sie von den HIV-Restriktionen, die in Zellen anderer Spezies wie z.B. Affen beobachtet werden können, für die z.B. die zellulären Faktoren Lv1 und Ref1 verantwortlich sind (siehe Kapitel 1.3.1.3). Die hier zu untersuchende Restriktion von HIV findet in den Zellen seines natürlichen Wirtes statt. Weiterhin exprimieren diese Zellen die für die HIV-Infektion benötigten Rezeptoren CD4 und CXCR4. Außerdem teilen sie sich (außer Makrophagen) aktiv, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass sie in einem ruhenden, inaktivem Zustand verweilen, der keine Virusreplikation zulässt. All dies deutet darauf hin, dass diese Zellen, die die beschriebene Restriktion vermitteln, antivirale Eigenschaften besitzen. Dabei muss zwischen den HIV-2 Isolaten CBL23 und prCBL23 ein Unterschied bestehen, der dafür verantwortlich ist, dass CBL23 in diesen Zellen im Gegensatz zu prCBL23 nicht restringiert wird. Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß das Hüllprotein von prCBL23 an der Ausprägung dieser Restriktion beteiligt ist. Um der Aufklärung des Mechanismus der Restriktion näher zu kommen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit analysiert, in welcher Phase des Replikationszyklus sich die Restriktion erstmals manifestiert. Auf den Ergebnissen dieser Fragestellungen aufbauend, wurden im dritten Teil weitere Versuche zur Aufklärung des Mechanismus der Restriktion durchgeführt.

#### 3.1 Charakterisierung der Hüllproteine

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Hüllproteine der HIV-2 Isolate prCBL23 und CBL23 für die von McKnight et al. (2001) beobachtete Restriktion in bestimmten humanen Zelllinien verantwortlich sind. Um die Hüllproteine charakterisieren zu können, wurden pseudotypisierte virale Partikel hergestellt, die entweder ein von prCBL23 stammendes Hüllprotein (prCBL23-Env bzw. Env35) oder ein von CBL23 stammendes Hüllprotein besaßen (CBL23-Env bzw. Env42). In Infektionsstudien mit diesen viralen Partikeln konnte beobachtet werden, dass Env35-Partikel im Vergleich zu Env42-Partikeln eine 60fache Restriktion der Infektion in GHOST/X4-Zellen zeigen. In HeLaP4-Zellen konnte dagegen keine Restriktion festgestellt werden (Abb. 2.3). Daraus lässt sich schließen, dass das Hüllprotein Env35 für die Restriktion der Infektion in GHOST/X4-Zellen

verantwortlich ist, da sich die beiden getesteten viralen Partikel Env35 und Env42 nur im Hüllprotein unterscheiden.

Die von McKnight et al. (2001) beschriebene Restriktion von prCBL23 in GHOST/X4-Zellen lässt sich also mit viralen Partikeln reproduzieren, die das Hüllprotein von prCBL23 tragen. Dies bedeutet, dass das Hüllprotein zumindest im Fall der pseudotypisierten Partikel für die Restriktion in GHOST/X4-Zellen verantwortlich ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bei der mit dem Isolat prCBL23 beobachteten Restriktion noch andere virale Faktoren beteiligt sind. Da die Restriktion von Env35-Partikeln ähnlich stark ausgeprägt ist, wie die von prCBL23 (ca. 60fach im Vergleich zu CBL23, vgl. Abb. 1.7), scheint das Hüllprotein aber zumindest bei GHOST/X4-Zellen der entscheidende Faktor für die Restriktion zu sein. In HeLaP4-Zellen konnte die mit den Isolaten beobachtete Restriktion nicht mit den pseudotypisierten Partikeln reproduziert werden. Das heißt, dass das Hüllprotein nicht der entscheidende Faktor für die Restriktion auf HeLaP4-Zellen ist. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass Env35 an der Ausprägung der Restriktion beteiligt ist, scheint hier ein anderer viraler Faktor essentiell zu sein. Gleichzeitig bedeutet dies aber, dass die von McKnight et al. (2001) beobachteten Restriktionen in GHOST/X4- und HeLaP4-Zellen wahrscheinlich nicht demselben Mechanismus unterliegen, sondern abhängig vom Zelltyp unterschiedliche virale Faktoren beteiligt sind, oder die beteiligten Faktoren eine unterschiedlich starke Rolle beim jeweiligen Zelltyp spielen. Diese Annahme wird auch von den kürzlich publizierten Beobachtungen von Schmitz et al. (2004) unterstützt. In Infektionsstudien mit HeLaP4-Zellen und molekularen Klonen der beiden Isolate prCBL23 (MCR = *molecular clone restricted*) und CBL23 (MCN = *molecular clone non-restricted*) konnte festgestellt werden, dass neben dem Hüllprotein auch das Gag-Protein eine wichtige Rolle für die Restriktion spielt. Erst durch den gleichzeitigen Einbau der Hüllprotein-Sequenz und der Gag-Sequenz von MCR in das provirale Genom von MCN konnte eine signifikante Restriktion von MCN in HeLaP4-Zellen beobachtet werden (Schmitz et al., 2004). Dies bestätigt die Vermutung, dass die Restriktion von Env35-Partikeln auf HeLaP4-Zellen nicht alleine durch das Hüllprotein vermittelt werden kann, sondern noch weitere virale Faktoren (z.B. Gag) benötigt werden.

Im Folgenden sollte geklärt werden, welche Unterschiede innerhalb der beiden Hüllproteine Env35 und Env42 für die Restriktion von Env35-Partikeln auf GHOST/X4-Zellen verantwortlich sind. In Kapitel 2.1.3 wurde die Bedeutung des vorzeitigen Stop-Kodons und der daraus resultierenden verkürzten zytoplasmatischen Domäne von Env35 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Aufhebung des vorzeitigen Stop-Kodons in Env35 (Env35R) die Restriktion von 60 auf 15fach vermindert wird (Abb. 2.4). Das gleiche Ergebnis wird erzielt, wenn man die zytoplasmatische Region von Env35 mit der von Env42 austauscht (Env35R2). Die Länge der zytoplasmatischen Domäne von Env35 hat also einen gewissen Einfluss auf die Restriktion. Wird jedoch in Env42 an gleicher Stelle wie bei Env35 ein vorzeitiges Stop-Kodon eingeführt, so zeigen virale Partikel mit dem verkürzten Hüllprotein Env42S ebenso wie Env42-Partikel mit dem langen Hüllprotein keine Restriktion. Dies bedeutet, dass die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne nicht die kritische Determinante für die Restriktion von Env35-Partikeln auf GHOST/X4-Zellen ist. Somit scheint der für die Restriktion kritische Bereich im extrazellulären Teil des Hüllproteins zu liegen und die zytoplasmatische Domäne nur ein sekundärer Faktor zu sein. Wenn diese kritische Determinante vorhanden ist, so verstärkt das



Fehlen der zytoplasmatischen Domäne die Restriktion nochmals (Env35 im Vergleich zu Env35R2), doch die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne führt alleine nicht zur Restriktion (Env42S).

In Kapitel 2.1.4 konnte durch Infektionsstudien mit pseudotypisierten Partikeln, deren Hüllproteine verschiedene Chimären aus Env35 und Env42 waren, die für die Restriktion kritische Determinante auf den aminoterminalen Bereich der Oberflächendomäne des Hüllproteins eingegrenzt werden. Alle Hüllprotein-Konstrukte, die die aminoternale Region von Env35 besitzen (Env13S, Env33S, Env53S, Env33 und Env53) vermitteln eine Restriktion der Infektion in GHOST/X4-Zellen (Abb. 2.5). Durch den Vergleich von Env33 mit Env33S und Env53 mit Env53S wird wiederum deutlich, dass die Aufhebung des Stop-Kodons, und damit die Verlängerung der zytoplasmatischen Domäne, eine Verminderung der Restriktion bewirkt. Bei Hüllproteinen, die den aminoterminalen Bereich von Env42 besitzen und damit keine Restriktion zeigen, hat die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne jedoch keinen Einfluss auf die Restriktion (Env41S, Env24S, Env63S). Dies bestärkt die Annahme, dass die Länge der zytoplasmatischen Domäne nur eine untergeordnete Rolle für die Restriktion spielt, während die essentielle Determinante der Restriktion im aminoterminalen, extrazellulären Bereich des Hüllproteins liegt. In diesem Bereich unterscheiden sich die prozessierten Hüllproteine Env35 und Env42 in nur zwei Aminosäuren an den Positionen 74 und 111. Das bedeutet, dass entweder Position 74, 111 oder beide zusammen die Restriktion vermitteln müssen. Durch den gegenseitigen Austausch dieser Aminosäuren zwischen Env35 und Env42 konnte Aminosäure 74 als kritische Determinante bestimmt werden (Kapitel 2.1.5). Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Alanin gegen Threonin an Position 111 in Env42 bzw. Env42S keinen Effekt hat (Abb. 2.6). Die entsprechenden pseudotypisierten Partikel Env42-A111T und Env42S-A111T zeigen keine Restriktion auf GHOST/X4-Zellen. Ersetzt man jedoch an Position 74 in Env42 bzw. Env42S Glycin durch Glutaminsäure, die Aminosäure an Position 74 in Env35, so zeigen die entsprechenden Env42S-G74E- und Env42-G74E-Partikel eine 18 bzw. 8fache Restriktion. Auch hier führt die lange zytoplasmatische Domäne zu einer verminderten Restriktion. Umgekehrt bewirkt das Einsetzen von Glycin an Position 74 von Env35 (=Env35-E74G) fast die komplette Aufhebung der Restriktion (von 60 auf 2fach). Dies bedeutet, dass die Aminosäure Glutaminsäure an Position 74 von Env35 die kritische Determinante der Restriktion von Env35-Partikeln auf GHOST/X4-Zellen ist. Wird sie durch Glycin aus Env42 ersetzt, wird die Restriktion von Env35-Partikeln weitestgehend aufgehoben. Die 18fache Restriktion von Env42S-G74E-Partikeln ist gegenüber der von Env35- und Env53S-Partikeln (60 und 58fach) jedoch deutlich geringer. Obwohl mit Env42-A111T- und Env42S-A111T-Partikeln keine Restriktion gesehen werden konnte, könnte dies bedeuten, dass die Aminosäure an Position 111 einen additiven Effekt hat, der nur im Zusammenhang mit Position 74 (Env53S) eine Auswirkung auf die Restriktion hat, aber alleine (Env42-A111T und Env42S-A111T) keine. Zusammenfassend bedeutet dies, dass die für die Restriktion von Env35-Partikeln in GHOST/X4-Zellen kritische Determinante die Aminosäure Glutaminsäure an Position 74 (E74) ist. Eine in Bezug auf die Stärke der Restriktion unterstützende Wirkung der Aminosäure an Position 111 kann nicht ausgeschlossen werden. Sie kann aber nur in Anwesenheit der kritischen Determinante E74 wirken. Ebenfalls nur in Anwesenheit von E74 wirkt sich auch die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne aus. Sie kann die Restriktion deutlich verstärken (vgl. Env35 mit Env35R/2; Env33S mit Env33; Env53S mit Env53), sie aber nicht alleine auslösen (vgl. Env42 mit Env42S; Env24 mit Env24S).

Da sich in der unmittelbaren Nähe der kritischen Position 74 eine potentielle Glykosylierungsstelle (g71) befindet und Glykosylierungen die Eigenschaften des Hüllproteins maßgeblich beeinflussen können (Lee et al. 1992a und b, Pollakis et al. 2001, Ogert et al. 2001, Kolchinsky et al. 2001), wurde ihre Rolle bei der Restriktion untersucht. Ein Austausch der Aminosäuren an Position 74 könnte eine lokale Änderung der Struktur des Hüllproteins nach sich ziehen, und damit die Verfügbarkeit dieser Glykosylierungsstelle beeinflussen. Eine veränderte Glykosylierung könnte sodann die Interaktionseigenschaften des Proteins mit anderen Molekülen beeinflussen. Um die Bedeutung der Glykosylierungsstelle bewerten zu können, wurde das Motiv NVT sowohl in Env35 als auch in Env42S durch QVT ersetzt, das keine Glykosylierung mehr erlaubt. Es konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten der potentiellen Glykosylierungsstelle in keinem der beiden Hüllproteine die Restriktion wesentlich beeinflusst (Abb. 2.7). Env42Sg71ko-Partikel zeigen genauso wie Env42S-Partikel keine Restriktion, was bedeuten könnte, dass Env42S an dieser Stelle generell nicht glykosyliert wird, oder dass der Verlust der Glykosylierung die Restriktion auf GHOST/X4-Zellen nicht auslöst. Env35g71ko-Partikel zeigen eine 40fache Restriktion in GHOST/X4-Zellen. Diese ist im Vergleich zur Restriktion von Env35-Partikel (60fach) zwar etwas reduziert, aber nicht signifikant genug, um die Aussage treffen zu können, dass ein Verlust der Glykosylierung in Env35 die Restriktion aufheben kann. Es ist zwar nicht auszuschließen, dass eine potentielle Glykosylierung an Position 71 im Hüllprotein einen Einfluss auf die Restriktion hat, doch ist sie nicht der Auslöser der Restriktion, sonst hätte man eine deutlichere Reduktion der Restriktion von Env35g71ko-Partikeln erwartet. Es ist hinzuzufügen, dass nicht bekannt ist, ob die Hüllproteine Env35 und Env42 überhaupt an dieser Stelle glykosyliert werden. Aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse ist jedoch eine Beteiligung der Glykosylierungsstelle g71 an der Ausprägung der Restriktion unwahrscheinlich.

Eine wichtige Frage, die sich aus den hier gewonnenen Ergebnissen ergibt, ist, wie ein einzelner Aminosäureaustausch im extrazellulären Teil vom Hüllprotein die Infektion beeinflussen kann. Glycin und Glutaminsäure haben sehr unterschiedliche physikalische und biochemische Eigenschaften. Während Glutaminsäure eine saure Aminosäure und negativ geladen ist und eine große Seitenkette besitzt, ist Glycin ungeladen und hat keine Seitenkette. Aufgrund seiner großen Seitenkette findet man Glutaminsäure häufig in  $\alpha$ -helikalen Anordnungen, Glycin kommt dagegen häufiger in dichter gepackten Strukturen wie dem  $\beta$ -Faltblatt vor. Weil ihm eine Seitenkette fehlt, erlaubt es außerdem die Ausbildung verschiedener Konformationen der Polypeptidkette. Somit könnte der Austausch von Glycin gegen Glutaminsäure die Struktur des Hüllproteins lokal verändern, insbesondere, da sich die Positionen 74 und 111 nicht in einer variablen Schleife befinden und somit die Struktur in den konservierten Regionen beeinflussen könnten, die das Rückgrat des Hüllproteins bilden (Kwong et al. 1998). Dadurch könnte die Interaktion des Hüllproteins mit bestimmten zellulären Proteinen maßgeblich beeinflusst werden, was wiederum einen Einfluss darauf haben könnte, ob ein Virus eine Restriktion der Infektion erfährt oder nicht. Durch Studien mit neutralisierenden Antikörpern konnten für das HIV-1 gp120 eine Reihe von Epitopen bzw. Aminosäuren identifiziert werden, die wichtig für die Rezeptor-Bindung sind (zusammengefasst bei Wyatt et al., 1998). So scheinen z.B. Asn 88 und Asp 113 unter vielen anderen Aminosäuren wichtig für die gp120-CD4 Bindung, und z.B. Asn 88, Lys 117 und Lys 121 wichtig für die Korezeptorbindung zu sein (Nummerierung nach der Aminosäuresequenz des HXBc2 (IIIB) gp120). Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte kritische

Aminosäure an Position 74 (und 111; Nummerierung nach der Aminosäuresequenz des CBL23 Hüllproteins) liegt im gleichen Bereich des Hüllproteins wie die genannten Aminosäuren. Da die Struktur und Rezeptorbindebereiche zwischen den Hüllproteinen von HIV-1 und HIV-2 stark konserviert sind (Kwong et al., 1998; Rizzuto et al., 1998) könnte es durchaus sein, dass die unterschiedlichen Aminosäuren an Position 74 (und 111) in Env35 und Env42 einen Einfluss auf die CD4- und/oder Korezeptorbindung haben.

Sequenzvergleiche zwischen bekannten Hüllproteinen von HIV-2 ergaben, dass Glutaminsäure an Position 74, welche die beschriebene Restriktion vermittelt, in 31 von 42 beschriebenen Isolaten konserviert ist (HIV Sequence Database, <http://www.hiv.lanl.gov/>, Stand Januar 2004). Außerdem ist diese Aminosäure auch in allen 43 dort beschriebenen SIV-Isolaten konserviert. Dies könnte bedeuten, dass man die Beziehung zwischen prCBL23 und CBL23 aus einem anderen Blickwinkel betrachten muss. Nicht prCBL23 zeigt eine Restriktion im Vergleich zu CBL23, sondern das T-Zell-adaptierte CBL23 hat über die Dauer seiner Kultur an Position 74 im Hüllprotein die Aminosäure Glycin erworben, die ihm bei der Infektion bestimmter Zellen einen Vorteil gegenüber dem primären Isolat prCBL23 verschafft. Die Aminosäure Threonin an Position 111 in Env35 ist dagegen nicht so stark konserviert. Von 42 beschriebenen HIV-2 Isolaten exprimieren nur 4 Threonin an Position 111. 35 HIV-2 Isolate exprimieren dort Alanin, die entsprechende Aminosäure an Position 111 in Env42. Von 43 SIV-Isolaten besitzen dagegen 35 Threonin und 6 Alanin an der entsprechenden Position. Es wäre interessant, die Positionen 74 und 111 in einigen dieser Hüllproteine entsprechend auszutauschen und zu untersuchen, ob und in welcher Weise die Infektionseffizienz beeinflusst werden kann. Somit könnte die Relevanz dieser Aminosäureposition und des damit verbundenen Infektionsmechanismus für andere HIV-2 Isolate überprüft werden.

### **3.2 Lokalisation der Restriktion**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Restriktion auf Ebene der Proteinexpression beobachtet. Die Restriktion wurde daran gemessen, wie viele Zellen nach der Infektion mit Env35-Partikeln virale Proteine exprimieren. Im zweiten Teil der Arbeit sollte analysiert werden, in welcher Phase vor der Proteinexpression die Restriktion erstmals zu beobachten ist.

In Kapitel 2.2.1 wurde untersucht, ob die Ursache der Restriktion schon bei der Entstehung der viralen Partikel, genauer beim Einbau des Hüllproteins in die knospenden Partikel, zu finden ist. Um zu untersuchen, ob die auf GHOST/X4-Zellen beobachtete Restriktion das Ergebnis eines schlechten Einbaus der betreffenden Hüllproteine in die viralen Partikel ist, wurde die Menge an Hüllprotein in den verschiedenen Partikeln bestimmt und miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass kein Zusammenhang zwischen reduziertem Hüllprotein-Einbau und der Restriktion besteht. Einige der Hüllproteine, die eine Restriktion zeigen, werden sogar besser eingebaut als diejenigen, die keine Restriktion vermitteln (z.B. Env13; Env53S). Die Effizienz des Einbaus scheint zum einen von der Länge der zytoplasmatischen Domäne abzuhängen. Alle Hüllproteine mit einer verkürzten zytoplasmatischen Domäne werden 2 bis 6fach besser eingebaut als ihre entsprechenden Partner die keine Verkürzung haben (vgl. z.B. Env33 mit Env33S; Env53 mit Env53S). Dies könnte einerseits

durch das von Young et al. (1990) und Hunter (1994) vorgeschlagene Modell für den passiven Einbau von Hüllproteinen erklärt werden. Es postuliert, dass die viralen Hüllproteine anders als zelluläre Oberflächenmoleküle keine (oder nur wenige) Interaktionen mit anderen zellulären Molekülen eingehen. Dadurch können sie in der Zellmembran relativ ungehindert an den Ort der Virus-Knospung diffundieren und werden dort in die viralen Partikel eingebaut. In diesem Fall könnte ein Hüllprotein, das eine kürzere zytoplasmatische Domäne hat, noch besser diffundieren und würde deshalb effizienter eingebaut als eines mit einer langen zytoplasmatischen Domäne. Weiterhin könnten durch die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne des Hüllproteins auch Endozytose-Motive verloren gegangen sein, die die Internalisierung des Hüllproteins von der Plasmamembran regulieren. Dadurch würde sich die Menge an Hüllprotein in der Plasmamembran und infolgedessen auch der Einbau in knospende virale Partikel erhöhen. Die hier untersuchten verkürzten Hüllproteine besitzen zwar das in der Nähe der Transmembrandomäne gelegene Tyrosin-basierende Endozytosesignal, das die Internalisierung des Proteins von der Plasmamembran vermittelt (Berlioz-Torrent et al., 1999; Boge et al., 1998; Ohno et al., 1997). Andererseits fehlt ihnen aber das am C-Terminus gelegen Dileucin-Motiv, das ebenfalls Adapter-Proteine zur Rekrutierung in Clathrin-umhüllte Vesikel bindet (Wyss et al., 2001). Weiterhin scheinen noch Faktoren in der extrazellulären Domäne des Hüllproteins eine Rolle für den Einbau zu spielen, denn auch Hüllproteine mit gleich langer zytoplasmatischer Domäne werden teilweise unterschiedlich eingebaut (z.B. Env42S und Env24S; Env35R2 und Env42). Auch dies könnte durch das oben erwähnte Modell erklärt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Restriktionseigenschaften der verschiedenen pseudotypisierten Partikel nicht mit der jeweiligen Menge an Hüllprotein in diesen Viren korrelieren. Die Restriktion tritt unabhängig davon auf, wie viele Hüllproteine in ein virales Partikel eingebaut werden.

Da die hier beschriebene Restriktion vom Hüllprotein vermittelt wird, erschien es naheliegend, dass eine Störung des Zelleintritts von Env35-Partikeln zugrunde liegt. Um unterscheiden zu können, ob sich die Restriktion vor oder nach der Fusion des Viruspartikel mit der Zellmembran manifestiert, wurde im Kapitel 2.2.2 die Effizienz des Zelleintritts der verschiedenen pseudotypisierten Partikel mit Hilfe eines  $\beta$ -Lactamase-Reporter-Assays (BlaM-Assay) analysiert. Die Herstellung der für diesen Assay verwendeten Virusstocks wurde in Kapitel 2.2.2.1 optimiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kotransfektion von 0,5  $\mu$ g  $\beta$ -Lactamase-Vpr2-Expressionsplasmid bei der Produktion der viralen Partikel später die höchsten Werte im BlaM-Assay ergab (Abb. 2.11), obwohl, wie in Abbildung 2.10 gezeigt, der betreffende Virusstock weniger infektiöse Partikel enthielt als die Virusstocks, bei deren Herstellung nur 0,1  $\mu$ g bzw. 50 ng  $\beta$ -Lactamase-Vpr2-Expressionsplasmid kotransfiziert worden war. Dies kann dadurch erklärt werden, dass bei der Kotransfektion von größeren Mengen des  $\beta$ -Lactamase-Vpr2-Expressionsplasmid zwar einerseits die Produktion von viralen Partikeln reduziert wird. Andererseits kann aber mehr  $\beta$ -Lactamase-Vpr2-Fusionsprotein in die Partikel eingebaut werden, wodurch die Detektion des Viruseintritts im BlaM-Assay erleichtert wird.

In Kapitel 2.2.2.2 konnte mit dem BlaM-Assay gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede beim Eintritt in GHOST/X4-Zellen zwischen restringierten und nicht-restringierten Partikeln bestehen. Die viralen Partikel, die auf Ebene der Proteinexpression eine bis zu 60fache Restriktion in GHOST/X4-Zellen erfahren (Env35-, Env35R2-, Env53S- und Env42S-G74E-Partikel), zeigen beim Eintritt in GHOST/X4-Zellen nur eine 2 bis 4fache Restriktion im Vergleich zu Env42- und Env42S-

Partikeln (Abb. 2.12). Für die Negativkontrollen Env-minus-Partikel war kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen. Somit ist gewährleistet, dass nur Partikel gemessen wurden, die durch spezifische Interaktion ihres Hüllproteins mit den Rezeptoren CD4 und CXCR4 in die Zelle gelangt sind. Die unspezifische Aufnahme viraler Partikel (sowohl mit als auch ohne Hüllprotein) durch Endozytose wird in diesem Versuch ebenfalls nicht erfasst, da der Farbstoff CCF2 nicht in endozytotische Kompartimente gelangt (GeneBLAzer detection kits manual, Invitrogen; Schaeffer et al., 2004). Somit werden nur virale Partikel detektiert, die über CD4/CXCR4-vermittelte Fusion in das Zytoplasma der Zelle gelangt sind. Diese Ergebnisse bedeuten, dass sich die Hüllprotein-vermittelte Restriktion von Env35-Partikeln in GHOST/X4-Zellen nicht beim Eintritt des Virus in die Zelle, sondern erst nach der Fusion der Virus- mit der Zellmembran manifestiert. Ein 2 bis 4facher Unterschied zum Zeitpunkt der Fusion kann nicht den 60fachen Unterschied bei der Proteinexpression zwischen Env35- und Env42-Partikeln erklären. Dies schließt somit aus, dass durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Aminosäuren Glycin und Glutaminsäure an Position 74 in den Hüllproteinen Env35 und Env42 die Interaktion mit den Rezeptoren CD4 und CXCR4 so verändert wird, dass der Eintritt des Virus in die Zelle beeinflusst wird.

Um den Zeitpunkt des Auftretens der Restriktion noch besser eingrenzen zu können, wurde in Kapitel 2.2.3 untersucht, ob sich die mit den pseudotypisierten Partikeln beobachtete Restriktion der Infektion in GHOST/X4-Zellen vor oder nach der reversen Transkription des viralen Genoms manifestiert. U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen wurden infiziert und die Menge an viraler DNA in diesen Zellen durch quantitative PCR bestimmt. Die etablierte quantitative Gag-PCR hatte eine hohe Sensitivität. Bis zu  $10^1$  Moleküle Kontrollplasmid konnten noch reproduzierbar nachgewiesen werden (Abb. 2.14). Es konnte gezeigt werden, dass die Restriktion der Infektion in GHOST/X4-Zellen schon vor oder während der reversen Transkription stattfinden muss. Sechs Stunden nach der Infektion von GHOST/X4-Zellen konnten für virale Partikel, die eine Restriktion auf Ebene der Proteinexpression zeigen (Env35, Env13S, Env33S und Env53S), ca. 100mal weniger Gag-DNA-Moleküle gemessen werden, als für virale Partikel, die keine Restriktion auf Ebene der Proteinexpression erfahren (Env42, Env42S, Env42S und Env24S). Um auszuschließen, dass dieser Unterschied in der Menge an viralen DNA Produkten aufgrund einer Verzögerung der reversen Transkription zustande kommt, die sich zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion wieder ausgleicht, wurde die Menge an viraler DNA zusätzlich zu einem späteren Zeitpunkt nach der Infektion analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass auch 48 Stunden nach der Infektion ein ca. 100facher Unterschied in den Mengen an viraler Gag DNA gemessen werden konnte, je nachdem ob mit Env35-, Env35R2-, Env53S- und Env42S-G74E- (zeigen Restriktion) oder mit Env42- und Env42S- Partikeln (zeigen keine Restriktion) infiziert wurde. Dies bedeutet, dass der Unterschied in der Menge der gemessenen viralen DNA nicht durch eine Verzögerung der reversen Transkription entsteht, die sich zu einem späteren Zeitpunkt wieder ausgleicht. Daraus ist zu schließen, dass sich die Restriktion vor oder während der reversen Transkription manifestiert. Dies könnte zum einen bedeuten, dass aufgrund der Blockierung eines Schrittes nach der Fusion der Start der reversen Transkription erschwert wird. So könnte z.B. das Uncoating oder die Rekrutierung von zellulären Faktoren, die für die reverse Transkription benötigt werden, blockiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die reverse Transkription normal startet, aber die Stabilität der neu entstehenden proviralen DNA beeinträchtigt ist. Somit würde die

provirale DNA von viralen Partikeln, die eine Restriktion zeigen, schneller abgebaut, als die von viralen Partikeln, die keine Restriktion zeigen.

Aus den Ergebnissen dieses zweiten Teiles der Arbeit kann man schließen, dass sich die Restriktion von Env35-Partikeln in GHOST/X4-Zellen zu einem Zeitpunkt nach der Fusion und vor oder während der reversen Transkription manifestiert. Dies wird insofern durch die Beobachtungen von McKnight et al. (2001) unterstützt, als sie ebenfalls zeigen konnten, dass die Restriktion von prCBL23 in GHOST/X4-Zellen nach der Fusion und vor der Translokation des Präintegrationskomplexes in den Zellkern stattfindet. Allerdings konnten sie mit Hilfe einer quantitativen PCR beobachten, dass die Restriktion des Isolates prCBL23 erst nach der reversen Transkription stattfindet. Wie bereits erwähnt, muss man bedenken, dass im Falle des Isolates prCBL23 auch andere virale Faktoren außer dem Hüllprotein an der Restriktion beteiligt sein können (siehe HeLaP4-Zellen), die hier verwendeten pseudotypisierten Viren sich aber nur im Hüllprotein unterscheiden und außerdem das Kapsid eines Laborstammes besitzen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Restriktion von Env35-Partikeln in GHOST/X4-Zellen in der frühen Phase des Replikationszyklus manifestiert. Über diese Phase, die das *Uncoating*, die Zusammenlagerung des Präintegrationskomplexes, den Start der reversen Transkription und den Transports zum Zellkern umfasst, ist nur wenig bekannt. Um einen Hinweis darauf zu bekommen, welche Schritte der Virusreplikation beeinträchtigt sein könnten, wurde im dritten Teil der Arbeit untersucht, durch welchen Mechanismus das Hüllprotein eine Restriktion vermitteln kann, bei der nicht der Eintritt des Virus in die Zelle beeinträchtigt ist, sondern ein Schritt nach der Fusion und vor oder während der reversen Transkription.

### 3.3 Überlegungen zum Mechanismus der Restriktion

Aus den in den ersten beiden Teilen der Arbeit gewonnenen Erkenntnissen ergibt sich die Frage, wie das Hüllprotein eine Restriktion vermitteln kann, die nicht den Eintritt des Virus in die Zelle beeinträchtigt, und sich folglich erst nach der Fusion und vor oder während der reversen Transkription manifestiert. In der Literatur gibt es einige Hinweise, dass das Hüllprotein Einfluss auf Prozesse nach dem Viruseintritt in die Zelle haben könnte (vgl. Kapitel 1.2.9). Chackerian et al. (1997) berichteten von einem HIV-1 Isolat, das nach dem Eintritt in Makaken-Zellen vor oder nach der reversen Transkription blockiert wird. Die Restriktion der Infektion kann durch die Expression des humanen Korezeptors in diesen Zellen aufgehoben werden, wodurch eine Beteiligung des Hüllproteins an dieser Restriktion impliziert wird. Schmidtmayerova et al. (1998) berichteten von T-Zelllinien-adaptierten HIV-1 Viren (X4-trop), die in primären humanen Makrophagen ebenfalls erst nach der Fusion zu einem Zeitpunkt nach der reversen Transkription blockiert werden, obwohl nachgewiesen wurde, dass der Tropismus von HIV-1 für Makrophagen bzw. T-Zellen vom Hüllprotein abhängig ist (R5- bzw. X4-trope Viren). Daraus wurde gefolgert, dass in Makrophagen frühe Fusionsereignisse bzw. die Interaktion des Hüllproteins mit seinem Korezeptor Einfluss auf die weitere Replikation des Virus in der Zelle haben. Dies führte zur Hypothese, dass die Hüllprotein-Korezeptor-Interaktion die Eintrittsroute des Virus in die Zelle beeinflusst, wodurch das Virus in verschiedene subzelluläre Kompartimente gelangen kann,

welche für die nach der Fusion folgenden Prozesse wie Uncoating und reverse Transkription unterschiedlich gute Bedingungen bieten. Auch bei den hier untersuchten Hüllproteinen Env35 und Env42 könnte eine unterschiedliche Interaktion mit einem Korezeptor dazu führen, dass die Viren in unterschiedliche zelluläre Kompartimente geschleust werden, ohne dass der Fusionsprozess selbst beeinflusst wird.

Eine weitere Möglichkeit, wie das Hüllprotein Prozesse nach der Fusion beeinflussen kann, ist die Aktivierung von Signalkaskaden (vgl. Kapitel 1.2.8). So konnte z.B. gezeigt werden, dass HIV-Hüllproteine durch Interaktion mit den Rezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5 Signalkaskaden in der Zelle auslösen können (Davis et al., 1997; Guillermin et al., 1998; Briant et al., 1998a und b; Popik and Pitha, 1996; Popik et al., 1998; Popik und Pitha, 2000a und b). Auch wenn die Notwendigkeit dieser Signale für die Replikation des Virus kontrovers diskutiert wird, könnte es sein, dass durch eine veränderte Affinität des Hüllproteins für solche an Signalkaskaden gekoppelte Rezeptoren, für die Infektion wichtige Signale verstärkt oder abgeschwächt werden. So könnte im Falle von Env42-Partikeln die Zelle z.B. durch Rekrutierung von zellulären Faktoren, Umstrukturierung des Zytoskeletts oder Aktivierung der Transkription auf eine Infektion vorbereitet werden, oder durch Signaltransduktion ein die Virusreplikation hemmender Faktor ausgeschaltet werden. Umgekehrt könnte die Anwesenheit von Env35 einen solchen Restriktionsfaktor aktivieren. Dass solche Restriktionsfaktoren, die die Replikation von Retroviren beeinträchtigen, existieren, wurde mehrfach berichtet (Towers et al. 2000; Cowan et al. 2002; Besnier et al. 2002; Munk et al. 2002; Hatzioannou et al. 2003; vgl. Kapitel 1.3). Aufgrund dieser Publikationen wird deutlich, dass offensichtlich sehr viele Säugetiere Restriktionsfaktoren gegen verschiedene Retroviren entwickelt haben, durch die sich teilweise auch die Spezifität der einzelnen Viren erklären lässt. So konnte gezeigt werden, dass der Restriktionsfaktor Fv1 murine Zellen vor einer Infektion mit MLV schützt (Best et al. 1996; Goff 1996). Ein ähnlicher Restriktionsfaktor Ref1 in humanen Zellen schützt diese ebenso vor einer MLV-Infektion. Ein weiterer verwandter Faktor Lv1 verhindert die Infektion von Affenzellen durch HIV-1, HIV-2 und SIVmac. Diese Restriktionsfaktoren Fv1, Lv1 und Ref1 haben unter anderem gemeinsam, dass sie am Kapsid des in die Zelle kommenden Virus angreifen. Außerdem sind diese Restriktionen unabhängig vom Hüllprotein und können auch nicht durch Pseudotypisierung mit VSV-G überwunden werden. Da die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Restriktion vom Hüllprotein abhängig ist, zwischen viralen Partikeln stattfindet, die das gleiche Kapsid besitzen, und außerdem durch Pseudotypisierung mit VSV-G überwunden werden kann (McKnight et al., 2001), kann eine Beteiligung des Restriktionsfaktors Lv1 ausgeschlossen werden. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass generell weitere Restriktionsfaktoren in Zellen existieren. So postulieren Schmitz et al. (2004), welche die Restriktion von prCBL23 mit den molekularen Klonen MCR und MCN in HeLaP4-Zellen untersuchen, einen Restriktionsfaktor Lv2, der für die Restriktion von prCBL23 verantwortlich gemacht wird. Laut dem vorgeschlagenem Modell kann dieser Restriktionsfaktor in der Zelle umgangen werden, je nachdem in welches zelluläre Kompartiment das Virus in Abhängigkeit seines Hüllproteins nach der Fusion geschleust wird. Wie bereits erwähnt ist an der Restriktion von prCBL23 in HeLaP4-Zellen neben dem Hüllprotein auch das Kapsid-Protein beteiligt. Dies führte zur Hypothese, dass ein Virus, das durch ein restringiertes Hüllprotein in ein Kompartiment mit Lv2-Aktivität geschleust wurde, durch sein nicht restringiertes Kapsid die Inhibition durch Lv2 verhindern oder umgehen kann. Ein Virus mit

nicht-restringiertem Hüllprotein und restringiertem Kapsid wäre insgesamt nicht restringiert, da das Hüllprotein das virale Kapsid von Anfang an in zelluläre Kompartimente schleust, die keine Lv2-Aktivität besitzen.

Um den Mechanismus der Restriktion von Env35-Partikeln in GHOST/X4-Zellen zu klären, bzw. zu untersuchen, wie Env42 die Restriktion umgehen kann, wurde in den Kapiteln 2.3.1 und 2.3.2 untersucht, wie sich die Restriktion von Env35-Partikeln in GHOST/X4-Zellen durch die Anwesenheit von Env42S beeinflussen lässt. In Kapitel 2.3.1 wurde der Einfluss auf die Restriktion von Env35-, Env53S- und Env74S-Partikeln untersucht, wenn in diese steigende Mengen an Env42S eingebaut werden. Es konnte gezeigt werden, dass im Fall von Env35- und Env53S-Partikeln bereits eine geringe Menge an Env42S (1/10 im Vergleich zu Env35 bzw. Env53S) in den Partikeln die Restriktion um mindestens die Hälfte reduziert (von 60fach auf 30fach bzw. 58fach auf 20fach). Wird die Menge an Env42S erhöht, so wird die Restriktion noch drastischer reduziert, bis bei einem Anteil von 9/10 an Env42S die Restriktion fast aufgehoben ist (3fach bei Env35, 4fach bei Env53S). Bei Env74S-Partikeln tritt die Reduktion der Restriktion um etwa die Hälfte erst bei einem Mengenverhältnis von 1:1 auf. Bei nur 1/10 Env42S auf den Partikeln verändert sich die Restriktion im Vergleich zu reinen Env74S-Partikeln nicht. Man muss jedoch bedenken, dass die 18fache Restriktion von Env74S-Partikeln generell schon reduziert ist im Vergleich zu Env35- und Env53S-Partikeln (60 und 56fache Restriktion). Der relative Einbau der verschiedenen Hüllproteine in die gemischten Partikel konnte nicht überprüft werden. In Kapitel 3.2.1 wurde jedoch gezeigt, dass Env35 und Env53S 2 bis 3mal besser in virale Partikel eingebaut werden als Env42S. Somit muss man berücksichtigen, dass z.B. beim Verhältnis 1:1 zwar gleiche Mengen an Hüllprotein-Expressionsplasmid transfiziert wurden, aber in den viralen Partikeln aufgrund seines schlechteren Einbaus immer etwas weniger Env42S vorhanden sein wird. Dies verstärkt die Aussage, dass bereits wenig Env42S in den Partikeln die Restriktion drastisch reduzieren kann.

Env42S verhält sich bezüglich der Restriktion gegenüber Env35 also dominant. Aus diesem Versuch wird jedoch nicht klar, ob Env42S die Restriktion von Env35-Partikeln durch die Aktivierung von Signalkaskaden reduziert, wodurch z.B. die Transkription in der Zelle stimuliert, oder ein Restriktionsfaktor inhibiert werden könnte. Die Restriktion könnte auch dadurch reduziert werden, dass sich ein Teil der gemischten Partikel wie Env42S-Partikel verhalten, indem sie über eine Env42S-vermittelte Fusion in die Zelle eintreten, wodurch sie in ein die weitere Replikation begünstigendes Kompartiment gelangen bzw. einen Restriktionsfaktor umgehen können. Zwar reicht eine geringe Menge an Env42S auf den viralen Partikeln aus, um die Restriktion stark zu reduzieren, aber selbst bei größeren Mengen an Env42S kann die Restriktion nicht komplett aufgehoben werden. Dies spricht gegen eine Beteiligung von sich auf die Replikation positiv auswirkenden Signalkaskaden, da man in diesem Fall erwarten würde, dass die Restriktion schon durch kleine Mengen an Env42S komplett aufgehoben wird. Da die Stärke der Restriktion ganz klar abhängig von der Menge an vorhandenem Env42S ist, deutet dies eher darauf hin, dass sich abhängig vom Mengenverhältnis der Hüllproteine ein Teil der gemischten Partikel wie Env42S-Partikel und der andere Teil wie Env35-Partikel verhält, je nachdem welches Hüllprotein sie für die Rezeptorinteraktion bzw. Fusion benutzen. Auch wenn sich nur wenige Env42S-Moleküle im Vergleich zu Env35- bzw. Env53S-Molekülen in den gemischten viralen Partikeln befinden, wird die Restriktion im Gesamten deutlich reduziert, weil die



Infektion über Env42S 60fach effizienter ist als über Env35 bzw. Env53S. Dies würde aber bedeuten, dass die Restriktion mit Hilfe von Env42S nur umgangen werden kann, wenn Env42S selbst den Fusionsprozess einleitet. Die Erzeugung von lokal wirkenden Signalen durch Env42S z.B. zur Umstrukturierung des Zytoskeletts oder Rekrutierung zellulärer Faktoren könnte dabei aber durchaus eine Rolle spielen.

Um weitere Hinweise darauf zu bekommen, durch welchen Mechanismus das Hüllprotein Env42 die Restriktion umgehen bzw. aufheben kann, wurden in Kapitel 2.3.2 GHOST/X4-Zellen mit steigenden Mengen an Env42S-GFP-Partikeln vorinkubiert und anschließend mit Env35-Renilla-Partikeln infiziert. Da durch die Auswertung der Luziferase-Aktivität in diesen Zellen nur die Infektionen von Viren mit dem Renilla-Reportergen erfasst werden, konnte der Einfluss von Env42S auf die Infektion mit Env35-Partikeln untersucht werden. Der Unterschied zum vorigen Versuch ist, dass sich Env42S diesmal nicht auf dem gleichen Partikel wie Env35 befand. Es konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der Infektion mit Env35-Ren-Partikeln im Vergleich zur Kontrolle Env35-GFP/Env35-Ren nur geringfügig durch die Präinkubation mit Env42S-GFP-Partikeln verbessert wird, und das auch nur bei der größten der eingesetzten Menge an Env42S-GFP-Partikeln. Außerdem wird die Infektion mit Env42S-Ren-Partikeln in gleicher Weise durch die Vorinkubation mit Env42S-GFP-Partikeln gesteigert. Weiterhin war der Effekt viel zu gering, um die Restriktion von Env35-Partikeln aufzuheben. Diese Beobachtungen sprechen gegen eine Aktivierung von Signalkaskaden durch Env42S, durch die die Restriktion aufgehoben oder umgangen werden kann. Eine andere Möglichkeit wäre allerdings, dass ein Signal, das von Env42S ausgelöst wird, nur kurzfristig und/oder lokal wirkt, um z.B. durch Rekrutierung benötigter zellulärer Faktoren lokal günstige Bedingungen für eine Infektion zu schaffen. Dies kann mit dem beschriebenen Versuch nicht überprüft werden.

Ein anderer Ansatz, den Einfluss der Hüllproteine auf die Signalaktivierung in Zellen zu untersuchen, ist die Analyse der Aktivierung von MAP-Kinasen. Verschiedenste Studien konnten zeigen, dass HIV fähig ist, die Aktivierung von MAPK auszulösen, und dass dies Einfluss auf die Infektion haben könnte (Kinet et al., 2002, Stantchev und Broder, 2001; Popik et al., 1998; Misse et al., 1999). In Kapitel 2.3.3 wurde deshalb untersucht, ob Env53S- und Env42S-Partikel die MAPKs ERK1 (p44 MAPK) und ERK2 (p42 MAPK) unterschiedlich stark aktivieren können. Nach 30minütiger Inkubation von U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen mit gleichen Mengen an Env53S- und Env42S-Partikeln war keine unterschiedliche Aktivierung der MAP-Kinasen p42/p44 nachzuweisen. Durch den Vergleich mit der Negativkontrolle 293T-Überstand wird deutlich, dass die Inkubation der Zellen mit Env53S- und Env42S-Partikeln keine spezifische Phosphorylierung der MAP-Kinasen bewirkt hat, da die entsprechenden Banden sowohl in U87/CD4/X4- als auch in GHOST/X4-Zellen alle gleich stark sind. Somit konnte keine (unterschiedliche) Stimulation der Phosphorylierung von MAP-Kinase nachgewiesen werden. Es könnte allerdings sein, dass der Western Blot nicht sensitiv bzw. quantitativ genug war, um kleinere, aber wichtige Unterschiede in der Aktivierung von MAP-Kinase sehen zu können. Außerdem könnte ein eventuell anfangs vorhandenes Signal nach 30 Minuten wieder seine Wirkung verloren haben, zumal die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ein schneller Prozess ist. Somit lässt auch dieser Versuch keinen Schluss zu, dass Env42S im Vergleich zu Env35 eine Aktivierung der Zelle auslöst, die dafür verantwortlich sein könnte, dass Env42S auf GHOST/X4-Zellen keine Restriktion zeigt.

Es konnte weder durch molekularbiologische Analyse im Western Blot noch durch Präinkubationsversuche mit Env42S-Partikeln ein Hinweis darauf gewonnen werden, dass Env42 ein Signal in der Zelle auslöst, wodurch es eine Restriktion in GHOST/X4-Zellen umgehen könnte. Der Versuch mit gemischten Partikeln lässt vermuten, dass virale Partikel, um einer Restriktion entgehen zu können, Env42S zur Infektion benutzen müssen. Obwohl gezeigt wurde, dass die Restriktion sich erst nach dem Zelleintritt manifestiert, scheint es wichtig zu sein, dass Env42S die Fusion selbst vermittelt.

Eine mögliche Hypothese für den zugrunde liegenden Mechanismus wäre, dass Env42 lokal an der Zellmembran Signalkaskaden erzeugt, die die anschließende Infektion der Zelle erleichtern könnten. So könnte z.B. am Ort der Fusion das Aktinzytoskelett umstrukturiert werden, dessen dichtes Netz möglicherweise eine Barriere für den Transport des viralen Partikels zum Zellkern darstellt. Dadurch könnte die Interaktion mit anderen zellulären Komponenten, wie z.B. den Mikrotubuli, erleichtert werden, die wichtig für den Transport von HIV zum Zellkern sind (Bukrinskaya et al., 1998; Iyengar et al., 1998). Aber auch die Rekrutierung zellulärer Faktoren an den Ort der Fusion, die zum *Uncoating*, Zusammenlagerung des PICs, Start der reversen Transkription und Transport des PICs zum Zellkern benötigt werden, könnte die Infektion erleichtern.

Denkbar wäre auch, dass durch den Aminosäureaustausch an Position 74 Interaktionen der Hüllproteine mit Oberflächenmolekülen beeinflusst werden, die den Ort der Fusion des Virus in bestimmten Mikrodomänen der Zellmembran favorisieren. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das HIV-1 Hüllprotein mit bestimmten Glykosphingolipiden (GSLs) interagieren kann (Hammache et al., 1999), und dass GSL Mikrodomänen in der Plasmamembran bevorzugte Orte der Fusion sind (Hammache et al., 1999; Puri et al., 1999; Hug et al., 2000; vgl. Kapitel 1.2.7). So könnte zum Beispiel durch die Interaktion von Env42 mit GSLs oder Lipid Raft-ständigen Proteinen die Fusion bevorzugt an solchen Stellen stattfinden, die Vorteile für eine Virusinfektion bieten. Für zahlreiche Pathogene wie z.B. *Plasmodium falciparum*, SV 40 und MLV konnte gezeigt werden, dass sie für den Eintritt in die Zelle Rezeptoren brauchen, die mit Lipid Rafts koloalisieren (Manes et al., 2003; Rosenberger et al., 2000; Samuel et al., 2001; Parton und Lindsay, 1999; Pelkmans et al., 2001). Auch für HIV gibt es Hinweise, dass Lipid Rafts als Ort der Fusion dienen könnten (Nguyen and Taub, 2002; Kozak et al., 2002; Popik et al., 2002; Manes et al., 2000). Durch das Vorhandensein von vielen Proteinkomplexen und Signalmolekülen in Lipid Rafts könnten wichtige Prozesse wie *Uncoating*, Initiation der reversen Transkription und der Transport des Virus begünstigt werden.

Eine weitere Hypothese ist, dass die Hüllproteine Env35 und Env42 die viralen Partikel in verschiedene zelluläre Kompartimente schleusen könnten, die die Etablierung der Infektion begünstigen oder benachteiligen. So könnten Env35-Partikel in einem Bereich der Zelle festsitzen, der für das *Uncoating* oder die Initiierung der reversen Transkription ungünstige Bedingungen besitzt bzw. den Abtransport der Viren in lysosomale Organellen und damit ihre Degradation fördert. Weiterhin könnten Env42-Partikel durch die Benutzung einer alternativen Route in der Zelle einen in GHOST/X4-Zellen möglicherweise existierenden Restriktionsfaktor umgehen, während Env35-Partikel diese Route nicht benutzen können und blockiert werden.

Um die aufgestellten Hypothesen untersuchen zu können, sind verschiedene Ansätze denkbar. Um zu klären, ob GHOST/X4-Zellen einen Restriktionsfaktor exprimieren, der für die Restriktion von Env35-Partikeln verantwortlich ist, könnte man Heterokaryon-Versuche durchführen. Dazu müssten restriktive (GHOST/X4) und nicht-restriktive Zellen (U87/CD4/X4) fusioniert und anschließend infiziert werden. Zeigen Env35-Partikeln in diesen fusionierten Zellen eine Restriktion, wäre dies ein Hinweis auf einen Restriktionsfaktor in GHOST/X4-Zellen. Eine Rolle von Lipid Rafts bei der beschriebenen Restriktion könnte durch die spezifische Zerstörung dieser Mikrodomänen und anschließende Infektionsstudien analysiert werden. Um zu klären, ob die viralen Partikel unterschiedliche Routen in der Zelle benutzen, könnte die Präsenz von restringierten und nicht restringierten Partikel in verschiedenen zellulären Kompartimenten durch Immunfluoreszenzstudien nachgewiesen werden. Fluoreszenz-markiertes Virus könnte außerdem durch die Anwendung neuester Mikroskopietechniken auf seinem Weg in der lebenden Zelle verfolgt werden. Neben diesen weiterführenden Versuchen, die Aufschluss über den Mechanismus der Hüllprotein-vermittelten Restriktion der HIV-2 Infektion geben werden, wäre es außerdem interessant, die in dieser Arbeit identifizierte kritische Aminosäureposition 74 (und 111) in verschiedenen anderen HIV Hüllproteinen entsprechend auszutauschen. Somit könnte die Relevanz der hier charakterisierten Restriktion für andere HIV-Isolate untersucht werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

Aceton	Merck
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40%; 29:1)	Serva
Agar	Becton Dickinson
Agarose	Cambrex
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Bromphenolblau	Chroma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
EDTA	Roth
Essigsäure konz.	Roth
Ethanol	Riedel de Haen
Ethidiumbromid	Merck
Ferricyanid	Merck
Ferrocyanid	Merck
Hefeextrakt	Becton Dickinson
Glutamin	Gibco
Glycerin	Roth
Glycin	Merck
Isopropanol	Riedel de Haen
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Milchpulver	Roth
Methanol	Riedel de Haen
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
NP40	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Orange G	Merck
Paraformaldehyd	Roth

Phenylmehtylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Probenecid	Merck
Protein A Sepharose CL-4B	Amersham
Saccharose	Merck
N, N, N', N`-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Tris	Merck
Triton X-100	Merck
Trypton	Becton Dickinson
Tween-20	Merck
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid)	Fermentas

#### 4.1.1 Radiochemikalien

Redivue Pro [<sup>35</sup>S] Met/Cys Labelling Mix, Amersham Pharmacia

#### 4.2 Puffer und Lösungen

##### RIPA-Puffer

50 mM Tris (pH8)  
150 mM NaCl  
1% NP40  
0,5% Natrium-deoxycholat  
0,1% SDS

##### TNE-Puffer

50 mM Tris (pH8)  
150 mM NaCl

##### 10x PBS

400 g Natriumchlorid  
10 g Kaliumchlorid  
57,5 g Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat  
10 g Kaliumdihydrogenphosphat  
in 3 Liter aqua bidest. auflösen, autoklavieren; ad 5 Liter mit autoklaviertem aqua bidest.

##### 10x PBS/Tween

1000 ml 10x PBS  
5 ml Tween-20

**10x Laufpuffer für SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970)**

30,28 g Tris

144 g Glycin

10 g SDS

ad 100 ml mit aqua bidest., pH stellt sich automatisch auf 8,3 ein

**4x Sammelgelpuffer für SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970)**

0,5 M Tris/Cl, pH 6,8

0,4% SDS

0,01% Natriumazid

**4x Trenngelpuffer für SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970)**

1,5 M Tris/Cl, pH 8,8

0,4% SDS

0,01% Natriumazid

**SDS-Probenpuffer**

200 mM Tris/Cl, pH 6,8

6% SDS

20% Glycerin

2% 1,4 Dithiothreitol (DTT)

0,1 mg/ml Bromphenolblau

0,1 mg/ml Orange G

**Transferpuffer**

5,28 g Tris

2,93 g Glycin

3,75 ml 10% SDS

200 ml Methanol

ad 1000 ml mit aqua bidest.

**50x TAE**

404,5 g Tris

272 g Natrium-Acetat

37,2 g EDTA

220 ml konz. Essigsäure

ad 2 Liter mit aqua bidest.

**5x DNA-Ladepuffer für Agarosegele**

50% Saccharose

10 mM EDTA

2% Bromphenolblau

2% Orange G

#### **1x Färbe-Lösung für X-Gal**

3 mM Ferricyanid

3 mM Ferrocyanid

1 mM MgCl<sub>2</sub>

in PBS

#### **100x X-Gal-Lösung**

0,5 mg/ml X-Gal in PMSF

### **4.3 Kits und Reagenzien**

Maxiprep-Kit NucleoBond AX

LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes

CEQ 2000 Cycle Sequencing Kit

Renilla Luciferase Assay System

CCF2-AM Beta-Lactamase substrate with loading solutions

RetroSys RT Activity Kit

NucleoSpin Extract Kit

DNAzol

FuGene 6 Transfection Reagent

ECL Western Blotting Detection Reagent

ECF Western Blotting Detection Reagent

Machery-Nagel

Roche

Beckman Coulter

Promega

Panvera/Invitrogen

Innovagen

Machery-Nagel

Gibco, BRL

Roche

Amersham Biosciences

Amersham Biosciences

### **4.4 Enzyme**

Phosphatase, alkaline (AP), from calf intestine, 1 U/μl

Polymerase: Expand High Fidelity PCR System, 3,5 U/μl

T4-DNA Ligase, 10 U/μl

Dnase I, Rnase-free, 10 U/μl

Restriktionsenzyme

Roche

Roche

MBI-Fermentas

Roche

MBI-Fermentas

## 4.5 Antikörper

<b>anti HIV-2:</b> Gemisch HIV-2 positiver Human-Seren (ARP501)	NIBSC, Centralised Facility for AIDS Reagents, UK Medical Research Council Cell Signaling
<b>anti MAPK:</b> p44/42 MAP Kinase Antikörper, aus Kaninchen	Cell Signaling
<b>anti p-MAPK:</b> phospho-p44/42 MAPK Antikörper, aus Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
<b>anti 14.3.3,</b> aus Kaninchen	Southern Biotechnology Associates, Inc.
<b>anti hu-β-Gal:</b> gegen humanes IgG gerichtet, β-Gal-konjugiert, aus Ziege	Chemicon
<b>anti β-Lactamase,</b> aus Kaninchen	Dianova
<b>anti R-PO:</b> gegen Kaninchen-IgG gerichtet, Peroxidase-konjugiert, aus Ziege	Dianova
<b>anti R-AP:</b> gegen Kaninchen-IgG gerichtet, alkalische Phosphatase-konjugiert, aus Ziege	Dianova
<b>anti M-PO:</b> gegen Maus-IgG gerichtet, Peroxidase-konjugiert, aus Ziege	Dianova
<b>anti hu-PO:</b> gegen humanes IgG gerichtet, Peroxidase-konjugiert, aus Ziege	Dianova

## 4.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders angegeben, von MWG Biotech AG bezogen.

### 4.6.1 PCR- und Mutagenese-Primer

Nr. 014	repairSTOP35(+)	ggagacagctcgtggccttgccg
Nr. 015	repairSTOP35(-)	cggccaaggccacgagctgtctcc
Nr. 024	CBL23envHindIII	gccaggaagcttcataggaggcgatctctgctccc
Nr. 176	CBL23envNotI(+)	ggataagtcgcccgcgatgatgggtgtagaaatcagctgc
Nr. 244	RODA-envEsp3(+)	ccgtcgtctcctacaccagacaagtgagttcagctgcttattgcc
Nr. 245	RODA-envBsmI(-)	gcggcctggaatgcttcttgatc
Nr. 309	rod7969(+)	tactgtaccatgggtaaatgattccttagc
Nr. 310	rod2gfp(+)	gacttagaacagccttctgcaaatatggtgagcaagggcgaggagctgttc
Nr. 311	rodgfp(-)	attgcaagaaggctgttctaagtctcag
Nr. 312	gfp(-)Nco	tatatgcatggtgatcagttatctagatccgggtgatcccg
Nr. 552	23Env74G(+)	tgtgacagaggcttctgatg
Nr. 553	23Env74G(-)	catcgaaagcctctgtcaca
Nr. 555	23Env111A(-)	acatctcattgttacaca



Nr. 556	23EnvEco421(-)	gcatgaggaattctcact
Nr. 585	A111Tlong(+)	tgtgtaacaATGAGATGTAACAACACAGATGCAAGG
Nr. 688	rod2ren2(+)	gacttagaacagccttcttgcaatatggctccaaggtgtacgacc
Nr. 689	ren2(-)Nco	taatatgcatgggtactgctcgttcttcagcacgc
Nr. 717	74G(-)	catcgaaagcccctgtcaca
Nr. 720	74G(+)	tgtgacaggggcttctgatg
Nr. 747	g71new(+)	gataactttgcagggtgacaga
Nr. 748	g71new(-)	tctgtcacctgcaaagtatc
Nr. 804	R-plus	caatggggatccgctgaagcaccaac
Nr. 805	R-minus	ggtagactcgagttattgcatgtttctagg

#### 4.6.2 Sequenzier-Primer

Nr. 033	env23seq400	gaattcctcatgcatacgcg
Nr. 034	env23seq800	catggtttgctttaatggc
Nr. 035	env23seq1200	caccgcaattatgtaccgtgcc
Nr. 036	env23seq1600	ctcggactttactggccggg
Nr. 037	env23seq2000	ggtttgacttagcctcctgg
Nr. 038	env23seq2400	cctacttgacagatgggtgcg
Nr. 214	envseq300rev	gatgtctcaaatagattccag
Nr. 215	envseq600rev	gaccgatgtgtgcaatgg
Nr. 262	RODAenvseq262(-)	attgatgtctcgaatagatgcc
Nr. 468	MP11mcs(+)	tgctgtaaccacccgagtcgga

#### 4.6.3 Primer und Sonden für die quantitative PCR

##### Gag-PCR

TaqMan Sonde GagTM2 (von TIPMOLBIOL):

5`- 6FAM-CTCTCAGAAGGCTGCACGCC XT ATGA p X = TAMRA

Nr. 183 TMgagfwd1 ggcagaagtagtgccaggattt

Nr. 185 TMgagrev1 tgcttgatggtcgcca

##### SS-PCR

TaqMan Sonde 2LTR TM (von TIPMOLBIOL):

5`- 6FAM-TAACAAGACCCTGGTCTGTTAGGACCCT XT p X = TAMRA

Nr. 602 SS-TMfwd agcacttgccgggtgct

Nr. 603 SS-TMrev tcctgcctcggttccc

## 4.7 DNA und Proteinmarker

DNA Marker 1kb ladder

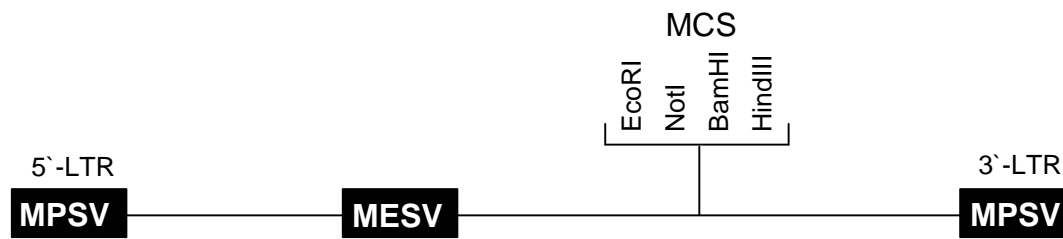
Gibco BRL

Proteinmarker (High molecular weight rainbow marker) Amersham

## 4.8 Plasmide

### pMP11

Das Expressions-Plasmid pMP11 (Schambach et al., 2000) ist ein Abkömmling des retroviralen Vektors pSF1 (Hildinger et al., 1999). Es enthält die LTR-Regionen von MPSV (*murine myeloproliferative sarcoma retrovirus*) und die Leader-Region von MESV (*murine embryonal stem cell virus*). Es wurde ursprünglich zur Transduktion von T-Zellen entwickelt.



**Abb. 4.1** Schematische Darstellung von pMP11. MCS = *multiple cloning site*

### pMP11-Env35

Das Hüllprotein von prCBL23 (Env35) wurde mit den Primern Nr. 176 (CBL23envNotI(+)) und Nr. 024 (CBL23envHindIII(-)) aus dem Plasmid #35 amplifiziert. Plasmid #35 enthält einen Teil der proviralen DNA von prCBL23 und wurde von Å. McKnight zur Verfügung gestellt. Die amplifizierte Envelope-DNA wurde über die durch die Primer eingeführten Restriktions-Schnittstellen NotI und HindIII in den Expressionsvektor pMP11 kloniert.

### pMP11-Env42

Das Hüllprotein von CBL23 (Env42) wurde mit den Primern Nr. 176 (CBL23envNotI(+)) und Nr. 024 (CBL23envHindIII(-)) aus dem Plasmid #42 amplifiziert. Plasmid #42 enthält einen Teil der proviralen DNA von CBL23 und wurde von Å. McKnight zur Verfügung gestellt. Die amplifizierte Envelope-DNA wurde über die durch die Primer eingeführten Restriktions-Schnittstellen NotI und HindIII in den Expressionsvektor pMP11 kloniert.

### **pMP11-Env35R**

Das Plasmid pMP11-Env35R wurde durch Fusions-PCR hergestellt. Mit Hilfe der Mutagenese-Primer Nr. 014 (repairSTOP35(+)) und Nr. 015 (repairSTOP35(-)) wurde das vorzeitige Stop-Kodon an Position 2225 (Nummerierung nach der Nukleotidsequenz) in Env35 in ein Tryptophan-Kodon mutiert, das Kodon von Env42 an dieser Position. Als äußere Primer für die Fusions-PCR dienten die Primer Nr. 176 (CBL23envNotI(+)) und Nr. 024 (CBL23envHindIII(-)). Somit konnte die mutierte Env35-Sequenz über die Schnittstellen NotI und HindIII (MCS von pMP11) in das Plasmid pMP11 kloniert werden.

### **pMP11-Env35R2**

Das Plasmid pMP11-Env35R2 wurde hergestellt, indem das 3'-Ende von Env42 über die Restriktionsschnittstellen BstEII (2129) und HindIII (MCS von pMP11) in pMP11-Env35 kloniert wurde.

### **pMP11-Env42S**

Das Plasmid pMP11-Env42S wurde hergestellt, indem das 3'-Ende von Env35 über die Restriktionsschnittstellen BstEII (2129) und HindIII (MCS von pMP11) in pMP11-Env42 kloniert wurde.

### **pMP11-Env13, pMP11-Env24, pMP11-Env24S, pMP11-Env33, pMP11-Env33S, pMP11-Env41, pMP11-Env53, pMP11-Env53S und pMP11-Env63**

Die verschiedenen Env-Expressionsplasmide wurden hergestellt, in dem (wie in Abb. 2.5 schematisch dargestellt) verschiedene Regionen zwischen pMP11-Env35 und pMP11-Env42 bzw. pMP11-Env42S über die Restriktionsschnittstellen NotI (MCS von pMP11), EcoRI (421), NcoI (1805) und HindIII (MCS von pMP11) ausgetauscht wurden.

### **pMP11-Env42-G74E, pMP11-Env42S-G74E, pMP11-Env42-A111T, pMP11-Env42S-A111T**

Diese Plasmide wurden durch Fusions-PCR mit den Mutagenese-Primern Nr. 552 (23Env74G(+)) und Nr. 553 (23Env74G(-)) bzw. Nr. 585 (A111Tlong(+)) und Nr. 555 (23Env111A(-)) hergestellt. Als Template diente pMP11-Env42. Dadurch wurden in pMP11-Env42 und pMP11-Env42S einzelne Aminosäure-Kodons an den Positionen 74 und 111 (Aminosäuresequenz des Hüllproteins) in der angegebenen Weise ausgetauscht. Als äußere Primer für die Fusions-PCR dienten die Primer Nr. 176 (CBL23envNotI(+)) und Nr. 556 (23EnvEco421(-)). Somit konnten die mutierten DNA-Fragmente über die Schnittstellen NotI (MCS von pMP11) und EcoRI (421) in die Plasmide pMP11-Env42 und pMP11-Env42S kloniert werden, um die Originalsequenz zu ersetzen.

### **pMP11-Env35-E74G**

Dieses Plasmid wurde durch Fusions-PCR mit den Mutagenese-Primern Nr. 720 (74G(+)) und Nr. 717 (74G(-)) hergestellt. Als Template diente pMP11-Env35. Dadurch wurden in pMP11-Env35 das Glutaminsäure-Kodon an Position 74 (Aminosäuresequenz des Hüllproteins) gegen ein Glycin-Kodon ausgetauscht. Als äußere Primer für die Fusions-PCR dienten die Primer Nr. 176 (CBL23envNotI(+)) und Nr. 556 (23EnvEco421(-)). Somit konnte das mutierte DNA-Fragment über die Schnittstellen NotI

(MCS von pMP11) und EcoRI (421) in das Plasmid pMP11-Env35 kloniert werden, um Originalsequenz zu ersetzen.

### **pMP11-Env35-g71ko, pMP11-Env42S-g71ko**

Diese Plasmide wurden durch Fusions-PCR mit den Mutagenese-Primern Nr. 747 (g71new(+)) und Nr. 748 (g71new(-)) hergestellt. Als Template dienten pMP11-Env35 bzw. pMP11-Env42S. Dadurch wurde eine potentielle Glykosylierungsstelle an Position 71 (Aminosäuresequenz des Hüllproteins) zerstört. Als äußere Primer für die Fusions-PCR dienten die Primer Nr. 176 (CBL23envNotI(+)) und Nr. 556 (23EnvEco421(-)). Somit konnten die mutierten DNA-Fragmente über die Schnittstellen NotI (MCS von pMP11) und EcoRI (421) in die Plasmide pMP11-Env35 und pMP11-Env42S kloniert werden, um die Originalsequenz zu ersetzen.

### **pACR23/ROD-A**

Der molekulare Klon pACR23 (ROD-A) ist ein CD4-abhängiger, infektiöser, proviraler Klon von HIV-2ROD (Keller et al., 1993).

### **ROD-A?env**

ROD-A?env ist von pACR23 abgeleitet. Die ersten 8 Nukleotide des *env*-ORF (inklusive Start-Kodon) wurden durch Site-directed mutagenesis mit den Primern Nr. 244 (RODA-envEsp3(+)) und Nr. 245 (RODA-envBsmI(-)) deletiert. Als Template diente ACR23. Das resultierende PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen Esp3 (6129) und BsmI (8581) in ACR23 kloniert, um die Originalsequenz zu ersetzen (Positionen laut der veröffentlichten ROD-A-Sequenz). ROD-A?env exprimiert kein Hüllprotein mehr und mit ROD-A?env transfizierte Zellen produzieren keine infektiösen viralen Partikel.

### **ROD-A?envGFP**

In ROD-A?envGFP wurde ein großer Teil des *nef*-ORF von ROD-A?env durch die Sequenz des ehGFP (*enhanced humanized green fluorescent protein*, Clontech) ersetzt. Mit den Primern Nr. 309 (rod7969(+)) und Nr. 311 (rodgfp(-)) (Template: ACR23) bzw. Nr. 310 (rod2gfp(+)) und Nr. 312 (gfp(-)Nco) (Template: Plasmid C1-eGFP, Clontech) wurden zwei PCR-Produkte generiert, die in einer anschließenden Fusions-PCR zusammengefügt wurden. Dieses NcoI/NcoI-Fragment enthielt die ehGFP-Sequenz und wurde an die Position des entsprechenden NcoI/NcoI-Fragmentes von ACR23 kloniert. Das Plasmid ROD-A?envGFP exprimiert GFP nach Transfektion und Infektion durch pseudotypisierte Partikel.

### **ROD-A?envRenilla**

In ROD-A?envRenilla wurde ein großer Teil des *nef*-ORF von ROD-A?env durch die Sequenz der Renilla Luciferase ersetzt. Mit den Primern Nr. 309 (rod7969(+)) und Nr. 311 (rodgfp(-)) (Template: ACR23) bzw. Nr. 688 (rod2ren2(+)) und Nr. 689(ren2(-)Nco) (Template: Plasmid pHr (*humanized Renilla*), Promega) wurden zwei PCR-Produkte generiert, die in einer anschließenden Fusions-PCR zusammengefügt wurden. Dieses NcoI/NcoI-Fragment enthielt die Renilla Luciferase-Sequenz und

wurde an die Position des entsprechenden NcoI/NcoI-Fragmentes von ACR23 kloniert. Das Plasmid ROD-A?envGFP exprimiert GFP nach Transfektion und Infektion durch pseudotypisierte Partikel.

### **BlaM-Vpr2**

Im Plasmid Vpr-BlaM (pMM310, von M. Miller zur Verfügung gestellt) wurde die kodierende Sequenz des Vpr von HIV-1 durch die Sequenz des Vpr von HIV-2/ROD-A (Vpr2) ersetzt. Vpr2 wurde durch PCR mit den Primern Nr. 804 (R-plus) und Nr. 805 (R-minus) amplifiziert. Als Template diente ACR23. Das PCR-Produkt wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in das Ausgangsplasmid kloniert.

## **4.9 Medien und Materialien für die Arbeit mit Bakterien**

### **LB-Medium**

10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g Natriumchlorid  
ad 1000 ml aqua bidest.; autoklavieren

### **SOB-Medium**

20 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
0,5 g Natriumchlorid  
10 ml 250 mM Kaliumchlorid  
pH auf 7,0 mit NaOH einstellen  
ad 1000 ml aqua bidest., autoklavieren, vor Gebrauch 5 ml einer 2 M Magnesiumchlorid-Lösung zugeben

### **TB-Medium**

1 Liter:	Lösung A	Lösung B
	12 g Trypton	2,31 g Kaliumdihydrogenphosphat
	24 g Hefeextrakt	12,54 g Kaliumhydrogenphosphat
	4 ml Glycerin	
	ad 900 ml aqua bidest.	ad 100 ml aqua bidest.

beide Lösungen getrennt autoklavieren, Lösung B erst zugeben, wenn Lösung A < 60°C

### **LB-Agar-Platten**

LB-Medium mit 1,5% Agar, autoklavieren, in Platten gießen (+ Antibiotikum), 4°C

### **Antibiotika**

Ampicillin 100 mg/ml in aqua bidest., sterilfiltriert (-20°C), Roth

LBamp-Platten / LBamp-Medium: 100 µg/ml Ampicillin Endkonzentration

### **Bakterien**

E.coli Stamm XL-1 Blue, Stratagene, Heidelberg

## **4.10 Materialien für die Zellkultur**

### **Plastikwaren**

Plastikwaren für die Zellkultur wurden von Nunc, TPP, Falcon und Greiner bezogen.

### **Zellkulturmedien**

<b>DMEM kompl.:</b> Dulbecco`s modified Eagle`s Medium	Gibco
wenn nicht anders angegeben versetzt mit	
10% FCS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum)	BioWhittaker Europe
2 mM Glutamin	Gibco
50 U/ml Penicillin	Gibco
50 µg/ml Streptomycin	Gibco
<b>Einfrriermedium:</b>	
5 ml FCS	
4 ml DMEM kompl.	
1 ml DMSO	Serva
<b>Trypsin/EDTA-Lösung:</b> Trypsin 0,5 g/l, EDTA 0,2 g/l in PBS	Gibco

### **Zelllinien**

Sämtliche Zelllinien wurden von NIBSC, UK (EU programme EVA/MRC centralised facility for AIDS reagents) bezogen.

#### **U87/CD4/X4**

Humane Glioma-Zelllinie, die die Rezeptoren CD4 und CXCR4 exprimiert.

#### **GHOST/X4**

Humane Osteosarkom-Zelllinie, die die Rezeptoren CD4 und CXCR4 exprimiert.

#### **HeLaP4 (HeLa/CCR5)**

Humane Zervix-Karzinom-Zelllinie, die die Rezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5 exprimiert

#### **TZM (JC53BL)**

JC53BL-Zellen sind HeLa-Zellen, die die Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 exprimieren. Sie enthalten weiterhin die Gene für  $\beta$ -Galaktosidase (E.coli) und Firefly-Luciferase, die jeweils unter der transkriptionellen Kontrolle des HIV-1 LTR stehen. Die Zelllinie kann sowohl mit HIV-1 als auch mit HIV-2 infiziert werden und exprimiert nachweisbare Menge von  $\beta$ -Galaktosidase erst nach Stimulation

der Transkription vom LTR durch das virale Tat-Protein, so dass infizierte Zellen einfach durch *in situ* Färbung mit X-Gal nachgewiesen werden können (Wei et al., 2002).

#### **293T**

Humane embryonale Nierenfibroblasten Zelllinie, die durch das große T-Antigen des S-Virus 40 transformiert wurde. Gut transfizierbar, kann nicht mit HIV infiziert werden. (Pear et al., 1993)

### **4.11 Software**

Diese Arbeit wurde mit Office 2000 (Word, Powerpoint, Excel) von Microsoft erstellt. Für die Planung von Klonierungen und Auswertung von DNA-Sequenzen wurde VektorNTI Suite 8 (Invitrogen) benutzt. Für die Quantifizierung von radioaktiven Gelen wurde die QuantityOne-Software von BioRad verwendet.

### **4.12 Methoden**

#### **4.12.1 Isolierung von kleineren Mengen Plasmid-DNA („Minipreps“)**

Zur Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur von Bakterien in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen für 5 min bei 2 krpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl S1-Puffer + RNase (Nucleobond AX Maxiprep-Kit) resuspendiert, mit 200 µl S2-Puffer (Nucleobond AX Maxiprep-Kit) versetzt, vorsichtig durch Invertieren des Eppendorf-Röhrchens gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl S3-Puffer (Nucleobond AX Maxiprep-Kit) zugegeben, vorsichtig gemischt und 10 min bei 13 krpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt und zur Präzipitation der Plasmid-DNA mit 1 ml 100% Ethanol versetzt, gevortext und anschließend 15 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde 15 min bei 13 krpm und 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und bei 50°C im Heizblock getrocknet. Die DNA wurde in 20µl aqua bidest. aufgenommen und bei 4°C bzw. -20°C gelagert. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 4 µl dieser DNA-Lösung eingesetzt.

#### **4.12.2 Isolierung von großen Mengen Plasmid-DNA („Maxipreps“)**

Zur Präparation großer Mengen Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse wurden 200 ml einer Bakterien-Übernachtskultur mit dem Plasmid-Isolations-Kit Nucleobond AX (Machery-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Die Ausbeuten variierten zwischen 500 und 1000 µg Plasmid-DNA.

### **4.12.3 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Zur Konzentrationsbestimmung einer DNA-Lösung wurde ihre maximale Extinktion (optische Dichte, OD) im Photometer gemessen. Doppelsträngige DNA hat bei einer Konzentration von 50 µg/ml eine OD<sub>260</sub> von 1,0. Somit lässt sich anhand der gemessenen OD<sub>260</sub> die Konzentration einer unbekanntes DNA-Lösung berechnen. Proteine haben ihre maximale Extinktion bei 280 nm Wellenlänge. Der Quotient aus OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> gibt eine gewisse Auskunft über den Reinheitsgrad der DNA. Bei einer sauberen DNA-Präparation sollte der Quotient einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben.

### **4.12.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

Das Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Ein analytischer Verdau wurde in der Regel mit 0,5 bis 1 µg Plasmid-DNA (oder 4 µl einer „Miniprep“-DNA) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Davon wurden 10 µl auf einem Agarosegel analysiert. Ein präparativer Verdau wurde mit 3 bis 10 µg DNA in einem Volumen von 50 bis 100 µl durchgeführt. Das Volumen des Restriktionsenzym darf dabei 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten.

### **4.12.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Zur Analyse der Größe von DNA-Plasmiden bzw. -Fragmenten wurden diese elektrophoretisch in einem nicht-denaturierendem 1 bis 1,5% Agarose-Gel mit 1 µg/ml Ethidium-Bromid in TAE-Puffer bei einer Spannung von 6 bis 8 Volt/cm aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 5x DNA-Ladepuffer versetzt. Als Größenmarker wurde der 1 kb DNA-Marker von Gibco verwendet. Die aufgetrennte DNA konnte durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidium-Bromids auf einem UV-Transilluminator (254 nm) sichtbar gemacht und mit Hilfe einer angeschlossenen Videokamera und Drucker (Intas) dokumentiert werden.

### **4.12.6 Isolierung von DNA-Fragmenten**

Zur Isolierung bestimmter DNA-Fragmente wurden diese nach Auftrennung im Agarose-Gel bei langwelligem UV-Licht (366 nm) in entsprechend großen Gelstücken ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kit (Machery-Nagel) nach Angaben des Herstellers.



#### 4.12.7 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde eine Polymerase Ketten Reaktion in 50 bis 100 µl Ansätzen in einem MJ-Research MiniCycler mit Deckelheizung (Biozym) durchgeführt. Die Ansätze enthielten

50 bis 100 ng Plasmid-DNA (Template)  
 100 pMol pro Primer  
 25 mM dNTP`s  
 10x Polymerase-Puffer  
 1,5 bis 3 U Polymerase  
 Millipore-Wasser

Es wurde die Polymerase des Expand High Fidelity PCR Systems von Roche verwendet, um bei der Amplifikation langer, zur Expression benötigter DNA-Sequenzen die Einführung von Punktmutationen zu vermeiden.

Die PCR-Reaktion wurde im allgemeinen nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 bis 60 sec	} 30x
Annealing	55°C	30 bis 60 sec	
Elongation	72°C	mind. 30 sec	
Elongation	72°C	5 min	

Die Länge der Elongations-Phase richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz. Als Faustregel wird für eine Länge von 25 Basenpaaren 1 Sekunde benötigt.

Zum Einführen von Punktmutationen in Plasmid-DNA wurde die sogenannte „Fusions-PCR“ benutzt. Dazu wurden neben den beiden äußeren Primern zwei weitere Primer benötigt, die an der Stelle, an der die Mutation eingeführt werden soll, hybridisieren und die gewünschte Mutation enthalten. Zunächst wurden zwei getrennte PCRs gefahren, eine mit dem äußeren „Forward“-Primer und dem reversen Mutagenese-Primer, die andere mit dem „Forward“-Mutagenese-Primer und dem äußeren reversen Primer. Somit konnte das entsprechende DNA-Fragment in zwei getrennten Hälften amplifiziert werden, wobei die gewünschte Mutation durch die Mutagenese-Primer in beide Hälften eingeführt wurde. Die beiden PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel isoliert und in gleichen Mengenverhältnissen als Template für eine dritte PCR eingesetzt. Da die beiden PCR-Produkte an der Stelle, an der die Mutation eingeführt wurde, überlappten, konnten sie miteinander hybridisieren. Die resultierenden 3`-Überhänge dienten dann als Primer für die Polymerase, so dass anhand der beiden einzelnen PCR-Produkte ein langes PCR-Produkt synthetisiert werden konnte, das die gewünschte Mutation enthält. Diese dritte PCR, die die eigentliche „Fusions“-PCR ist, wurde zunächst 10 Zyklen ohne äußere Primer gefahren, so dass sich einige lange Fragmente auf die beschriebene Art bilden konnten. Erst dann wurden die äußeren Primer zugegeben, um das lange DNA-Fragment

effizient zu amplifizieren. Dieses PCR-Produkt konnte dann über eine Agarosegel aufgereinigt und in den gewünschten Vektor kloniert werden.

#### **4.12.8 Phosphatasebehandlung von Vektoren**

Um bei einer Ligase-Reaktion die intramolekulare Verknüpfung des Vektors zu verhindern, müssen die 5'-Phosphorsäuremonoester des geschnittenen Vektors abgespalten werden. Dies ist besonders wichtig, wenn die beiden freien Enden des Vektors durch das selbe Restriktionsenzym generiert wurden. Die geschnittene Vektor-DNA wurde in einem 50 µl Ansatz mit der alkalischen Phosphatase von Roche (5 U/µg DNA) im entsprechenden Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase wurde entweder durch Inkubation des Ansatzes für 15 min bei 80°C inaktiviert, oder die Vektor-DNA wurde über ein Agarosegel gereinigt.

#### **4.12.9 Ligation**

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor zu ligieren, wurden ca. 200 ng geschnittene Vektor-DNA mit einem 2 bis 10fachen molaren Überschuß des DNA-Fragmentes in einem Gesamtansatz von 10 µl in Gegenwart von 10 U T4-DNA-Ligase und dem entsprechenden Puffer (MBI Fermentas) versetzt. Die Mengen der eingesetzten DNAs wurden zuvor auf einem Agarosegel abgeschätzt. Der Ligationsansatz wurde 3 bis 5 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im 16°C-Wasserbad inkubiert. Zur Transformation von Bakterien wurden 5 µl dieses Ansatzes eingesetzt.

#### **4.12.10 Sequenzierung**

Sequenzierungen von Plasmiden wurden mit dem CEQ 2000 von Beckman/Coulter durchgeführt. Die Polymerase-Reaktion wurde laut Protokoll des Herstellers selbst durchgeführt. Generell wurden pro Reaktion 300 bis 500 ng Plasmid-DNA eingesetzt.

#### **4.12.11 Herstellung transformationskompetenter Bakterien**

250 ml SOB-Medium wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur von E. coli XL-1 inokuliert und einige Stunden bei 20°C kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht war. Darauf wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, abzentrifugiert, mit eiskaltem TB gewaschen und anschließend in 25 ml TB resuspendiert. Die Bakterien wurden 10 min auf Eis inkubiert und dann mit Dimehtylsulfoxid (DMSO) in einer Endkonzentration von 7% versetzt. Die Bakterien wurde in 50 bis 100 µl Aliquots in flüssigem

Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Mit dieser Methode wurde eine Transformationskompetenz von bis zu  $10^9$  Kolonien/ $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA erreicht.

#### **4.12.12 Transformation von Bakterien**

Transformationskompetente E. coli XL-1 wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden  $50\ \mu\text{l}$  dieser Bakteriensuspension mit  $5\ \mu\text{l}$  Ligationsansatz oder  $100\ \text{ng}$  Plasmid-DNA vermischt und 10 bis 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 1min. Anschließend wurde die Bakteriensuspension noch mal 5 min auf Eis inkubiert, mit  $300$  bis  $500\ \mu\text{l}$  LB-Medium versetzt und 30 bis 45 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde zur Selektion transformierter Bakterien auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

#### **4.12.13 Flüssigkulturen von Bakterien**

Die Kultivierung von transformierten Bakterien erfolgte in LB-Medium in der Gegenwart von Ampicillin. Für kleine DNA-Präparationen wurden  $3\ \text{ml}$   $\text{LB}_{\text{amp}}$  -Medium mit einem Bakterien-Klon von einer Agar-Platte angeimpft und unter Schütteln über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Zur Aufarbeitung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden  $200\ \text{ml}$   $\text{LB}_{\text{amp}}$  -Medium angeimpft und ebenso unter Schütteln über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

#### **4.12.14 Einfrieren von Bakterien**

Zur Aufbewahrung transformierter Bakterien wurden  $500\ \mu\text{l}$  der entsprechenden Bakterienkultur mit  $200\ \mu\text{l}$  Glycerin versetzt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

#### **4.12.15 Haltung von Zellkulturzellen**

Alle benutzten Zelllinien wurden in DMEM, versetzt mit FCS, Glutamin und Antibiotika bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und  $5\% \text{CO}_2$  kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1 bis  $2\ \text{ml}$  einer Trypsin/EDTA-Lösung je nach Zellart 1 bis 5 min inkubiert und dann vom Kulturgefäß abgeschlagen. Die Zellesuspension wurde je nach Bedarf mit frischem Medium verdünnt und in neue Kulturgefäße verteilt.

#### 4.12.16 Einfrieren von Zellkulturzellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, mit 1 bis 2 ml einer Trypsin/EDTA vom Kulturgefäß abgelöst und in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und eingefroren. Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst in einem Einfrierbehälter über Nacht bei -80°C gelagert. Durch den Einfrierbehälter wurden die Zellen langsam auf -80°C herunter gekühlt. Anschließend wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 4.12.17 Auftauen von Zellkulturzellen

Das Auftauen der Zellen soll möglichst schnell geschehen. Sie wurden dazu in ein 37°C Wasserbad gestellt. Nach dem Auftauen wurden sie in frisches Medium überführt und in einem Kulturgefäß ausgesät. Sobald die Zellen am Boden des Gefäßes festgewachsen waren (nach ca. 5 bis 6 Stunden), wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen und Reste des Einfriermediums zu entfernen.

#### 4.12.18 Transfektion von 293T-Zellen

2 bis 3 x 10<sup>6</sup> 293T-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 10 cm Schalen ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion zu ca. 60% konfluent waren. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die Transfektion wurde mit dem Transfektionsreagenz FuGene 6 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Generell wurden 1 bis 3 µg DNA zunächst in ca. 200 µl serumfreien Medium verdünnt. Zu dieser Lösung wurden dann 3 bis 6 µl FuGene 6 zugegeben, vorsichtig gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionslösung wurde unter Schwenken der Zellkulturschale auf die Zellen aufgetropft. Die Schalen wurden anschließend bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde wieder das Medium gewechselt und die Zellen weitere 2 bis 3 Tage kultiviert. Zellen und Überstände wurden je nach Experiment weiter verarbeitet.

Durch die Transfektion GFP-exprimierender Plasmide (GFP, *green fluorescent protein*) konnte die Transfektionseffizienz am Fluoreszenz-Mikroskop anhand der Zahl grün leuchtender Zellen abgeschätzt werden.

#### 4.12.19 Herstellung von pseudotypisierten Viren

Zur Herstellung von pseudotypisierten Viren wurden  $2 \times 10^6$  293T-Zellen in 10 cm Schalen mit 3  $\mu\text{g}$  ROD-A?env (oder ROD-A?envGFP, oder ROD-A?envRenilla) und 3  $\mu\text{g}$  eines Env-Expressions-Plasmides transfiziert. Die DNAs der beiden Plasmide wurden miteinander vermischt und in 200  $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium verdünnt. Diese Lösung wurde mit 15  $\mu\text{l}$  FuGene 6 Transfektionsreagenz versetzt, vorsichtig gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die 293T-Zellen aufgetropft. Drei Tage nach der Transfektion wurden die virushaltigen Überstände geerntet, durch 0,45  $\mu\text{m}$  Filter filtriert, aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Vom Plasmid ROD-A?env werden alle nötigen viralen Proteine, außer dem Hüllprotein exprimiert. Dieses wird durch das entsprechende Env-Expressions-Plasmid geliefert. Die pseudotypisierten Viren, die aus den 293T-Zellen freigesetzt werden, können nur einen Replikationszyklus durchlaufen, da bei ihrem *Assembly* nur die ROD-A?env-RNA verpackt wird, nicht aber die Information für das Hüllprotein. Infizieren diese Viren eine Zelle, fehlt die Information des Hüllproteins und es können keine vollständigen Viren produziert werden. Somit werden nur nichtinfektiöse Viren (?Env-Viren) aus der infizierten Zelle freigesetzt.

#### 4.12.20 Konzentrierung von viralen Partikeln

Zur Gewinnung hochkonzentrierter Virusstocks wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände ultrazentrifugiert. Dazu wurden 30 ml Zellkulturüberstand in einem SW28 Zentrifugenröhrchen auf 4 ml 20% Saccharose in PBS geschichtet und 2 Stunden bei 25 krpm und  $4^\circ\text{C}$  pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Virus-Pellets 30 min auf Eis in der gewünschten Menge PBS resuspendiert. Die konzentrierte Virussuspension wurde aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.12.21 Quantifizierung der Reversen Transkriptase in Virusstocks (RT-Assay)

Eine Möglichkeit eine Aussage über den Virusgehalt einer Lösung zu erhalten ist die Quantifizierung der Reversen Transkriptase. Dies erfolgte mit dem RetroSys RT Activity Kit von Innovagen nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Methode wird die Reverse Transkriptase-Aktivität einer Lösung gemessen und anhand eines mitgelieferten Standards auf die Konzentration der Reversen Transkriptase in dieser Lösung umgerechnet. Die Menge und Aktivität der Reversen Transkriptase steigt dabei proportional zur Menge der viralen Partikel an. Im Allgemeinen mussten die Virusstocks 1:625 bis 1:15625 verdünnt werden, um den linearen Messbereich der RT-Aktivität zu erreichen. Die Virusstocks hatten generell eine Konzentration von 10 bis 40 ng RT pro 100  $\mu\text{l}$  Zellkulturüberstand.

#### **4.12.22 Infektionsstudien**

Für Infektionsstudien wurden die verschiedenen Zelllinien in 48-Loch-Platten ausgesät ( $3 \times 10^4$  U87/CD4/X4-Zellen pro Vertiefung,  $2 \times 10^4$  GHOST/X4- bzw. HeLaP4-Zellen pro Vertiefung). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit einer Verdünnungsreihe von jedem Virusstock infiziert. Dazu wurden gleiche Volumina der verschiedenen Virusverdünnungen in das Zellkulturmedium gegeben. Drei Tage später wurden die Infektionen mittels Immunfärbung oder eines Renilla Luziferase Reporter Systems ausgewertet.

#### **4.12.23 Auswertung von Infektionen durch Immunfärbung**

Infizierte Zellen wurden durch Immunfärbung intrazellulär exprimierter viraler Proteine detektiert. Zunächst wurden die infizierten Zellen mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS und einmal mit PBS/1% FCS gewaschen und dann mit 1:4000 in PBS/1% FCS verdünntem HIV-2 Serum inkubiert (200  $\mu$ l pro Vertiefung einer 48-Loch-Platte). Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Zellen 2mal mit PBS/1% FCS gewaschen und dann mit 1:400 in PBS/1% FCS verdünntem anti hu- $\beta$ -Galaktosidase konjugiertem Antikörper versetzt (200  $\mu$ l pro Vertiefung einer 48-Loch-Platte). Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Zellen 3mal mit PBS gewaschen und dann mit 200  $\mu$ l einer  $\beta$ -Galaktosidase-Substrat Lösung versetzt (5 ng/ml X-Gal in PBS mit 3 mM Ferricyanid, 3 mM Ferrocyanid und 1 mM  $MgCl_2$ ) und 3 bis 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die infizierten, blauen Zellen wurden dann am Lichtmikroskop ausgezählt.

#### **4.12.24 Auswertung von Infektionen durch den Renilla Luziferase Assay**

Zellen, die mit Viren infiziert worden sind, die ein Renilla Luziferase Reporter gen besitzen, können durch die Expression der Renilla Luziferase erfasst werden. Somit kann die Virusinfektion quantifiziert werden. Dazu wurde das Renilla Luziferase Assay System von Promega benutzt. Die Zellen wurden drei Tage nach der Infektion laut Protokoll des Herstellers lysiert und mit einer Substratlösung versetzt. Im Luminoskan Ascent (Thermo Labsystems) wurde dann die Aktivität der Renilla Luziferase in Form von Lichteinheiten gemessen. Die gemessene Lichtmenge steigt dabei proportional zur Anzahl der infizierten Zellen an.

#### **4.12.25 Extraktion genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen**

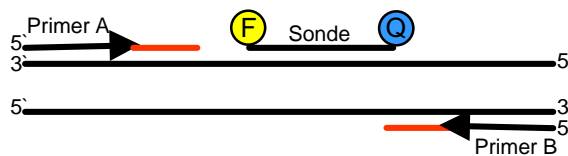
Zur Extraktion genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen wurden ca.  $1 \times 10^5$  Zellen mit 400  $\mu$ l DNAzol von Gibco versetzt und laut Angaben den Herstellers aufgearbeitet. Die DNA wurde in 50  $\mu$ l

destilliertem Wasser aus einer Millipore-Filtrationsanlage aufgenommen, und ihre Konzentration wurde im Photometer bestimmt.

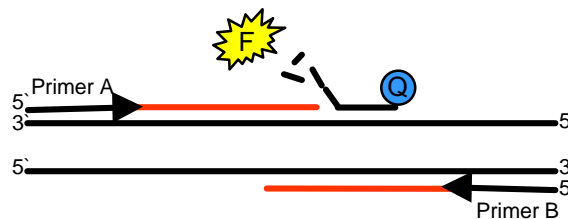
#### 4.12.26 Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde im LightCycler (Roche) nach dem TaqMan-Prinzip durchgeführt. Sie erlaubt die spezifische Quantifizierung kleiner DNA-Mengen. Dabei wird ein bestimmtes Fragment der zu messenden DNA wie in einer PCR durch die Verwendung spezifischer Primer amplifiziert. Diese Amplifikation wird parallel in Echtzeit mit Hilfe von Fluoreszenz-gekoppelten TaqMan-Sonden detektiert, die spezifisch mit der Zielsequenz hybridisieren. Das Prinzip der TaqMan-Methode besteht darin, dass eine Polymerase mit 5',3'-Exonukleasefunktion an Primer A anfängt zu synthetisieren, bis sie auf die TaqMan-Sonde trifft, die am 5'-Ende mit Fluorophor und am 3'-Ende mit einem Quencher gekoppelt ist. Das Fluorophor am 5'-Ende sendet keine Fluoreszenz aus, weil es vom Quencher am 3'-Ende unterdrückt wird. Mittels ihrer Exonuklease-Funktion verdaut die Polymerase die TaqMan-Sonde am 5'-Ende beginnend ab (und synthetisiert weiter), wodurch Quencher und Fluorophor voneinander getrennt werden, so dass nun eine Fluoreszenz gemessen werden kann (Abbildung 4.2). Weil die Ausgangs-DNA vervielfältigt wurde, können im nächsten PCR-Zyklus mehr TaqMan-Sonden binden,

##### 1. Polymerisation beginnt



##### 2. Verdrängung/Verdau



##### 3. Polymerisation wird beendet

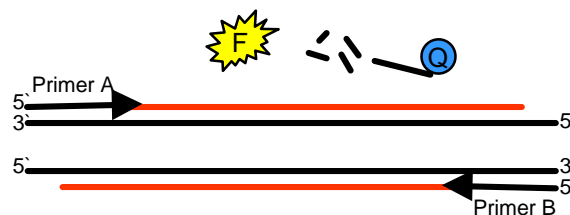


Abb. 4.2 Prinzip der TaqMan-Methode. Erklärung im Text.

wodurch auch mehr Fluorophor freigesetzt wird. Dies führt ab einem bestimmten Zeitpunkt, dem sogenannten Kreuzungspunkt (*Crossingpoint*) zum exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz. Je mehr Template-DNA in der Probe vorhanden war, umso weniger PCR-Zyklen werden benötigt, bis der Kreuzungspunkt erreicht ist. Anhand der Steigung der exponentiellen Kurve kann der Kreuzungspunkt für jede Probe errechnet werden. Mit Hilfe von Standardverdünnungen von Plasmiden, die die Zielsequenz enthalten, kann dann eine Eichgerade erstellt werden, wodurch die DNA-Konzentration der unbekanntenen Proben errechnet werden kann.

Als Template für die quantitative PCR wurde die DNA aus  $1 \times 10^5$  Zellen isoliert, die 6 bis 48 Stunden vorher mit je 5000 infektiösen Einheiten verschiedener Virusstocks (gemessen in U87/CD4/X4-Zellen) infiziert worden waren. Die Isolation der DNA (zelluläre, inklusive virale) erfolgte mit DNAzol (Gibco). Anschließend wurden die Konzentrationen der isolierten DNAs im Photometer bestimmt und durch entsprechende Verdünnung mit Wasser gleich eingestellt. Für die quantitative PCR wurde dann in jeder Reaktion gleich viel Gesamt-DNA eingesetzt. Die Konzentration der Gesamt-DNA entspricht dabei der Konzentration der zellulären DNA, da diese in den Proben im Vergleich zur viralen DNA im großen Überschuss vorliegt. Somit kann gewährleistet werden, dass in jede Probe gleich viel Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Von DNAs, die aus U87/CD4/X4-Zellen gewonnen worden waren, wurden je 100 ng in 10 µl Volumen für die quantitative PCR eingesetzt. Von DNAs, die aus GHOST/X4-Zellen isoliert worden waren, wurden je 250 ng in 10 µl Volumen eingesetzt, da GHOST/X4-Zellen schlechter infizierbar sind als U87/CD4/X4-Zellen und somit höhere Werte in der quantitativen PCR erzielt werden konnten.

20 µl Reaktions-Ansatz enthielten:	100 bis 250 ng Template DNA
	10 pMol pro Primer
	2 µl 10x LC FastStart Premix (Roche)
	0,3 µl TaqMan-Sonde [10 pmol/µl]
	Wasser
	4 mM Magnesiumchlorid

Die Reaktionsansätze wurden generell in einem Kühlblock vorbereitet. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe des Plasmides ACR23. 1 µg ACR23 entspricht  $7,1 \times 10^{10}$  Molekülen. Das Plasmid wurde so verdünnt, dass  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  Moleküle ACR23 in die einzelnen Standard-Reaktionen eingesetzt werden konnten.

Die quantitative PCR wurde mit folgendem Programm im LightCycler (Roche) gefahren:

Denaturierung	10 min	95°C	
Denaturierung	15 sec	95°C	} 35x
Annealing und	1 min	60°C	
Elongation			



Der Anstieg der Fluoreszenz wurde jeweils am Ende der Elongationsphase gemessen. Die Berechnung der DNA-Konzentrationen der Proben erfolgte durch die LightCycler Software 3.5.

#### 4.12.27 BlaM-Assay

Mit Hilfe des  $\beta$ -Lactamase Reporter Assays (BlaM-Assay) kann der Eintritt von viralen Partikel in Zellen quantifiziert werden. Zunächst müssen durch Kotransfektion virale Partikel hergestellt werden, die das Fusionsprotein  $\beta$ -Lactamase-Vpr durch die Interaktion des Vpr-Proteines mit anderen viralen Komponenten verpackt haben. Kann ein solches Virus mit der Zellmembran fusionieren, wird das virale Kapsid und folglich auch das  $\beta$ -Lactamase-Vpr Fusionsprotein ins Zytosol freigesetzt. Werden die infizierten Zellen nun mit dem Farbstoff CCF2 ( $\beta$ -Lactamase-Substrat, Panvera/Invitrogen) beladen, so kann die  $\beta$ -Lactamase diesen spalten. Regt man ungespaltenes CCF2 bei einer Wellenlänge von 409 nm an, so emittiert es bei 520 nm (grün), während gespaltenes CCF2 bei 447 nm emittiert (blau). Im Fluorometer kann somit die Menge an gespaltenem und ungespaltenem CCF2 bestimmt werden. Der Quotient aus den für blaue und grüne Fluoreszenz gemessenen Werten steigt proportional zur Menge der viralen Partikel an, die in das Zytosol der Zelle gelangt sind. Je mehr Viren in die Zelle gelangen, umso mehr  $\beta$ -Lactamase-Vpr Fusionsproteine befinden sich im Zytosol, umso mehr CCF2 wird gespalten und umso größer wird der für die blaue Fluoreszenz gemessene Wert. Dieser Assay erfasst nur virale Partikel, die über eine HIV-Rezeptor-vermittelte Fusion mit der zellulären Membran in das Zytosol gekommen sind. Virale Partikel, die durch unspezifische Endozytose aufgenommen wurden, werden nicht gemessen, da der Farbstoff CCF2 nicht in Endosomen bzw. andere vesikuläre Strukturen eindringen kann (GeneBLAzer detection kits manual, Invitrogen; Schaeffer et al., 2004).

Zur Herstellung von pseudotypisierten Partikeln, die das  $\beta$ -Lactamase-Vpr-Fusionsprotein beinhalten, wurden  $3 \times 10^6$  293T-Zellen in 10 cm Schalen mit 3  $\mu$ g Env-Expressionsplasmid, 3  $\mu$ g ROD-A?env und 0,5  $\mu$ g  $\beta$ -Lactamase-Vpr2-Plasmid kotransfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände geerntet, filtriert (0,45  $\mu$ m) und durch Ultrazentrifugation 200 bis 400fach ankonzentriert. Von diesen konzentrierten Virusstocks wurden dann je 100  $\mu$ l eingesetzt, um  $1 \times 10^4$  GHOST/X4-Zellen in 96-Loch-Platten (schwarz mit durchsichtigem Boden, Nunc) zu infizieren. Aufgrund der höheren Suszeptibilität von U87/CD4/X4-Zellen wurden diese mit nur je 4  $\mu$ l konzentriertem Virusstock infiziert. Etwa drei Stunden nach der Infektion wurden die Zellen 1x mit 200  $\mu$ l CO<sub>2</sub>-unabhängigem Medium (Gibco, mit 2 mM Glutamin, ohne FCS und Antibiotika) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 50 bis 100  $\mu$ l einer CCF2-Färbelösung für ca. 12 Stunden, bei Raumtemperatur, im Dunkeln inkubiert.

CCF2-Färbelösung:	2 $\mu$ l CCF2 Stocklösung [1 mM]	GeneBLAzer Loading Kit
	8 $\mu$ l Lösung B (100 mg/ml Pluronic-F127)	GeneBLAzer Loading Kit
	1 ml DMEM, CO <sub>2</sub> -unabhängig, 2 mM Glutamin, kein FCS, kein Antibiotikum	
	10 $\mu$ l Probenecid [250 mM, in 250mM NaOH]	Merck

Anschließend wurden die Zellen einmal mit 100 µl DMEM (ohne Phenolrot, Gibco) gewaschen. Zur Messung im Multiwell Fluorometer Safire (Tecan) wurden die Zellen mit 100 µl DMEM (ohne Phenolrot) versetzt.

Die Messung der Proben erfolgte im Multilabelling-Modus der Tecan-Fluorometer-Software (Makro in Microsoft Excel). Es wurde zuerst mit Licht der Wellenlänge 409 nm angeregt und dann die Fluoreszenz bei 447 nm mit einer Bandbreite von 5 nm gemessen. In einem zweiten Durchgang wurden die Proben wieder bei einer Wellenlänge von 409 nm angeregt, aber diesmal wurde die Fluoreszenz bei 520 nm mit einer Bandbreite von 5 nm gemessen. Jede einzelne Probe wurde mit 10 Lichtblitzen angeregt. Die Z-Position (Position über dem Boden der Probenplatte, an der die größte Fluoreszenz gemessen werden kann) beträgt im Falle von U87/CD4/X4-Zellen 4230 µm und im Falle von GHOST/X4 und HeLa P4/CCR5-Zellen 3350 µm.

### 4.12.28 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von proteinhaltigen Proben wurden diese zunächst mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Die Zellen einer 10 cm Kulturschalen wurden z.B. mit 1 ml SDS-Probenpuffer lysiert. Die so denaturierten Proteine wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und in SDS-Laufpuffer zunächst 1 Stunde bei 90 V und anschließend 2 bis 3 Stunden bei 250 V elektrophoretisch aufgetrennt. Da alle Proteine komplett mit dem anionischen Detergenz SDS bedeckt sind, erfolgt die Auftrennung im elektrischen Feld nur in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes. Durch die gleichzeitige Auftrennung von Standardproteinen (Rainbow Marker, Amersham), kann nach Sichtbarmachung der Proteine durch z.B. Western Blot ihre Größe abgeschätzt werden.

Die 10% SDS-Polyacrylamidgele wurden nach Laemmli (1970) gegossen:

Trenngel:

5 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid (:x)

5 ml 4x Trenngelpuffer

10 ml aqua bidest.

Spatelspitze APS

20 µl TEMED

Sammelgel:

2,5 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid

5 ml 4x Sammelgelpuffer

12,5 ml aqua bides.

Spatelspitze APS

20 µl TEMED

### 4.12.29 Western Blot

Der Western Blot dient zur spezifischen Anfärbung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen. Nach der SDS-PAGE wurde das SDS-Polyacrylamidgel 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Auch die Transfermembran (Protran Nitrozellulose Transfermembran von Schleicher & Schuell) wurde 15 min in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde bei 12 V in einer Semi-Dry Trans-Blot Apparatur (cti GmbH). Dazu wurden drei in Transferpuffer getränkte Whatman-Filter, die

Transfermembran, das SDS-Polyacrylamidgel und drei weitere Whatman-Filter übereinander gestapelt. Nach dem Transfer wurde die Membran 5 min in 6% Magermilchpulver in PBST blockiert, dann wurde der erste Antikörper hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Die Membran wurde anschließend 3mal 10 min in PBST gewaschen und dann erneut 5 min lang in 6% Magermilchpulver in PBST blockiert. Der zweite Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:8000 zugegeben. Die Inkubation erfolgte 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Anschließend wurde die Membran 3mal 10 min mit PBST und einmal mit PBS gewaschen. Die Detektion der Protein-Banden erfolgte mit dem ECL- oder ECF-System.

ECL-System:

Beim ECL-System (*enhanced chemiluminescence system*, Amersham) wird das ECL-Substrat durch das Peroxidase (PO) -Konjugat des Zweitantikörpers umgesetzt, wobei Licht freigesetzt wird. Dieses Licht kann durch Auflegen eines Röntgenfilms (Biomax ML, Scientific Imaging Film, Kodak) detektiert werden. Die Transfermembran wurde kurz in aqua bidest. geschwenkt, 1 min in einer 1:1 Mischung der ECL1- und ECL2-Lösungen inkubiert und anschließend in eine Filmkassette überführt.

Verdünnungen der Erstantikörper:	anti HIV-2	1:15000
	anti MAPK	1:1000
	anti p-MAPK	1:1000
	anti 14.3.3	1:5000
	anti $\beta$ -Lactamase	1:5000

### 4.12.30 Kinase Assay

Um die Aktivierung (Phosphorylierung) der MAPK (*mitogen activated protein kinase*) durch die verschiedenen viralen Partikel untersuchen zu können, wurden je  $7 \times 10^4$  U87/CD4/X4- und GHOST/X4-Zellen in 12-Loch-Platten mit gleichen Mengen an Env53S- und Env42S-Partikeln (gemessen am RT-Gehalt der Virusstocks) für 30 min bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in 100  $\mu$ l SDS-Probenpuffer lysiert. 20  $\mu$ l des Zelllysats wurden im ECL-Western Blot analysiert. Die Erstantikörper anti p-MAPK und anti MAPK wurden 1:1000 verdünnt eingesetzt. Der anti p-MAPK Antikörper erkennt aktivierte (phosphorylierte) MAPK, während der anti MAPK Antikörper die unstimulierte, nicht-phosphorylierte MAPK erkennt, deren Protein-Bande als Ladungskontrolle für die einzelnen Proben diente.

### 4.12.31 Quantifizierung des Hüllprotein-Einbaus in virale Partikel

Um die Einbau-Effizienz der verschiedenen Hüllproteine in HIV-2 Partikel bestimmen zu können, wurden  $3 \times 10^6$  293T-Zellen zur Herstellung von pseudotypisierten Viren mit einem Env-Expressions-Plasmid und dem proviralem Plasmid ROD-A?env kotransfiziert. 24 Stunden nach der Kotransfektion wurden die Zellen mit 100  $\mu$ Ci  $^{35}$ S-Met/Cys (Redivue Pro Labelling Mix, Amersham) über Nacht

inkubiert. Um die radioaktiv markierten viralen Partikel zu isolieren, wurden am nächsten Tag die Zellkulturüberstände gefiltert (0,45 µm) und ultrazentrifugiert (in SW41 Zentrifugenröhrchen: 6 ml Zellkulturüberstand auf 4 ml 20% Saccharose in PBS, 39 krpm, 90 min, 4°C). Die so pelletierten viralen Partikel wurden in 1 ml RIPA-Puffer für 20 min auf Eis lysiert. Um die viralen Proteine zu immunpräzipitieren wurden 30 µl einer 50% Protein A Sepharose-Suspension (in RIPA-Puffer) und 5 µl HIV-2 Serum dazugegeben und über Nacht unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharose mit den daran gebundenen Proteinen 2x in RIPA-Puffer und 1x in TNE-Puffer gewaschen. Dazu wurde die Sepharose zwischen den einzelnen Waschschritten 1 bis 3 min bei 2000 rpm abzentrifugiert. Die gewaschenen Sepharose-Kügelchen wurden in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt, um die daran gebundenen Proteine zu denaturieren. Die Protein-Lösung wurde anschließend durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Das getrocknete Polyacrylamidgel wurde für 4 Tage einem Phosphorimager-Screen exponiert, der dann im Phosphorimager (BioRad) ausgewertet wurde. Die radioaktiven Proteine wurden anschließend mit der QuantityOne-Software (BioRad) quantifiziert.

## 5. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
amp.	Ampicillin
AP	<i>alkaline phosphatase</i>
AP-1	Adaptorprotein 1
AP-2	Adaptorprotein 2
<i>APOBEC3G</i>	<i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
β-Gal	β-Galaktosidase
BlaM	β-Lactamase
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CA	Kapsid-Protein
ca.	circa
CaM	Calmodulin
C. atys	<i>Cercocebus atys</i>
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpz	<i>chimpanzee</i>
C-terminal	carboxyterminal
CTS	<i>counts</i>
?	delta
D	Dalton
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin</i>
DC-SIGNR	<i>dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin related</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle`s medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ehGFP	<i>enhanced humanized GFP</i>
EIAV	<i>equine infectious anemia virus</i> , Virus der infektiösen Anemie der Pferde
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
Env, <i>env</i>	<i>envelope</i> , Hüllprotein
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ERV-L	<i>endogenous retrovirus-like elements</i>
et al.	und andere
etc.	<i>et cetera</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FIV	<i>feline immunodeficiency virus</i> , Katzen-Immundefizienz Virus
FP	Fusionspeptid
Fv1	<i>friend virus susceptibility factor 1</i>
fwd	<i>forward</i>
g	Gramm
G	Guanin
GAG	Glukosaminoglykan
Gag, <i>gag</i>	<i>group specific antigen</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein
GSL	Glykosphingolipid
h	Stunde
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , Humanes Immundefizienz Virus
HSPG	Heparinsulfat-Proteoglykan
hu	human
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IgG	Immunglobulin G
IN	Integrase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
ko	<i>knock out</i>
kompl.	komplett
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LC	LightCycler
lck	<i>lymphoid-specific src family tyrosine kinase</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Lv1	<i>lentivirus susceptibility factor 1</i>
Lv2	<i>lentivirus susceptibility factor 2</i>

## Abkürzungen

---

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
µmol	Mikromol
M	molar
mac	<i>macaque</i> , Makake
MA	Matrix-Protein
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCR	<i>molecular clone restricted</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MCN	<i>molecular clone non-restricted</i>
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MESV	<i>murine embryonal stem cell virus</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mind.	mindestens
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
ml	Milliliter
MLV	<i>murine leukemia virus</i>
mm	Millimeter
mM	millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPSV	<i>murine myeloproliferative sarcoma retrovirus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NC	Nukleokapsid-Protein
Nef, <i>nef</i>	<i>negative factor</i>
NF-κB	Nuklearfaktor κB
N-MLV	N-tropes MLV
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	phospho
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS	<i>primer binding site</i>
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PI3	Phosphoinositol-3`

## Abkürzungen

---

PIC	Präintegrationskomplex
PKR	<i>protein kinase RNA-regulated</i>
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	Peroxidase
Pol, <i>pol</i>	Polymerase
PPT	<i>polypurine tract</i>
PR	Protease
pyk	<i>proline-rich tyrosine kinase</i>
R5	CCR5
Ref1	<i>restriction factor 1</i>
Ren	Renilla Luziferase
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
rev	<i>reverse</i>
Rev, <i>rev</i>	Rev-Protein
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDF	<i>stromal cell-derived factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i> , Affen-Immundefizienz Virus
sm	<i>sooty mangabey monkey</i> , Mohrenmangabe
SP	Signalpeptid
T	Thymin
t	Zeit
TAR	<i>Tat-responsive</i>
Tat, <i>tat</i>	<i>trans-activator</i>
TB	<i>terrific broth</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIM	<i>tripartite motif</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Tristetraprolin
U	<i>unit</i>
UTR	<i>untranslated region</i>



## Abkürzungen

---

UV	ultraviolett
V	Volt
V1-V5	Variable Regionen 1-5
vgl.	vergleiche
Vif, <i>vif</i>	<i>viral infectivity factor</i>
Vpr, <i>vpr</i>	<i>viral protein R</i>
Vpu, <i>vpu</i>	<i>viral protein U</i>
Vpx, <i>vpx</i>	<i>viral protein X</i>
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis Virus-Glykoprotein
X4	CXCR4
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
ZAP	<i>zinc-finger antiviral protein</i>
z.B.	zum Beispiel

## Aminosäuren

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

## 6. Literaturverzeichnis

- Adjorlolo-Johnson, G., De Cock, K. M., Ekpini, E., Vetter, K. M., Sibailly, T., Brattegaard, K., Yavo, D., Doorly, R., Whitaker, J. P., Kestens, L., and et al. (1994). Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. *Jama* **272**(6), 462-6.
- Alfano, M., Schmidtmayerova, H., Amella, C. A., Pushkarsky, T., and Bukrinsky, M. (1999). The B-oligomer of pertussis toxin deactivates CC chemokine receptor 5 and blocks entry of M-tropic HIV-1 strains. *J Exp Med* **190**(5), 597-605.
- Alkhatib, G., Locati, M., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., and Berger, E. A. (1997). HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology* **234**(2), 340-8.
- Amara, A., Gall, S. L., Schwartz, O., Salamero, J., Montes, M., Loetscher, P., Baggolini, M., Virelizier, J. L., and Arenzana-Seisdedos, F. (1997). HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* **186**(1), 139-46.
- Amara, A., Vidy, A., Boulla, G., Mollier, K., Garcia-Perez, J., Alcami, J., Blanpain, C., Parmentier, M., Virelizier, J. L., Charneau, P., and Arenzana-Seisdedos, F. (2003). G protein-dependent CCR5 signaling is not required for efficient infection of primary T lymphocytes and macrophages by R5 human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* **77**(4), 2550-8.
- Andersson, S., Norrgren, H., da Silva, Z., Biague, A., Bamba, S., Kwok, S., Christopherson, C., Biberfeld, G., and Albert, J. (2000). Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* **160**(21), 3286-93.
- Aramori, I., Ferguson, S. S., Bieniasz, P. D., Zhang, J., Cullen, B., and Cullen, M. G. (1997). Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. *Embo J* **16**(15), 4606-16.
- Arthos, J., Rubbert, A., Rabin, R. L., Cicala, C., Machado, E., Wildt, K., Hanbach, M., Steenbeke, T. D., Swofford, R., Farber, J. M., and Fauci, A. S. (2000). CCR5 signal transduction in macrophages by human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus envelopes. *J Virol* **74**(14), 6418-24.
- Berlioz-Torrent, C., Shacklett, B. L., Erdtmann, L., Delamarre, L., Bouchaert, I., Sonigo, P., Dokhelar, M. C., and Benarous, R. (1999). Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J Virol* **73**(2), 1350-61.
- Berry, N., Ariyoshi, K., Jaffar, S., Sabally, S., Corrah, T., Tedder, R., and Whittle, H. (1998). Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol* **1**(7), 457-68.
- Besnier, C., Takeuchi, Y., and Towers, G. (2002). Restriction of lentivirus in monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18), 11920-5.
- Best, S., Le Tissier, P., Towers, G., and Stoye, J. P. (1996). Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* **382**(6594), 826-9.
- Bieniasz, P. D., and Cullen, B. R. (1998). Chemokine receptors and human immunodeficiency virus infection. *Front Biosci* **3**, D44-58.
- Blacklow, S. C., Lu, M., and Kim, P. S. (1995). A trimeric subdomain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* **34**(46), 14955-62.

- Boge, M., Wyss, S., Bonifacino, J. S., and Thali, M. (1998). A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *J Biol Chem* **273**(25), 15773-8.
- Bour, S., Schubert, U., Peden, K., and Strebel, K. (1996). The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? *J Virol* **70**(2), 820-9.
- Bour, S., and Strebel, K. (1996). The human immunodeficiency virus (HIV) type 2 envelope protein is a functional complement to HIV type 1 Vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses. *J Virol* **70**(12), 8285-300.
- Briand, G., Barbeau, B., Corbeil, J., and Tremblay, M. (1997). Enhancement of HIV-1-induced syncytium formation in T cells by the tyrosyl kinase p56lck. *Virology* **231**(1), 10-9.
- Briant, L., Robert-Hebmann, V., Acquaviva, C., Pelchen-Matthews, A., Marsh, M., and Devaux, C. (1998a). The protein tyrosine kinase p56lck is required for triggering NF-kappaB activation upon interaction of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 with cell surface CD4. *J Virol* **72**(7), 6207-14.
- Briant, L., Robert-Hebmann, V., Sivan, V., Brunet, A., Pouyssegur, J., and Devaux, C. (1998b). Involvement of extracellular signal-regulated kinase module in HIV-mediated CD4 signals controlling activation of nuclear factor-kappa B and AP-1 transcription factors. *J Immunol* **160**(4), 1875-85.
- Bron, R., Klasse, P. J., Wilkinson, D., Clapham, P. R., Pelchen-Matthews, A., Power, C., Wells, T. N., Kim, J., Peiper, S. C., Hoxie, J. A., and Marsh, M. (1997). Promiscuous use of CC and CXC chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by a human immunodeficiency virus type 2 envelope protein. *J Virol* **71**(11), 8405-15.
- Brun-Vezinet, F., Rey, M. A., Katlama, C., Girard, P. M., Roulot, D., Yeni, P., Lenoble, L., Clavel, F., Alizon, M., Gabelle, S., and et al. (1987). Lymphadenopathy-associated virus type 2 in AIDS and AIDS-related complex. Clinical and virological features in four patients. *Lancet* **1**(8525), 128-32.
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A., and Stevenson, M. (1998). Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* **188**(11), 2113-25.
- Cavaco-Silva, P., Taveira, N. C., Rosado, L., Lourenco, M. H., Moniz-Pereira, J., Douglas, N. W., Daniels, R. S., and Santos-Ferreira, M. O. (1998). Virological and molecular demonstration of human immunodeficiency virus type 2 vertical transmission. *J Virol* **72**(4), 3418-22.
- Center, R. J., Schuck, P., Leapman, R. D., Arthur, L. O., Earl, P. L., Moss, B., and Lebowitz, J. (2001). Oligomeric structure of virion-associated and soluble forms of the simian immunodeficiency virus envelope protein in the prefusion activated conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26), 14877-82.
- Chackerian, B., Long, E. M., Luciw, P. A., and Overbaugh, J. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 coreceptors participate in postentry stages in the virus replication cycle and function in simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* **71**(5), 3932-9.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**(2), 263-73.
- Chan, D. C., and Kim, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**(5), 681-4.
- Chang, T. L., Gordon, C. J., Roscic-Mrkic, B., Power, C., Proudfoot, A. E., Moore, J. P., and Trkola, A. (2002). Interaction of the CC-chemokine RANTES with glycosaminoglycans activates a p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway and enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* **76**(5), 2245-54.

- Chen, C. Y., Gherzi, R., Ong, S. E., Chan, E. L., Raijmakers, R., Pruijn, G. J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**(4), 451-64.
- Cho, M. W., Lee, M. K., Carney, M. C., Berson, J. F., Doms, R. W., and Martin, M. A. (1998). Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. *J Virol* **72**(3), 2509-15.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**(7), 1135-48.
- Cicala, C., Arthos, J., Ruiz, M., Vaccarezza, M., Rubbert, A., Riva, A., Wildt, K., Cohen, O., and Fauci, A. S. (1999). Induction of phosphorylation and intracellular association of CC chemokine receptor 5 and focal adhesion kinase in primary human CD4+ T cells by macrophage-tropic HIV envelope. *J Immunol* **163**(1), 420-6.
- Clapham, P. R., McKnight, A., and Weiss, R. A. (1992). Human immunodeficiency virus type 2 infection and fusion of CD4-negative human cell lines: induction and enhancement by soluble CD4. *J Virol* **66**(6), 3531-7.
- Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C., and Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**(5243), 1811-5.
- Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Cara, A., Gallo, R. C., and Lusso, P. (1996). The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* **2**(11), 1244-7.
- Coffin, J. M. (1992). Structure and classification of retroviruses. *The retroviridae* (ed. J. A. Levy), pp19-49. Plenum Press, New York.
- Coffin, J.M., S.H. Hughes, H.E. Varmus (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, CSH, New York
- Cowan, S., Hatzioannou, T., Cunningham, T., Muesing, M. A., Gottlinger, H. G., and Bieniasz, P. D. (2002). Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18), 11914-9.
- Curtis, B. M., Scharnowske, S., and Watson, A. J. (1992). Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(17), 8356-60.
- Davis, C. B., Dikic, I., Unutmaz, D., Hill, C. M., Arthos, J., Siani, M. A., Thompson, D. A., Schlessinger, J., and Littman, D. R. (1997). Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J Exp Med* **186**(10), 1793-8.
- Decleve, A., Niwa, O., Gelmann, E., and Kaplan, H. S. (1975). Replication kinetics of N- and B-tropic murine leukemia viruses on permissive and nonpermissive cells in vitro. *Virology* **65**(2), 320-32.
- Delezay, O., Koch, N., Yahi, N., Hammache, D., Tourres, C., Tamalet, C., and Fantini, J. (1997). Co-expression of CXCR4/fusin and galactosylceramide in the human intestinal epithelial cell line HT-29. *Aids* **11**(11), 1311-8.
- Deng, H. K., Unutmaz, D., KewalRamani, V. N., and Littman, D. R. (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**(6639), 296-300.
- Der, S. D., Yang, Y. L., Weissmann, C., and Williams, B. R. (1997). A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7), 3279-83.

- Dolei, A., Biolchini, A., Serra, C., Curreli, S., Gomes, E., and Dianzani, F. (1998). Increased replication of T-cell-tropic HIV strains and CXC-chemokine receptor-4 induction in T cells treated with macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta and RANTES beta-chemokines. *Aids* **12**(2), 183-90.
- Dumonceaux, J., Nisole, S., Chanel, C., Quivet, L., Amara, A., Baleux, F., Briand, P., and Hazan, U. (1998). Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype. *J Virol* **72**(1), 512-9.
- Duran-Troise, G., Bassin, R. H., Rein, A., and Gerwin, B. I. (1977). Loss of Fv-1 restriction in Balb/3T3 cells following infection with a single N tropic murine leukemia virus particle. *Cell* **10**(3), 479-88.
- Dvorin, J. D., and Malim, M. H. (2003). Intracellular trafficking of HIV-1 cores: journey to the center of the cell. *Curr Top Microbiol Immunol* **281**, 179-208.
- Earl, P. L., Koenig, S., and Moss, B. (1991). Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol* **65**(1), 31-41.
- Edinger, A. L., Amedee, A., Miller, K., Doranz, B. J., Endres, M., Sharron, M., Samson, M., Lu, Z. H., Clements, J. E., Murphey-Corb, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Broder, C. C., and Doms, R. W. (1997). Differential utilization of CCR5 by macrophage and T cell tropic simian immunodeficiency virus strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8), 4005-10.
- Endres, M. J., Clapham, P. R., Marsh, M., Ahuja, M., Turner, J. D., McKnight, A., Thomas, J. F., Stoebenau-Haggarty, B., Choe, S., Vance, P. J., Wells, T. N., Power, C. A., Sutterwala, S. S., Doms, R. W., Landau, N. R., and Hoxie, J. A. (1996). CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **87**(4), 745-56.
- Fackler, O.T. und Geyer, M. (2002). Der Aktivität des Nef-Proteins auf der Spur. *Biologie in unserer Zeit*. **32**(2), 90-100.
- Fantini, J., Cook, D. G., Nathanson, N., Spitalnik, S. L., and Gonzalez-Scarano, F. (1993). Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(7), 2700-4.
- Farzan, M., Choe, H., Martin, K., Marcon, L., Hofmann, W., Karlsson, G., Sun, Y., Barrett, P., Marchand, N., Sullivan, N., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. (1997). Two orphan seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med* **186**(3), 405-11.
- Fields B.N., D.M. Knipe, P.M. Howley, eds. (1996). *Fields Virology*, 3.ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York
- Fouchier, R. A., Simon, J. H., Jaffe, A. B., and Malim, M. H. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins. *J Virol* **70**(12), 8263-9.
- Francois, F., and Klotman, M. E. (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates human immunodeficiency virus type 1 replication following viral entry in primary CD4+ T lymphocytes and macrophages. *J Virol* **77**(4), 2539-49.
- Freed, E. O., and Martin, M. A. (1995). The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem* **270**(41), 23883-6.
- Freed, E. O., and Martin, M. A. (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* **70**(1), 341-51.

- Freed, E. O., Myers, D. J., and Risser, R. (1989). Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J Virol* **63**(11), 4670-5.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**(6718), 436-41.
- Gao, F., Yue, L., White, A. T., Pappas, P. G., Barchue, J., Hanson, A. P., Greene, B. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., and Hahn, B. H. (1992). Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**(6386), 495-9.
- Gao, G., Guo, X., and Goff, S. P. (2002). Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. *Science* **297**(5587), 1703-6.
- Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**(5), 587-97.
- Goff, S. P. (1996). Operating under a Gag order: a block against incoming virus by the Fv1 gene. *Cell* **86**(5), 691-3.
- Gordon, C. J., Muesing, M. A., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Moore, J. P., and Trkola, A. (1999). Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by the CC-chemokine RANTES is independent of the mechanism of virus-cell fusion. *J Virol* **73**(1), 684-94.
- Gosling, J., Monteclaro, F. S., Atchison, R. E., Arai, H., Tsou, C. L., Goldsmith, M. A., and Charo, I. F. (1997). Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5-induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10), 5061-6.
- Guillerm, C., Coudronniere, N., Robert-Hebmann, V., and Devaux, C. (1998). Delayed human immunodeficiency virus type 1-induced apoptosis in cells expressing truncated forms of CD4. *J Virol* **72**(3), 1754-61.
- Guillon, C., van der Ende, M. E., Boers, P. H., Gruters, R. A., Schutten, M., and Osterhaus, A. D. (1998). Coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 2 primary isolates and biological clones is broad and does not correlate with their syncytium-inducing capacities. *J Virol* **72**(7), 6260-3.
- Guntermann, C., Murphy, B. J., Zheng, R., Qureshi, A., Eagles, P. A., and Nye, K. E. (1999). Human immunodeficiency virus-1 infection requires pertussis toxin sensitive G-protein-coupled signalling and mediates cAMP downregulation. *Biochem Biophys Res Commun* **256**(2), 429-35.
- Hallenberger, S., Moulard, M., Sordel, M., Klenk, H. D., and Garten, W. (1997). The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J Virol* **71**(2), 1036-45.
- Hammache, D., Yahi, N., Maresca, M., Pieroni, G., and Fantini, J. (1999). Human erythrocyte glycosphingolipids as alternative cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry: evidence for CD4-induced interactions between HIV-1 gp120 and reconstituted membrane microdomains of glycosphingolipids (Gb3 and GM3). *J Virol* **73**(6), 5244-8.
- Harouse, J. M., Bhat, S., Spitalnik, S. L., Laughlin, M., Stefano, K., Silberberg, D. H., and Gonzalez-Scarano, F. (1991). Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* **253**(5017), 320-3.
- Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Neuberger, M. S., and Malim, M. H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**(6), 803-9.

- Hartley, J. W., Rowe, W. P., and Huebner, R. J. (1970). Host-range restrictions of murine leukemia viruses in mouse embryo cell cultures. *J Virol* **5**(2), 221-5.
- Hatzioannou, T., Cowan, S., Goff, S. P., Bieniasz, P. D., and Towers, G. J. (2003). Restriction of multiple divergent retroviruses by Lv1 and Ref1. *Embo J* **22**(3), 385-94.
- Hildinger, M., Abel, K. L., Ostertag, W., and Baum, C. (1999). Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* **73**(5), 4083-9.
- Hill, C. M., Deng, H., Unutmaz, D., Kewalramani, V. N., Bastiani, L., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S., and Littman, D. R. (1997). Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and make direct CD4-dependent interactions with this chemokine receptor. *J Virol* **71**(9), 6296-304.
- Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H., and Johnson, P. R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**(6223), 389-92.
- Hoffman, T. L., and Doms, R. W. (1998). Chemokines and coreceptors in HIV/SIV-host interactions. *Aids* **12 Suppl A**, S17-26.
- Hoffman, T. L., Stephens, E. B., Narayan, O., and Doms, R. W. (1998). HIV type I envelope determinants for use of the CCR2b, CCR3, STRL33, and APJ coreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19), 11360-5.
- Hofmann, W., Schubert, D., LaBonte, J., Munson, L., Gibson, S., Scammell, J., Ferrigno, P., and Sodroski, J. (1999). Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. *J Virol* **73**(12), 10020-8.
- Hug, P., Lin, H. M., Korte, T., Xiao, X., Dimitrov, D. S., Wang, J. M., Puri, A., and Blumenthal, R. (2000). Glycosphingolipids promote entry of a broad range of human immunodeficiency virus type 1 isolates into cell lines expressing CD4, CXCR4, and/or CCR5. *J Virol* **74**(14), 6377-85.
- Hunter, E. (1994). Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Semin Virol* **5**: 71-83
- Ignatius, R., Isdell, F., O'Doherty, U., and Pope, M. (1998). Dendritic cells from skin and blood of macaques both promote SIV replication with T cells from different anatomical sites. *J Med Primatol* **27**(2-3), 121-8.
- Iyengar, S., Hildreth, J. E., and Schwartz, D. H. (1998). Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *J Virol* **72**(6), 5251-5.
- Johnston, P. B., Dubay, J. W., and Hunter, E. (1993). Truncations of the simian immunodeficiency virus transmembrane protein confer expanded virus host range by removing a block to virus entry into cells. *J Virol* **67**(6), 3077-86.
- Jolicoeur, P., and Baltimore, D. (1976). Effect of Fv-1 gene product on proviral DNA formation and integration in cells infected with murine leukemia viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7), 2236-40.
- Kanki, P. J., Travers, K. U., S, M. B., Hsieh, C. C., Marlink, R. G., Gueye, N. A., Siby, T., Thior, I., Hernandez-Avila, M., Sankale, J. L., and et al. (1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* **343**(8903), 943-6.
- Keller, R., Peden, K., Paulous, S., Montagnier, L., and Cordonnier, A. (1993). Amino acid changes in the fourth conserved region of human immunodeficiency virus type 2 strain HIV-2ROD envelope glycoprotein modulate fusion. *J Virol* **67**(10), 6253-8.
- Kelly, M. D., Naif, H. M., Adams, S. L., Cunningham, A. L., and Lloyd, A. R. (1998). Dichotomous effects of beta-chemokines on HIV replication in monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* **160**(7), 3091-5.

- Kerr, I. M., and Brown, R. E. (1978). pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(1), 256-60.
- Kinet, S., Bernard, F., Mongellaz, C., Perreau, M., Goldman, F. D., and Taylor, N. (2002). gp120-mediated induction of the MAPK cascade is dependent on the activation state of CD4(+) lymphocytes. *Blood* **100**(7), 2546-53.
- Kinter, A., Catanzaro, A., Monaco, J., Ruiz, M., Justement, J., Moir, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostrowski, M., Hoxie, J., Offord, R., and Fauci, A. S. (1998). CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20), 11880-5.
- Kolchinsky, P., Kiprilov, E., Bartley, P., Rubinstein, R., and Sodroski, J. (2001). Loss of a single N-linked glycan allows CD4-independent human immunodeficiency virus type 1 infection by altering the position of the gp120 V1/V2 variable loops. *J Virol* **75**(7), 3435-43.
- Kolchinsky, P., Mirzabekov, T., Farzan, M., Kiprilov, E., Cayabyab, M., Mooney, L. J., Choe, H., and Sodroski, J. (1999). Adaptation of a CCR5-using, primary human immunodeficiency virus type 1 isolate for CD4-independent replication. *J Virol* **73**(10), 8120-6.
- Kozak, S. L., Heard, J. M., and Kabat, D. (2002). Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol* **76**(4), 1802-15.
- Kuhmann, S. E., Platt, E. J., Kozak, S. L., and Kabat, D. (2000). Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**(15), 7005-15.
- Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A., and Littman, D. R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* **16**(1), 135-44.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**(6686), 648-59.
- LaBranche, C. C., Hoffman, T. L., Romano, J., Haggarty, B. S., Edwards, T. G., Matthews, T. J., Doms, R. W., and Hoxie, J. A. (1999). Determinants of CD4 independence for a human immunodeficiency virus type 1 variant map outside regions required for coreceptor specificity. *J Virol* **73**(12), 10310-9.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Lai, W. S., and Blackshear, P. J. (2001). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in the absence of a poly(A) tail. *J Biol Chem* **276**(25), 23144-54.
- Lai, W. S., Carballo, E., Strum, J. R., Kennington, E. A., Phillips, R. S., and Blackshear, P. J. (1999). Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* **19**(6), 4311-23.
- Larkin, M., Childs, R. A., Matthews, T. J., Thiel, S., Mizuochi, T., Lawson, A. M., Savill, J. S., Haslett, C., Diaz, R., and Feizi, T. (1989). Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *Aids* **3**(12), 793-8.
- Layne, S. P., Merges, M. J., Dembo, M., Spouge, J. L., and Nara, P. L. (1990). HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection. *Nature* **346**(6281), 277-9.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., and Hance, A. J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300**(5622), 1112.



- Lee, S., Tiffany, H. L., King, L., Murphy, P. M., Golding, H., and Zaitseva, M. B. (2000). CCR8 on human thymocytes functions as a human immunodeficiency virus type 1 coreceptor. *J Virol* **74**(15), 6946-52.
- Lee, W. R., Syu, W. J., Du, B., Matsuda, M., Tan, S., Wolf, A., Essex, M., and Lee, T. H. (1992a). Nonrandom distribution of gp120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(6), 2213-7.
- Lee, W. R., Yu, X. F., Syu, W. J., Essex, M., and Lee, T. H. (1992b). Mutational analysis of conserved N-linked glycosylation sites of human immunodeficiency virus type 1 gp41. *J Virol* **66**(3), 1799-803.
- Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N., and Gregory, T. J. (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.
- Lilly, F. (1967). Susceptibility to two strains of Friend leukemia virus in mice. *Science* **155**(761), 461-2.
- Lin, G., Lee, B., Haggarty, B. S., Doms, R. W., and Hoxie, J. A. (2001). CD4-independent use of Rhesus CCR5 by human immunodeficiency virus Type 2 implicates an electrostatic interaction between the CCR5 N terminus and the gp120 C4 domain. *J Virol* **75**(22), 10766-78.
- Lodge, R., Gottlinger, H., Gabuzda, D., Cohen, E. A., and Lemay, G. (1994). The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J Virol* **68**(8), 4857-61.
- Lodge, R., Lalonde, J. P., Lemay, G., and Cohen, E. A. (1997). The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *Embo J* **16**(4), 695-705.
- Lu, M., Blacklow, S. C., and Kim, P. S. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* **2**(12), 1075-82.
- Lu, Z., Berson, J. F., Chen, Y., Turner, J. D., Zhang, T., Sharron, M., Jenks, M. H., Wang, Z., Kim, J., Rucker, J., Hoxie, J. A., Peiper, S. C., and Doms, R. W. (1997). Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12), 6426-31.
- Manes, S., del Real, G., Lacalle, R. A., Lucas, P., Gomez-Mouton, C., Sanchez-Palomino, S., Delgado, R., Alcami, J., Mira, E., and Martinez, A. C. (2000). Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep* **1**(2), 190-6.
- Manes, S., del Real, G., and Martinez, A. C. (2003). Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **3**(7), 557-68.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**(6944), 99-103.
- Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H., and Landau, N. R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**(1), 21-31.
- Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C. C., Dia, M. C., Gueye, E. H., and et al. (1994). Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* **265**(5178), 1587-90.
- McCune, J. M., Rabin, L. B., Feinberg, M. B., Lieberman, M., Kosek, J. C., Reyes, G. R., and Weissman, I. L. (1988). Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**(1), 55-67.

- McKnight, A., Dittmar, M. T., Moniz-Periera, J., Ariyoshi, K., Reeves, J. D., Hibbitts, S., Whitby, D., Aarons, E., Proudfoot, A. E., Whittle, H., and Clapham, P. R. (1998). A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4. *J Virol* **72**(5), 4065-71.
- McKnight, A., Griffiths, D. J., Dittmar, M., Clapham, P., and Thomas, E. (2001). Characterization of a late entry event in the replication cycle of human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* **75**(15), 6914-22.
- Melikyan, G. B., Markosyan, R. M., Hemmati, H., Delmedico, M. K., Lambert, D. M., and Cohen, F. S. (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* **151**(2), 413-23.
- Misse, D., Cerutti, M., Noraz, N., Jourdan, P., Favero, J., Devauchelle, G., Yssel, H., Taylor, N., and Veas, F. (1999). A CD4-independent interaction of human immunodeficiency virus-1 gp120 with CXCR4 induces their cointernalization, cell signaling, and T-cell chemotaxis. *Blood* **93**(8), 2454-62.
- Modrow, S. und Falke, D. *Molekulare Virologie* (1997). Spektrum Akademischer Verlag
- Mondor, I., Ugolini, S., and Sattentau, Q. J. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol* **72**(5), 3623-34.
- Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D., and Sattentau, Q. J. (2000). Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* **74**(4), 1948-60.
- Munk, C., Brandt, S. M., Lucero, G., and Landau, N. R. (2002). A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21), 13843-8.
- Murakami, T., Ablan, S., Freed, E. O., and Tanaka, Y. (2004). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. *J Virol* **78**(2), 1026-31.
- Murphy, F. A., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, and M.D. Summers, eds. (1994). *Virus Taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. Retroviridae*. Springer-Verlag, Wien.
- Myers G, Korber BT, Foley BT, Jeang K-T, Mellors JW and Wain-Hobson S, eds.(1996). *A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Human Retroviruses and AIDS 1996*, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.
- Nguyen, D. H., and Taub, D. (2002). CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *J Immunol* **168**(8), 4121-6.
- Odaka, T., and Yamamoto, T. (1965). Inheritance of susceptibility to Friend mouse leukemia virus. 11. Spleen foci method applied to test the susceptibility of crossbred progeny between a sensitive and a resistant strain. *Jpn J Exp Med* **35**(4), 311-4.
- O'Donovan, D., Ariyoshi, K., Milligan, P., Ota, M., Yamuah, L., Sarge-Njie, R., and Whittle, H. (2000). Maternal plasma viral RNA levels determine marked differences in mother-to-child transmission rates of HIV-1 and HIV-2 in The Gambia. MRC/Gambia Government/University College London Medical School working group on mother-child transmission of HIV. *Aids* **14**(4), 441-8.
- Ogert, R. A., Lee, M. K., Ross, W., Buckler-White, A., Martin, M. A., and Cho, M. W. (2001). N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* **75**(13), 5998-6006.

- Ohno, H., Aguilar, R. C., Fournier, M. C., Hennecke, S., Cosson, P., and Bonifacino, J. S. (1997). Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. *Virology* **238**(2), 305-15.
- Owen, S. M., Ellenberger, D., Rayfield, M., Wiktor, S., Michel, P., Grieco, M. H., Gao, F., Hahn, B. H., and Lal, R. B. (1998). Genetically divergent strains of human immunodeficiency virus type 2 use multiple coreceptors for viral entry. *J Virol* **72**(7), 5425-32.
- Owens, R. J., Dubay, J. W., Hunter, E., and Compans, R. W. (1991). Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9), 3987-91.
- Parton, R. G., and Lindsay, M. (1999). Exploitation of major histocompatibility complex class I molecules and caveolae by simian virus 40. *Immunol Rev* **168**, 23-31.
- Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D. C., Oravec, T., Hascall, V. C., and Norcross, M. A. (1993). Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**(2), 167-74.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18), 8392-6.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., and Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**(5), 473-83.
- Pepin, J., Morgan, G., Dunn, D., Gevao, S., Mendy, M., Gaye, I., Scollen, N., Tedder, R., and Whittle, H. (1991). HIV-2-induced immunosuppression among asymptomatic West African prostitutes: evidence that HIV-2 is pathogenic, but less so than HIV-1. *Aids* **5**(10), 1165-72.
- Pincus, T., Rowe, W. P., and Lilly, F. (1971). A major genetic locus affecting resistance to infection with murine leukemia viruses. II. Apparent identity to a major locus described for resistance to friend murine leukemia virus. *J Exp Med* **133**(6), 1234-41.
- Player, M. R., and Torrence, P. F. (1998). The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol Ther* **78**(2), 55-113.
- Pleskoff, O., Treboute, C., Brelot, A., Heveker, N., Seman, M., and Alizon, M. (1997). Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* **276**(5320), 1874-8.
- Pohlmann, S., Baribaud, F., Lee, B., Leslie, G. J., Sanchez, M. D., Hiebenthal-Millow, K., Munch, J., Kirchhoff, F., and Doms, R. W. (2001a). DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* **75**(10), 4664-72.
- Pohlmann, S., Soilleux, E. J., Baribaud, F., Leslie, G. J., Morris, L. S., Trowsdale, J., Lee, B., Coleman, N., and Doms, R. W. (2001b). DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5), 2670-5.
- Pollakis, G., Kang, S., Kliphuis, A., Chalaby, M. I., Goudsmit, J., and Paxton, W. A. (2001). N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* **276**(16), 13433-41.
- Popik, W., Alce, T. M., and Au, W. C. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol* **76**(10), 4709-22.
- Popik, W., Hesselgesser, J. E., and Pitha, P. M. (1998). Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway. *J Virol* **72**(8), 6406-13.

- Popik, W., and Pitha, P. M. (1996). Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 induces association of Lck and Raf-1 and activates Raf-1 by a Ras-independent pathway. *Mol Cell Biol* **16**(11), 6532-41.
- Popik, W., and Pitha, P. M. (2000a). Inhibition of CD3/CD28-mediated activation of the MEK/ERK signaling pathway represses replication of X4 but not R5 human immunodeficiency virus type 1 in peripheral blood CD4(+) T lymphocytes. *J Virol* **74**(6), 2558-66.
- Popik, W., and Pitha, P. M. (2000b). Exploitation of cellular signaling by HIV-1: unwelcome guests with master keys that signal their entry. *Virology* **276**(1), 1-6.
- Poulsen, A. G., Aaby, P., Larsen, O., Jensen, H., Naucner, A., Lisse, I. M., Christiansen, C. B., Dias, F., and Melbye, M. (1997). 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa. *Lancet* **349**(9056), 911-4.
- Pryciak, P. M., and Varmus, H. E. (1992). Fv-1 restriction and its effects on murine leukemia virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* **66**(10), 5959-66.
- Puffer, B. A., Pohlmann, S., Edinger, A. L., Carlin, D., Sanchez, M. D., Reitter, J., Watry, D. D., Fox, H. S., Desrosiers, R. C., and Doms, R. W. (2002). CD4 independence of simian immunodeficiency virus Envs is associated with macrophage tropism, neutralization sensitivity, and attenuated pathogenicity. *J Virol* **76**(6), 2595-605.
- Puri, A., Hug, P., Jernigan, K., Barchi, J., Kim, H. Y., Hamilton, J., Wiels, J., Murray, G. J., Brady, R. O., and Blumenthal, R. (1998a). The neutral glycosphingolipid globotriaosylceramide promotes fusion mediated by a CD4-dependent CXCR4-utilizing HIV type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24), 14435-40.
- Puri, A., Hug, P., Jernigan, K., Rose, P., and Blumenthal, R. (1999). Role of glycosphingolipids in HIV-1 entry: requirement of globotriaosylceramide (Gb3) in CD4/CXCR4-dependent fusion. *Biosci Rep* **19**(4), 317-25.
- Puri, A., Hug, P., Munoz-Barroso, I., and Blumenthal, R. (1998b). Human erythrocyte glycolipids promote HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion of CD4+ cells. *Biochem Biophys Res Commun* **242**(1), 219-25.
- Reeves, J. D., Hibbitts, S., Simmons, G., McKnight, A., Azevedo-Pereira, J. M., Moniz-Pereira, J., and Clapham, P. R. (1999). Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *J Virol* **73**(9), 7795-804.
- Reeves, J. D., McKnight, A., Potempa, S., Simmons, G., Gray, P. W., Power, C. A., Wells, T., Weiss, R. A., and Talbot, S. J. (1997). CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7-transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3, and V28 for entry. *Virology* **231**(1), 130-4.
- Reeves, J. D., and Schulz, T. F. (1997). The CD4-independent tropism of human immunodeficiency virus type 2 involves several regions of the envelope protein and correlates with a reduced activation threshold for envelope-mediated fusion. *J Virol* **71**(2), 1453-65.
- Remy, G. (1998). HIV-2 infection throughout the world. A geographical perspective. *Sante* **8**(6), 440-6.
- Rider, C. C., Coombe, D. R., Harrop, H. A., Hounsell, E. F., Bauer, C., Feeney, J., Mulloy, B., Mahmood, N., Hay, A., and Parish, C. R. (1994). Anti-HIV-1 activity of chemically modified heparins: correlation between binding to the V3 loop of gp120 and inhibition of cellular HIV-1 infection in vitro. *Biochemistry* **33**(22), 6974-80.
- Ritter, G. D., Jr., Yamshchikov, G., Cohen, S. J., and Mulligan, M. J. (1996). Human immunodeficiency virus type 2 glycoprotein enhancement of particle budding: role of the cytoplasmic domain. *J Virol* **70**(4), 2669-73.

- Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., and Sodroski, J. (1998). A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**(5371), 1949-53.
- Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H., and Norcross, M. A. (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.
- Rosenberger, C. M., Brumell, J. H., and Finlay, B. B. (2000). Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol* **10**(22), R823-5.
- Rucker, J., Doranz, B. J., Edinger, A. L., Long, D., Berson, J. F., and Doms, R. W. (1997a). Cell-cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Methods Enzymol* **288**, 118-33.
- Rucker, J., Edinger, A. L., Sharron, M., Samson, M., Lee, B., Berson, J. F., Yi, Y., Margulies, B., Collman, R. G., Doranz, B. J., Parmentier, M., and Doms, R. W. (1997b). Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **71**(12), 8999-9007.
- Samuel, B. U., Mohandas, N., Harrison, T., McManus, H., Rosse, W., Reid, M., and Haldar, K. (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J Biol Chem* **276**(31), 29319-29.
- Schaeffer, E., Soros, V. B., and Greene, W. C. (2004). Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes. *J Virol* **78**(3), 1375-83.
- Schaeffer, H. J., and Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**(4), 2435-44.
- Schambach, A., Wodrich, H., Hildinger, M., Bohne, J., Krausslich, H. G., and Baum, C. (2000). Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther* **2**(5), 435-45.
- Schmidtayerova, H., Alfano, M., Nuovo, G., and Bukrinsky, M. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 T-lymphotropic strains enter macrophages via a CD4- and CXCR4-mediated pathway: replication is restricted at a postentry level. *J Virol* **72**(6), 4633-42.
- Schmidtayerova, H., Sherry, B., and Bukrinsky, M. (1996). Chemokines and HIV replication. *Nature* **382**(6594), 767.
- Schmitz, C., Marchant, D., Neil, S. J., Aubin, K., Reuter, S., Dittmar, M. T., and McKnight, A. (2004). Lv2, a novel postentry restriction, is mediated by both capsid and envelope. *J Virol* **78**(4), 2006-16.
- Schubert, U., Bour, S., Ferrer-Montiel, A. V., Montal, M., Maldarell, F., and Strebel, K. (1996). The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol* **70**(2), 809-19.
- Seddiki, N., Ramdani, A., Saffar, L., Portoukalian, J., Gluckman, J. C., and Gattegno, L. (1994). A monoclonal antibody directed to sulfatide inhibits the binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein to macrophages but not their infection by the virus. *Biochim Biophys Acta* **1225**(3), 289-96.
- Sharron, M., Pohlmann, S., Price, K., Lolis, E., Tsang, M., Kirchhoff, F., Doms, R. W., and Lee, B. (2000). Expression and coreceptor activity of STRL33/Bonzo on primary peripheral blood lymphocytes. *Blood* **96**(1), 41-9.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., and Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**(6898), 646-50.

- Simmons, G., Reeves, J. D., Hibbitts, S., Stine, J. T., Gray, P. W., Proudfoot, A. E., and Clapham, P. R. (2000). Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands. *Immunol Rev* **177**, 112-26.
- Simmons, G., Reeves, J. D., McKnight, A., DeJucq, N., Hibbitts, S., Power, C. A., Aarons, E., Schols, D., De Clercq, E., Proudfoot, A. E., and Clapham, P. R. (1998). CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *J Virol* **72**(10), 8453-7.
- Simon, F., Matheron, S., Tamalet, C., Lousset-Ajaka, I., Bartczak, S., Pepin, J. M., Dhiver, C., Gamba, E., Elbim, C., Gastaut, J. A., and et al. (1993). Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *Aids* **7**(11), 1411-7.
- Sol, N., Ferchal, F., Braun, J., Pleskoff, O., Treboute, C., Ansart, I., and Alizon, M. (1997). Usage of the coreceptors CCR-5, CCR-3, and CXCR-4 by primary and cell line-adapted human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* **71**(11), 8237-44.
- Soriano, V., Gomes, P., Heneine, W., Holguin, A., Doruana, M., Antunes, R., Mansinho, K., Switzer, W. M., Araujo, C., Shanmugam, V., Lourenco, H., Gonzalez-Lahoz, J., and Antunes, F. (2000). Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol* **61**(1), 111-6.
- Spector, D. H., Wade, E., Wright, D. A., Koval, V., Clark, C., Jaquish, D., and Spector, S. A. (1990). Human immunodeficiency virus pseudotypes with expanded cellular and species tropism. *J Virol* **64**(5), 2298-308.
- Srinivas, S. K., Srinivas, R. V., Anantharamaiah, G. M., Compans, R. W., and Segrest, J. P. (1993). Cytosolic domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoproteins binds to calmodulin and inhibits calmodulin-regulated proteins. *J Biol Chem* **268**(30), 22895-9.
- Stantchev, T. S., and Broder, C. C. (2001). Human immunodeficiency virus type-1 and chemokines: beyond competition for common cellular receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**(2-3), 219-43.
- Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**(6977), 848-53.
- Tennant, R. W., Otten, J. A., Brown, A., Yang, W. K., and Kennel, S. J. (1979). Characterization of Fv-1 host range strains of murine retroviruses by titration and p30 protein characteristics. *Virology* **99**(2), 349-57.
- Tokunaga, K., Greenberg, M. L., Morse, M. A., Cumming, R. I., Lyerly, H. K., and Cullen, B. R. (2001). Molecular basis for cell tropism of CXCR4-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* **75**(15), 6776-85.
- Towers, G., Bock, M., Martin, S., Takeuchi, Y., Stoye, J. P., and Danos, O. (2000). A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22), 12295-9.
- Towers, G., Collins, M., and Takeuchi, Y. (2002). Abrogation of Ref1 retrovirus restriction in human cells. *J Virol* **76**(5), 2548-50.
- Trkola, A., Gordon, C., Matthews, J., Maxwell, E., Ketas, T., Czaplowski, L., Proudfoot, A. E., and Moore, J. P. (1999). The CC-chemokine RANTES increases the attachment of human immunodeficiency virus type 1 to target cells via glycosaminoglycans and also activates a signal transduction pathway that enhances viral infectivity. *J Virol* **73**(8), 6370-9.
- Unutmaz, D., KewalRamani, V. N., and Littman, D. R. (1998). G protein-coupled receptors in HIV and SIV entry: new perspectives on lentivirus-host interactions and on the utility of animal models. *Semin Immunol* **10**(3), 225-36.

- Viard, M., Parolini, I., Sargiacomo, M., Fecchi, K., Ramoni, C., Ablan, S., Ruscetti, F. W., Wang, J. M., and Blumenthal, R. (2002). Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J Virol* **76**(22), 11584-95.
- Wei, X., Decker, J. M., Liu, H., Zhang, Z., Arani, R. B., Kilby, J. M., Saag, M. S., Wu, X., Shaw, G. M., and Kappes, J. C. (2002). Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(6), 1896-905
- Weissenhorn, W., Calder, L. J., Dessen, A., Laue, T., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1997a). Assembly of a rod-shaped chimera of a trimeric GCN4 zipper and the HIV-1 gp41 ectodomain expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12), 6065-9.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1997b). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**(6631), 426-30.
- Weissman, D., Rabin, R. L., Arthos, J., Rubbert, A., Dybul, M., Swofford, R., Venkatesan, S., Farber, J. M., and Fauci, A. S. (1997). Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Nature* **389**(6654), 981-5.
- Whittle, H., Morris, J., Todd, J., Corrah, T., Sabally, S., Bangali, J., Ngom, P. T., Rolfe, M., and Wilkins, A. (1994). HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients. *Aids* **8**(11), 1617-20.
- Whittle, H. C., Ariyoshi, K., and Rowland-Jones, S. (1998). HIV-2 and T cell recognition. *Curr Opin Immunol* **10**(4), 382-7.
- Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A., and Sodroski, J. G. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**(6686), 705-11.
- Wyss, S., Berlioz-Torrent, C., Boge, M., Blot, G., Honing, S., Benarous, R., and Thali, M. (2001). The highly conserved C-terminal dileucine motif in the cytosolic domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is critical for its association with the AP-1 clathrin adaptor [correction of adaptor]. *J Virol* **75**(6), 2982-92.
- Yang, Z. N., Mueser, T. C., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., and Hyde, C. C. (1999). The crystal structure of the SIV gp41 ectodomain at 1.47 Å resolution. *J Struct Biol* **126**(2), 131-44.
- Young, J.A.T., Bates, P., Willert, K., Varmus, H.E. (1990). Efficient incorporation of human CD4 protein into avian leukosis virus particles. *Science* **250**: 1421-1423.
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R. J., Zhang, C., Arunachalam, S. C., and Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**(6944), 94-8.
- Zingler, K., and Littman, D. R. (1993). Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein increases env incorporation into particles and fusogenicity and infectivity. *J Virol* **67**(5), 2824-31.

## 7. Publikationen

Schmitz, C., Marchant, D., Neil, S. J., Aubin, K., Reuter, S., Dittmar, M. T., and McKnight, A. (2004). Lv2, a novel postentry restriction, is mediated by both capsid and envelope. *J Virol* **78**(4), 2006-16.

Schmitz C., Reuter S., Aubin K., Griffiths D.J., Dittmar M.T., McKnight À. Viral gene(s) involved in an early post-entry replication step of HIV. Vortrag zur ECEAR (European Conference on Experimental AIDS Research) 2002, Genua

Reuter S., Römer D., Aubin K., Schmitz C., McKnight À, Dittmar M.T. Envelope-dependent pre-integration block in HIV-2 replication. Vortrag zum *Retroviruses-Meeting*, 2003, Cold Spring Harbour, NY

Reuter S., Sirma H., Schaller H., Urban S. Posttranslational modifications of the duck Hepatitis B Virus receptor. Posterbeitrag zur Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2001, Dresden

Reuter S., Daecke J., Griffiths D.J., McKnight À., Kräusslich H.-G., Dittmar M.T. Characterisation of a pre-integration block in HIV-2 replication. Posterbeitrag zur Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2002, Erlangen

Reuter S., Römer D., Aubin K., Schmitz C., McKnight À, Dittmar M.T. Envelope-dependent release of an post-entry block in HIV-2 replication. Posterbeitrag zur Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2003, Berlin

Reuter S., Römer D., Aubin K., Schmitz C., McKnight À, Dittmar M.T. Envelope-dependent pre-integration block in HIV-2 replication. Posterbeitrag zum Keystone Symposium 2003, Alberta