



Generierung von löslichen rekombinanten Multimeren zur Hemmung des HIV-1 Entry

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich 15 Biowissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main (D30)

Von

Alexandra Hüther

aus Zweibrücken

Frankfurt am Main, März 2008

Vom Fachbereich Biowissenschaften (15) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. V. Müller

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Zweitgutachter: Prof. Dr. D. von Laer

Datum der Disputation: 23. Oktober 2008

Danksagungen

In erster Linie möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sehr herzlich danken.

Bei Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz möchte ich mich für die schnelle und unkomplizierte Bereitschaft bedanken, diese Arbeit zu betreuen.

Frau Dr. Ursula Dietrich danke ich dafür, dass sie mir ermöglicht hat, in ihrer Arbeitsgruppe dieses spannende und abwechslungsreiche Thema durchzuführen, ihre Unterstützung, Geduld sowie die zahlreichen Diskussionen und Ratschläge während dieser Zeit.

Auch Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer gilt mein besonderer Dank. Ihre sehr hilfreichen technischen Vorschläge und die Diskussionsbereitschaft während der Cobetreuung zusammen mit Herrn Prof. Dr. Winfried Wels haben mir viele sehr hilfreiche Anregungen gegeben.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Xavier Dervillez, der mich in der ersten Zeit betreut hat und mich durch seine fachliche Kompetenz und seine interessanten Ideen stets begeistern konnte.

Herrn Dr. Volker Klaukien möchte ich für die Synthese der CCR5-Peptide und die netten Treffen zusammen mit Dr. Xavier Dervillez danken.

Der Arbeitsgruppe von-Laer, insbesondere Dr. Tsanan Heimann, Frances Brauer, Dr. Felix Hermann, Dr. Ingrid Choi, Patricia Schult-Dietrich, Tefic Merovci sowie Anna Heinzelmann aus der AG Dietrich danke ich für die stete Hilfsbereitschaft, Kooperation und die lustigen Mittagspausen. Dies gilt auch für alle anderen Mitarbeiter des Georg-Speyer-Hauses, deren Hilfe zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Die internationale und familiäre Atmosphäre des Instituts war einzigartig.

Für die molekularbiologische Unterstützung möchte ich mich bei Frau Margot Landersz und Michaela Stoll in meiner Arbeitsgruppe bedanken.

Natürlich möchte ich mich besonders bei meinen Eltern und Peter Blahak bedanken, die mich immer unterstützt und ermutigt haben, diesen Weg zu gehen.

Meinem Verlobten Tobias danke ich für seine Geduld, den Rückhalt und die Motivation während dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Generierung von löslichen, rekombinanten Multimeren zur Hemmung des HIV-1 Entry“ von mir selbständig und nur unter Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Frankfurt am Main, den

Alexandra Hüther

Zusammenfassung

Eine Reihe kurzer synthetischer Peptide, die auf verschiedenen Ebenen während des mehrstufigen Infektions-Prozesses HIV-1 hemmen konnten, wurden in unserer Gruppe über Phage-Display identifiziert. Diese Peptide hatten allerdings nur geringe Affinitäten zu gp120 und eine kurze Halbwertszeit. In der vorliegenden Arbeit wurden diese und andere HIV-1 „Entry“ hemmende Peptide über gentechnische Methoden in eukaryotischen Zellen exprimiert, um ihre Stabilität und antivirale Aktivität zu verbessern. Durch die angeknüpfte Multimerisierungsdomäne C4bp sind die therapeutischen Peptide groß genug, um von Zellen sekretiert zu werden. Die eukaryotisch sekretierten Multimere sind posttranslational modifiziert, besitzen eine höhere Stabilität und die Anzahl der funktionellen Valenzen ist erhöht. Außerdem bietet das System die Möglichkeit, auch Heteromultimere mit verschiedenen Teilstrukturen in einem Molekül zu kombinieren.

Wir konnten zeigen, dass sich das C4bp-System zur Expression des Fusions-Inhibitorischen C46-Peptids in löslicher multimerer Form eignete, welches in monomerer Form nicht vollständig durch ER und den Golgi-Apparat geleitet und sekretiert werden konnte. Außerdem hatte multimeres C46 eine deutlich höhere Plasma-Halbwertszeit und wies eine höhere antivirale Aktivität gegenüber dem monomeren Peptid auf (Dervillez et al. 2006).

In dieser Arbeit standen die hoch konservierten CD4i-Epitope von gp120, welche an die HIV Corezeptoren binden, als Target für die HIV-Inhibition im Mittelpunkt. Verschiedene Peptidliganden für diese Epitope, wie die zweite extrazelluläre Schleife und der N-Terminus des CCR5-Rezeptors, die sulfatierte CDR3-Domäne des E51-Antikörpers, sowie durch *Phage Display* gezielt selektionierte Peptide wurden in den C4bp-Expressionsvektor kloniert und nach Transfektion in 293T-Zellen als lösliche Multimere vom Überstand aufgereinigt und funktionell analysiert. Die Multimere waren sowohl in Protein-Protein-Interaktionsstudien als auch bei *in vitro* HIV-1 Neutralisationsversuchen funktionell aktiv. In den meisten Hemmversuchen war die HIV-1 Inhibition multimerer Peptide mindestens vergleichbar mit dem Fusionsinhibitor T20. Insbesondere im Hinblick auf eine *in vivo* Applikation ist zudem die verlängerte Halbwertszeit

der Multimere im Plasma von Vorteil, da dadurch möglicherweise die Anzahl der Injektionen verringert werden könnte.

Inhaltsverzeichnis

<i>Generierung von löslichen rekombinanten Multimeren zur Hemmung des HIV-1 Entry.....</i>	<i>1</i>
1 Einleitung.....	11
1.1 AIDS und sein Erreger HIV	11
1.2 Der HIV Replikationszyklus	13
1.3 Der Zelltropismus von HIV	17
1.4 Die Pathogenese von HIV-1 ohne Therapie	17
1.5 Antiretrovirale Therapiekonzepte der HIV Infektion: HAART.....	19
1.6 HIV „Entry“	20
1.7 Der Chemokinrezeptor CCR5.....	22
1.7.1 Die natürliche Funktion des Chemokinrezeptors CCR5.....	23
1.7.2 Posttranslationale Modifizierungen des CCR5 Rezeptors	24
1.7.3 Die Interaktion von gp120 mit CCR5.....	26
1.8 HIV-1 Entry Inhibitoren.....	28
1.8.1 Fusionsinhibitorische Peptide.....	29
1.8.2 Chemokine und CCR5-Corezeptor-Antagonisten	32
1.8.3 Neutralisierende Antikörper	33
1.9 Multimerisierung von Proteinen	35
1.9.1 Das C4b-System	35
1.9.2 C4bp als Multimer	37
1.9.3 C46 Multimere zur Hemmung von HIV-1.....	38

1.10	Ziel der Arbeit.....	39
2	Material.....	40
2.1.1	Chemikalien, Biochemikalien.....	40
2.1.2	Lösungen, Medien und Puffer	41
2.1.3	Antikörper	44
2.1.4	Peptide (hergestellt von Dr. Volker Klaukien, MPI Göttingen).....	45
2.1.5	HIV-1 Eintrittsinhibitor	45
2.1.6	<i>E. coli</i> Bakterienstamm.....	45
2.1.7	Plasmide (die Plasmidkarten sind im Anhang Kapitel 8.1 aufgeführt)	45
2.1.8	Enzyme und DNA Größenstandards.....	46
2.1.9	Oligonukleotide und Primer	46
2.1.10	Klonierte Plasmide	48
2.1.11	Zellkultur-Medien und Zusätze	49
2.1.12	Zelllinien.....	49
2.1.13	Laborgeräte.....	50
2.1.14	Labormaterialien, Verbrauchsmittel.....	51
2.1.15	Kits.....	53
3	Methoden.....	54
3.1	Arbeiten mit Bakterien und DNA	54
3.1.1	Analytische Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> (Minipräp)	54
3.1.2	Präparative Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Maxipräp)	54
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	54
3.1.4	Analyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	54
3.1.5	Hybridisierung synthetisch hergestellter DNA-Fragmente	55
3.1.6	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	55
3.1.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	56

3.1.8	Ligation	56
3.1.9	Sequenzierung, Verdau und Dephosphorylierung von Plasmiden	56
3.1.10	Transformation in kompetente TOP10 Zellen	57
3.1.11	<i>E. coli</i> Kryokulturen	57
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	57
3.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
3.2.2	Western-Blotting	59
3.2.3	Immundetektion durch Fluoreszenz	59
3.2.4	Immundetektion durch Chemolumineszenz	59
3.2.5	Coomassie-Gel-Färbung	60
3.2.6	Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Gel Doc System	60
3.2.7	Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-Peptiden	60
3.2.8	Ultrafiltration von His-Peptiden.....	61
3.2.9	Quantifizierung von Proteinlösungen	61
3.2.10	2D7-ELISA mit Multimeren	62
3.2.11	HIV-1 ADA gp140-ELISA mit Multimeren	62
3.2.12	Immunpräzipitation von Multimeren mit 2D7	63
3.3	Zellkultur	63
3.3.1	Kultur und Passage von adhären Zellen	64
3.3.2	Bestimmung der Zellzahl.....	64
3.3.3	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien.....	64
3.3.4	Transfektion eukaryotischer Zelllinien.....	65
3.3.5	Herstellung stabil transfizierter Zelllinien	66
3.3.6	Herstellung von Zelllysaten.....	66
3.3.7	Generierung von HIV-1 Pseudoviren mittels 3-Plasmid Transfektion	67
3.3.8	Konzentrieren von HIV-1 Pseudoviren.....	67
3.3.9	Titration retroviraler Zellkulturüberstände mittels Luziferase-Reporter-Gen-Assay	68

3.3.10	Multimer/T20 Inhibitionsassay.....	69
4	Ergebnisse.....	70
4.1	Generierung rekombinanter Multimere	70
4.1.1	Klonierung von C46-Multimeren mit unterschiedlicher Linkerlänge	71
4.1.2	Klonierung des Kontroll-Multimers Multi-c-myc	72
4.2	Expression verschiedener C46-Konstrukte in 293T Zellen	73
4.3	Auswahl der extrazellulären CCR5 Bereiche.....	76
4.3.1	Klonierung der CCR5-Konstrukte	77
4.3.2	CCR5-Multimerexpression in 293T Zellen.....	78
4.3.3	Subklonierung der CCR5-Multimer-Bulk-Kultur zur Verbesserung der Proteinexpression	80
4.3.4	Gesteigerte Proteinexpression durch Erhöhung der Puromycin-Konzentration	82
4.3.5	Optimierte Expression der CCR5-Multimere.....	83
4.3.6	Das ECL2-Multimer bindet im ELISA an den CCR5-Antikörper 2D7	86
4.3.7	Immunopräzipitation von ECL2-SDM-Multimer mit CCR5 Antikörper 2D7.....	88
4.3.8	Bindung von pE51 Multimer an trimeres gp140	89
4.4	Schrittweise Reduktion der CCR5 Multimere zu Monomeren.....	90
4.5	Aufreinigung der CCR5 Multimere über Affinitätschromatographie	93
4.5.1	Überprüfung der Eluatsfraktionen mittels Western Blot und Coomassie Gel.....	93
4.6	Quantifizierung der CCR5-Multimere mittels Western Blot	95
4.7	Funktionelle Tests zur Messung der antiviralen Aktivität der Multimere .	97
4.7.1	Hemmung des Eintritts von R5-tropen HIV-1 JRFL Pseudoviren.....	99
4.7.2	Hemmung des Eintritts von R5-tropen HIV-1 Ba-L_wt Pseudoviren.....	101
4.7.3	Hemmung des Eintritts R5-troper HIV-1 117.III Pseudoviren.....	103

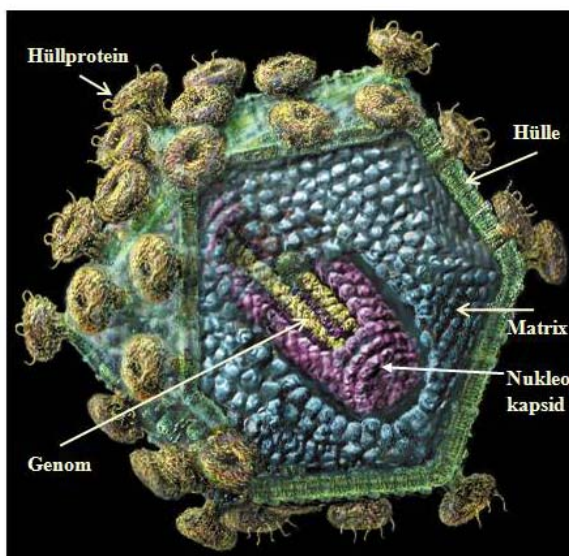
4.7.4	Hemmung des Eintritts von X4-tropen HIV-1 HXB2-Pseudoviren	105
4.7.5	Hemmung des Eintritts von dual-tropen HIV-1 89.6 Pseudoviren	106
4.7.6	Hemmung des Eintritts von LCMV Pseudoviren	108
5	<i>Diskussion</i>	110
5.1.1	Therapeutische Peptide	110
5.1.2	HAART und Entry-Inhibitorische Peptide.....	111
5.1.3	Intervention des HIV-1 Entry durch multimere CCR5-Peptide	113
5.1.4	Posttranslationale Modifizierungen der CCR5 Multimere	115
5.1.5	Funktionelle Charakterisierung der CD4i-bindenden Multimere	116
5.1.6	HIV-1 Pseudoviren werden von CCR5-Multimeren im Nanomolaren Bereich gehemmt.....	120
5.1.7	An CD4i-Epitop-bindende Multimere zeigten gute HIV-1-neutralisierende Eigenschaften	122
5.1.8	Hat die Größe der C4bp-Multimere einen Vorteil gegenüber kurzen Peptiden? .	123
5.1.9	Veränderung der pharmakokinetischen Eigenschaften durch Multimerisierung?	124
5.1.10	Vergleich von Multimeren in der Proteintherapie und C46 in der Gentherapie ...	125
6	<i>Literatur</i>	128
7	<i>Anhang</i>	147
7.1	Plasmidkarten	147
7.2	Abkürzungsverzeichnis	152
7.3	Wissenschaftliche Publikationen und Posterpräsentationen	156
7.3.1	Publikationen	156
7.3.2	Posterpräsentationen.....	156
7.4	Lebenslauf	158

1 Einleitung

1.1 AIDS und sein Erreger HIV

Die Geschichte von AIDS, dem „*acquired immunodeficiency syndrome*“, begann Anfang der 70er Jahre. Die ersten Fälle von AIDS wurden 1981 in Florida, New York und Kalifornien beschrieben, wobei zu diesem Zeitpunkt der Begriff AIDS noch nicht verwendet wurde, um das unerklärliche Immundefizienz-Syndrom zu beschreiben. Die Immunantwort jener Patienten verschlechterte sich zusehends, so daß sich verschiedene Pathogene, welche unter normalen Umständen nicht infektiös sind, vermehren konnten und damit schwere opportunistische Infektionen und Krankheiten hervorriefen. Die meisten dieser Infektionen waren Lungenentzündungen, ausgelöst durch *Pneumocystis carinii*, Ösophagiale Candidiasis, Toxoplasmose im Gehirn, Kaposi Sarcoma und das Non-Hodgkin's Lymphom (Gottlieb et al. 1981). 1983 wurden zeitgleich 2 verschiedene Viren in der Arbeitsgruppe um Roberto Gallo in den Vereinigten Staaten (Gallo et al. 1984) und in Luc Montagniers Gruppe in Frankreich (Barre-Sinoussi et al. 1983) als Ursache für die mysteriöse Erkrankung entdeckt: HTLV-III (Humanes T-Lymphotropisches Virus) und LAV (Leukämie-assoziiertes Virus).

1.1 Das HI-1 Virus. Die äußere Hülle umfasst die Hüllproteine, worin die Matrix enthalten ist, darin eingebettet das Kapsid mit der viralen RNA. (abgewandelt aus Kightley /www.virology.net/Big_Virology/BVretro.html)



Diese beiden Viren wurden später als ein und dasselbe Virus identifiziert und 1986 von der Internationalen Kommission für Virus-Taxonomie, als humanes Immunodefizienz Virus bezeichnet (Coffin 1986).

Das HI-Virus hat einen Durchmesser von ca. 100 nm und gehört zu den Lentiviren

(lat. *lentus* = langsam), deren namengebendes Charakteristikum eine lange Latenzzeit vor dem Auftreten erster Krankheitssymptome ist. Die Lentiviren gehören zur Familie der Retroviren und können im Gegensatz zu anderen Retroviren auch ruhende Zellen befallen. Die Gemeinsamkeit der Retroviren besteht im einzelsträngigen (+)-RNA Genom und der Fähigkeit der reversen Transkription, d.h. die Umschreibung von RNA in DNA. Außerdem ist die retrovirale RNA im Kapsid enthalten, welches von einer Lipidhülle umgeben ist. Diese entstammt als Bi-Layer-Membran ursprünglich von der Wirtszelle (Abb. 1.1). Das Erbgut der Retroviren wird bei der Infektion in DNA übersetzt und fest in das Wirtsgenom integriert.

Aufgrund unterschiedlicher phylogenetischer und biologischer Eigenschaften wird HIV in zwei Typen, HIV-1 und HIV-2, unterteilt, wobei der Unterschied auf Nukleotid-Ebene zwischen 40-60% liegt (Hu 1996). Obwohl beide Virustypen eine ähnliche Struktur besitzen und im Menschen Immundefizienzen auslösen, ist HIV-1 weltweit vorherrschend (Markovitz 1993; Coffin 1995) (Ho 1995). Weltweit sind etwa nur 1% aller HIV-Infektionen auf HIV-2 zurückzuführen, diese sind vorwiegend auf Westafrika beschränkt (Kanki et al. 1987) (De Cock et al. 1993) und sind weit weniger pathogen als HIV-1 (Sousa et al. 2002). Mittlerweile wird angenommen, daß der Ursprung von HIV-1 in Zentralafrika liegt (Korber et al. 2001). Dort bestand schon seit langer Zeit eine Endemie unter Schimpansen (*Pan troglodytes*), die mit SIV_{scz} (*simian immunodeficiency virus, chimpanzee*) infiziert waren, das eine starke Ähnlichkeit zu HIV-1 hat. Andererseits ähnelt HIV-2 eher dem SIV_{sm} (*engl. Sooty Mangabey*) der Rauchgrauen Mangabe (*Cercocebus atys*), welche deshalb als natürlicher Wirt von HIV-2 angesehen wird (Hirsch et al. 1989; Silvestri 2005).

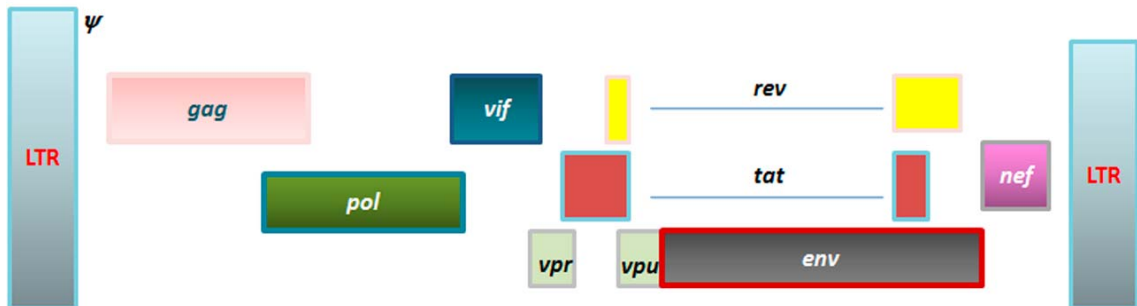
Das Bejagen und der Verzehr von Schimpansen durch den Menschen führte wahrscheinlich zu einem Wirtswechsel des Virus´ und wird auch als Zoonose bezeichnet (Deng et al. 1999) (Sharp et al. 1999; Hahn et al. 2000). Relativ zeitgleich (um 1940) verlief in Westafrika das gleiche Szenario mit Mangaben-Affen (*Cercocebus spec.*), wodurch die Pandemie mit HIV-2 resultierte (Lemey et al. 2003). Die HIV-1 Stämme wurden in 3 Gruppen eingeteilt: M (*majority*), O (*outliers*) und N (*non-M/non-O*). Die M-Gruppe hat 10 verschiedene Subtypen, die als A bis J bezeichnet werden. Der Subtyp B ist der am häufigsten vorkommende in den vereinigten

Staaten und Westeuropa. Die Subtypen A, C, D und E sind vor allem in den Entwicklungsländern stark vertreten. Seit seiner Entdeckung wurden etwa 64,9 Millionen Infektionen mit HIV-1 verzeichnet, mit weltweit etwa 32 Millionen Todesfällen (www.usaid.gov/our_work/global_health/aids/News/aidsfaq.html). Zudem breitet sich HIV immer schneller aus, was sich in der alarmierend hohen Anzahl Neuinfizierter widerspiegelt. Ende 2007 waren etwa 33,2 Millionen HIV Infizierte weltweit verzeichnet, wobei dieses Jahr etwa 7 Millionen Neuinfizierte hinzukommen werden. Alleine in Afrika, wo global betrachtet etwa 10% der Weltbevölkerung leben, sind ca. 60% der Menschen mit dem Virus infiziert (UNAIDS, AIDS Epidemic Update, Genf 2005). In der Subsahara-Region von Afrika ist AIDS zur Haupttodesursache avanciert, global betrachtet ist die AIDS Pandemie die viert-häufigste Todesursache.

1.2 Der HIV Replikationszyklus

Da HIV zu den „langsamen“ Lentiviren gehört, kann die klinische Latenzphase mehr als 20 Jahre betragen. Während dieser Zeit hat das Virus jedoch weitreichende Effekte auf das immunologische und neurologische System. Die Lentiviren, zu denen neben HIV auch das nahe verwandte simiane Immunodefizienz-Virus SIV gehört, sind bekannt für ihre zytolytischen und immunsuppressiven Eigenschaften. Replikationskompetente HI-Viren zeichnen sich durch die 3 Gene *gag* („group antigen“), *env* („envelope“) und *pol* („polymerase“) aus, wobei die Gene *gag* und *env* für das Nukleokapsid und die viralen Hüllproteine kodieren (Henderson 1992) und *pol* für die Reverse Transkriptase, Protease und Integrase (Reil et al. 1993). Für die regulatorischen Proteine stehen weitere 6 Gene zur Verfügung: *vpu* (*viral protein U*), *vpr* (*viral protein R*), *tat* (*transactivator of transcription*), *rev* (*regulator of expression*), *nef* (*negative factor*) und *vif* (*virion infectivity factor*), wobei *vpu*, *vpr*, *nef* und *vif* als akzessorische Gene bezeichnet werden (Wong-Staal 1991). Das provirale Genom wird von zwei LTRs (*long terminal repeats*), flankiert: 5'-LTR-*gag-pol-env*-LTR-3' (Abb. 1.3), die bei der Integration kovalent mit der chromosomalen DNA verknüpft werden. Dadurch wird eine Vielzahl von Proteinen auf einem relativ kleinen Genom (9,7 kb) kodiert. Die Oberflächenproteine von HIV bestehen aus den beiden

Hüllproteinen gp120 und gp41, welche aus der enzymatischen Spaltung eines größeren Vorläuferproteins, gp160, entstehen und den viralen Eintritt in die Zielzellen ermöglichen.



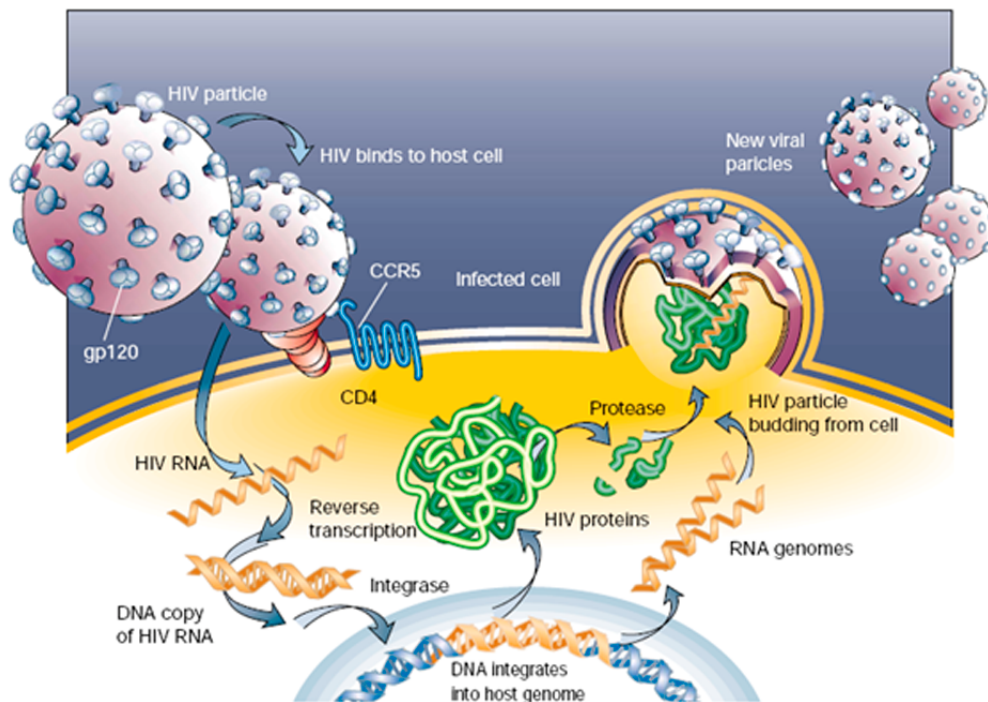
1.2 Das Genom von HIV-1. Das Verpackungssignal ψ und die Strukturgene *gag*, *pol*, *env* werden von den LTRs flankiert. Die 6 zusätzlichen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, und *nef* tragen zur genetischen Komplexität des HI-Virus bei.

Der HIV-Kern besteht aus weiteren strukturellen Proteinen: p24, p17, p7 und p6. P24 formt das kegelförmige virale Kapsid, das die beiden RNA Stränge und die viralen Enzyme beinhaltet. Das Matrixprotein p17 ist mit der Virushülle verbunden, während P7, das Nukleokapsidprotein (NC), nicht-kovalent an die virale RNA assoziiert ist. Die Proteine Tat, Rev, Nef, Vif, Vpu und Vpr üben regulatorische Funktionen aus. Tat und Rev regulieren die virale Gentranskription und sind für die HIV Replikation essentiell (Huang et al. 1994) (Gallo 1999). Vif erhöht die Effizienz der Infektion *in vitro*. Vpu beeinflusst den Knospungs-Prozess und Vpr den nukleären Transport des viralen Genoms, wobei das virale Protein p6 die Inkorporation von Vpr in das Partikel ermöglicht. Nef hat sehr viele Funktionen, es beeinflusst unter anderem das Fortschreiten der Erkrankung, verstärkt die Virus-Infektiosität, reguliert die Expression der Zelloberflächen CD4- und MHC Klasse I Moleküle und moduliert die Signaltransduktion in CD4⁺-Zellen.

Direkt nach dem Eintritt des Virus in die Zielzelle wird das virale Kapsid mit dem darin enthaltenen viralen RNA Genom und den viralen Proteinen ins Cytoplasma entlassen (Abb. 1.3). Dort wird die virale RNA in komplementäre cDNA von der viralen reversen Transkriptase umgeschrieben. Dies findet mit Hilfe eines zellulären Lysin-t-RNA Moleküls als Primer statt (Gen et al. 2001). Die Reverse Transkriptase degradiert durch ihre RNase Aktivität die virale RNA Matrize. Alle 1500 bis 4000 Basen fügt die Reverse Transkriptase ein fehlerhaftes Nukleotid ein, was durch die fehlende Korrekturlesefähigkeit die hohe Mutationsrate des HI-

Virus erklärt. Die neu-synthetisierte HIV cDNA wird zusammen mit den akzessorischen Proteinen Vpr und Vif sowie dem Matrixprotein p17 in Form eines Präintegrationskomplexes (PIK) in den Nukleus transportiert. Es wird angenommen, daß Vpr vor allem in nicht-mitotischen Zellen den Transport des HIV-1 PIK in den Nukleus verstärkt (Zhang et al. 2001), während Vif mit Elementen des Zytoskeletts interagiert und das Infektionspotential erhöht (Miller and Sarver 1997).

Die nukleären Lokalisationssignale (NLS) im Vpr- und im Matrix-Protein p17 des HIV-PIK (Gallay et al. 1996) sind essentiell für die Infektion von ruhenden Zellen (Naldini et al. 1996). Dies ist zudem der entscheidende Unterschied zwischen Lenti- und Retroviren, welche ausschließlich sich teilende Zellen infizieren. Die zufällige Integration der viralen cDNA in das Wirtszell-Genom wird von der viralen Integrase katalysiert (Panganiban and Temin 1984; Bushman et al. 1990).



1.3 Der HIV-1 Replikationszyklus. Nach Kopplung an die Rezeptoren CD4 und CCR5 fusioniert das Virus mit der Zielzelle, das Kapsid mit dem darin enthaltenen Genom und den viralen Proteinen wird aufgelöst. Dort wird das virale RNA Genom von der reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA transkribiert und als Präintegrationskomplex (PIK) in den Zellkern eingeschleust. Das Provirus wird mit der viralen Integrase in das Wirtsgenom integriert, transkribiert und translatiert, die viralen Proteine werden durch Proteinasen geschnitten und formen sich zu einem neuen Virus mit RNA, reverser Transkriptase und Hülle, aus (Weiss 2001).

Nach der Integration aktivieren zelluläre Transkriptionsfaktoren die virale Gentranskription, um niedrige Raten kurzer, vielfach gespleißter mRNA Transkripte zu produzieren. Diese kodieren für die Proteine Tat, Rev und Nef (Muesing et al. 1985). Tat transaktiviert dabei die Transkription durch Bindung an eine RNA-Struktur (TAR) am 5' Ende der viralen RNA Sequenz, um die virale Transkription 1000-fach zu erhöhen (Parada and Roeder 1996). Die Komponenten des viralen Kerns werden dann translatiert in p55, einem Vorläuferprotein, welches dann bei der Reifung gespalten wird.

Gag-Pol ist ein weiteres Vorläuferprotein das durch eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters entsteht und neben Gag die viralen Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase bildet. Die HIV Protease vermittelt die Spaltung der Gag-Pol Vorläuferproteine (Wan et al. 1996). Der Vorläufer der Hüllproteine, gp160, wird im endoplasmatischen Retikulum mehrfach glykosyliert und trimerisiert. Eine zelluläre Furinprotease übernimmt die Spaltung von gp160 im Golgi-Apparat. Danach (Samson et al. 1996) werden die gp120 SU (*surface*) und gp41 TM (*transmembrane*) zur Zellmembran transportiert, wo es zum "self-assembly" kommt (McCune et al. 1988). Mit Hilfe von spezifischen ψ -Sequenzen, die als Verpackungssignale fungieren, wird die virale RNA dann zusammen mit den Pol-Proteinen mit Enzymfunktion und den Gag-Strukturproteinen an der Plasmamembran verpackt. Erst ausserhalb der Wirtszelle werden dann die Gag- und Gag-Pol-Polyproteine endgültig mit Hilfe der viralen Protease in ihre Bestandteile gespalten, wodurch reife Viruspartikel entstehen und durch Knospung („*budding*“) freigesetzt werden (Faure et al. 2005). Durch die hochgradige Glykosylierung und die Integration zellulärer Proteine in die Virusmembran (Arthur et al. 1992; Franke et al. 1994), entgeht das Virus der Erkennung und Zerstörung des wirtseigenen Komplementsystems (Kinoshita et al. 1991). Da sich die Glycoproteine auf den Oberflächen infizierter Zellen befinden, kann sich auch hier ihre fusogene Wirkung entfalten, indem sie an die CD4-Rezeptoren nicht infizierter Zellen binden und die Verschmelzung der Membranen induzieren. Auf diese Weise kann sich das Virus auch direkt von Zelle zu Zelle im Organismus verbreiten.

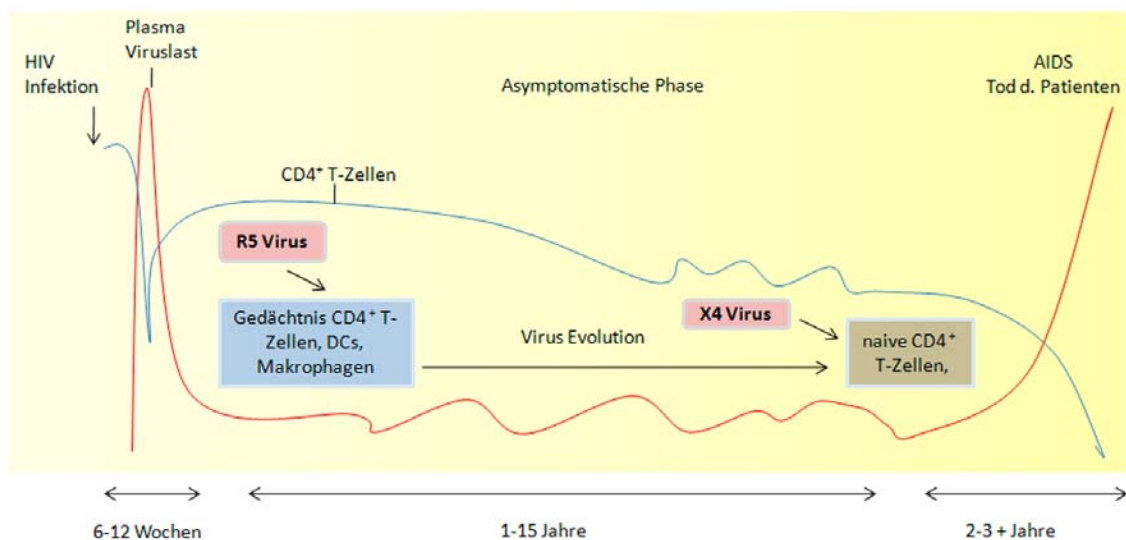
1.3 Der Zelltropismus von HIV

Innerhalb kurzer Zeit haben verschiedene Gruppen zuerst CXCR4 (Feng et al. 1996) (Berson et al. 1996) und daraufhin CCR5 als die Schlüssel-Corezeptoren für den HIV Eintritt identifiziert (Alkhatib et al. 1996; Choe et al. 1996; Deng et al. 1996). Alle HIV Isolate, die bisher untersucht wurden, nutzen die beiden Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 als Corezeptoren. Die Nutzung anderer Corezeptoren wie CCR2 und CCR3 wurde ebenfalls berichtet, aber meist nur aus *in vitro* Studien (Berger et al. 1999). Viren, die CCR5 als Corezeptor nutzen, werden als R5-trop bezeichnet (Berger 1998). Hauptsächlich R5-trope Viren sind für die Virus-Transmission zwischen den Individuen verantwortlich. Im späteren Krankheitsverlauf, einige Jahre nach der Infektion, dominieren Viren, welche T-Zellen überwiegend über den CXCR4-Rezeptor (T-trope Viren) und damit eine viel höhere Anzahl CD4⁺-Zellen infizieren. Dieser Shift ist zudem mit einer Beschleunigung der Krankheit verbunden, T-trope Viren sind meist mit einem aggressiveren Verlauf der HIV-Infektion verknüpft. Auch unter der voll suppressiven Hochaktiven Antiretroviralen Therapie (HAART) kann es zu einem *Shift* des Virustropismus kommen (Koot et al. 1993; Connor and Ho 1994). Entscheidend für den Zelltropismus von HIV-1 ist vor allem die Aminosäuresequenz der variablen Schleife V3 (V3-loop) aber auch V1-V2 des Oberflächenproteins gp120 (Shioda et al. 1991; Pastore et al. 2006; Kiselyeva et al. 2007). Die V3-Schleife besteht aus 35-37 Aminosäuren, deren Form von einer Disulfidbrücke gebildet wird. Neben CCR5- und CXCR4-tropen Viren gibt es allerdings auch solche, welche beide Rezeptoren nutzen können und somit als dual-trope Viren (R5X4-trop) bezeichnet werden (Doranz et al. 1996).

1.4 Die Pathogenese von HIV-1 ohne Therapie

HIV wird durch infizierte Körpersekrete wie Sperma, Vaginalsekret, Blut und Muttermilch übertragen. Ob eine Infektion zustande kommt, ist abhängig von der Menge der übertragenen HIV-infizierten Flüssigkeit, der Konzentration des Virus, sowie der Art der Eintrittspforte und die Kontaktzeit. Die Infektion wird durch Zell-Zell-Kontakt HIV-infizierter und gesunder Zellen (T-Helferzellen, Monocyten/Makrophagen, Dendritische Zellen, Mikrogliazellen, Langerhans-Zellen) oder durch zellfreies Virus vermittelt.

Nach erfolgter Ansteckung mit dem Virus und einer Inkubationszeit von einer bis drei Wochen kann bei einigen Patienten eine akute grippeähnliche Erkrankung auftreten. Die beiden wichtigsten Laborparameter zur regelmäßigen Kontrolle von HIV-Patienten sind die Viruslast (Anzahl der HIV-1-RNA-Kopien pro Milliliter Plasma) und die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen. Während der ersten zwei bis sechs Monate nach der HIV-1 Infektion steigt die Viruslast vorübergehend stark an, während die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen auf unter 500 Zellen pro Mikroliter reziprok absinkt und es zu Grippeähnlichen Symptomen kommt (Abb. 1.4). Diese Phase wird auch als Serokonversion bezeichnet. Im Anschluss daran beginnt das asymptomatische Latenzstadium der Infektion, welches über mehrere Jahre andauern kann. Die ersten 3-6 Monate der Latenzzeit sind gekennzeichnet durch einen starken Abfall der Viruskonzentration, die sich auf ein individuell unterschiedliches Niveau einpendelt (*set-point*), das über Monate anhält. Obwohl eine ständige Interaktion zwischen Infektion, Produktion von Viren und deren Bekämpfung durch das Immunsystem stattfindet, lassen sich keine äußeren Anzeichen erkennen. In der symptomatischen Phase treten sogenannte opportunistische Infektionen auf, was mit der Unterschreitung der Anzahl von unter 200 CD4⁺-T-Zellen pro Mikroliter einhergeht. Diese AIDS-definierenden Erkrankungen führen nach individuell unterschiedlicher Zeit zum Tod.



1.4 Plasma HIV-RNA und CD4⁺ T-Zellen im Verlauf einer HIV-Infektion. Das Diagramm veranschaulicht den Zusammenhang zwischen der Viruslast (rote Linie) und der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen (blaue Linie) bei einer typischen nichtbehandelten HIV-1 Infektion (abgeändert nach Rowland-Jones 2003).

1.5 Antiretrovirale Therapiekonzepte der HIV Infektion: HAART

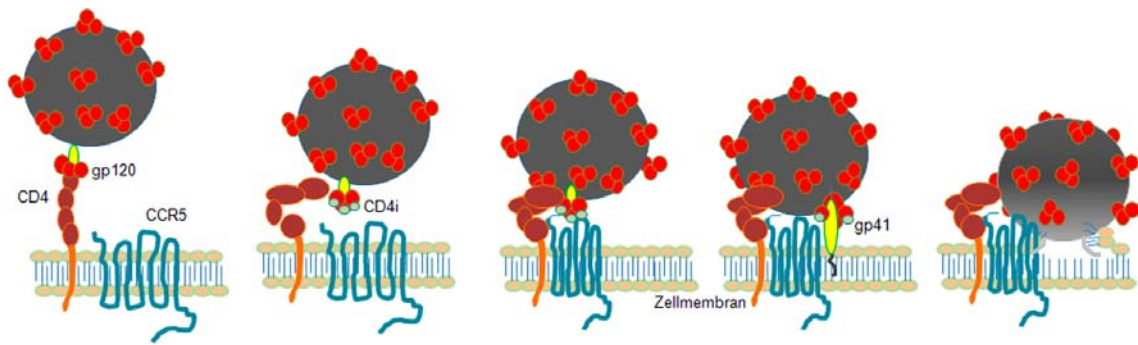
In absehbarer Zeit wird keine Impfung gegen HIV zur Verfügung stehen. Deshalb wird die medikamentöse Therapie weiterhin im Fokus der Behandlung stehen. Die Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) 1995 hat bisher bei HIV-infizierten Individuen zu einem deutlichen Rückgang der Morbidität wie auch der Mortalität geführt. Das Ziel der HAART ist es, eine möglichst vollständige Hemmung der Virusreplikation d.h., eine Senkung der Viruslast unter der Nachweisgrenze von etwa 20 HIV-Genomkopien pro Milliliter Blut (Pereira and Paridaen 2004) zu bewirken.

Der erste FDA (American Food and Drug Administration) geprüfte Wirkstoff zur anti-HIV-Therapie war Zidovudine (AZT= Azidothymidine), das 1987 zugelassen wurde. Dieser sogenannte Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitor (NRTI) greift in die HIV Replikation ein, indem er die Reverse Transkriptase kompetitiv hemmt, was wiederum zum Kettenabbruch der proviralen HIV-1 DNA führt. Die Behandlung der Patienten mit ausschließlich diesem Wirkstoff führte jedoch schon innerhalb von 2 Jahren zu medikamentenresistenten HIV-Stämmen (MRC/ANRS Lancet 1994). Bei HAART werden in der Regel mindestens 3 Medikamente kombiniert, die mindestens 2 verschiedenen Wirkstoffklassen angehören, um die Viruslast nachhaltig zu unterdrücken und die Resistenzen zu minimieren. Die Kombinations-Therapie umfasst aktuell 4 verschiedene Wirkstoffklassen: nukleosidische und nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase Inhibitoren (NRTIs und NNRTIs), Protease-Inhibitoren und als relativ neue Wirkstoffklasse seit 2003 Fusionsinhibitoren wie T20 (Fuzeon, Enfuvirtide) (Rockstroh and Mauss 2004). Am weitesten fortgeschritten in der klinischen Entwicklung sind die CCR5-Hemmer Maraviroc (MVR, Handelsname Celsentry™/Pfizer), Vicriviroc und Aplaviroc, welche zu den CCR5-Antagonisten gehören. Im letzten Jahr wurden auch Hemmer der Integrase zugelassen. Die NRTIs greifen in die Replikation des HIV-1 ein, indem sie Nukleosidanaloga in neu-synthetisierte DNA-Stränge einbauen, was dann zur Termination der proviralen HIV-1 DNA-Ketten-Synthese führt (Imamichi 2004; Pereira et al. 2004). Protease-Inhibitoren hemmen die Virusassoziierte Protease. Inzwischen sind mehr als 20 lizenzierte

Antiretrovirale Medikamente erhältlich, welche eine hohe Anzahl an Möglichkeiten der Kombinationstherapie erlauben und somit die Resistenzen minimieren. Die antiretroviralen Medikamente haben jedoch immer noch hohe Nebenwirkungen und können zur Langzeittoxizität führen (Mocroft et al. 2001). Ein vielversprechender therapeutischer und prophylaktischer Ansatz zur Entwicklung neuer Medikamente gegen HIV-1 wäre, die inzwischen gut untersuchten Schritte des viralen Zelleintritts zu beeinflussen. Somit könnte die Anheftung des Virions an die Wirtszelloberfläche unterbunden werden, wodurch eine Infektion der Zelle nicht zustande käme.

1.6 HIV „Entry“

Die Oberfläche des HI-Virus ist übersät mit ungefähr 17-73 sogenannter Spikes, den Hüllprotein-Komplexen (Zhu et al. 2003). Diese Spikes sind aus den beiden Glykoproteinen gp120 und gp41 zusammengesetzt, wobei jeweils 3 gp120 Glykoproteine mit 3 gp41 Glykoproteinen nicht-kovalent verbunden sind und ein Heterotrimer bilden. Das Hüllprotein Env von HIV-1 gehört zu den Klasse I Fusionsproteinen. Diese sind dadurch definiert, daß sie durch die Bindung eines Rezeptors oder durch pH-Aktivierung ein hydrophobes Fusionspeptid generieren, das in senkrechter Orientierung zur Virusmembran sitzt und außerdem ein stabiles 6-Helix-Bündel bilden, das zur Fusion beiträgt. Zum Eintritt in die Zielzellen benötigt HIV zum einen den Primärrezeptor CD4, welcher auf einer Unterklasse von T_H-Zellen und Zellen aus der Monozyten/Makrophagen-Linie exprimiert wird (Dalglish et al. 1984; Klatzmann et al. 1984) und zum anderen den Corezeptor, CCR5 oder CXCR4. Der Zelleintritt von HIV beginnt mit der hochaffinen Bindung des externen Hüllproteins gp120 an den CD4-Rezeptor auf T_H-Zellen (Abb. 1.5, erster Schritt), welche hoch-spezifisch ist und an relativ kleinen Kontaktflächen der beiden Proteine stattfindet. Im Bereich zwischen der inneren und äußeren Domäne der diskontinuierliche Region von gp120 findet die Bindung an die erste Untereinheit von CD4, die CD4-bindende Domäne, statt (*CD4-binding site*) (Wyatt et al. 1998; Eckert and Kim 2001). Diese Bindung induziert eine Konformationsänderung in gp120, wodurch ein zuvor noch verstecktes, hoch konserviertes Epitop, zum Vorschein kommt (Thali et al. 1993; Trkola et al. 1996; Wu et al. 1996).



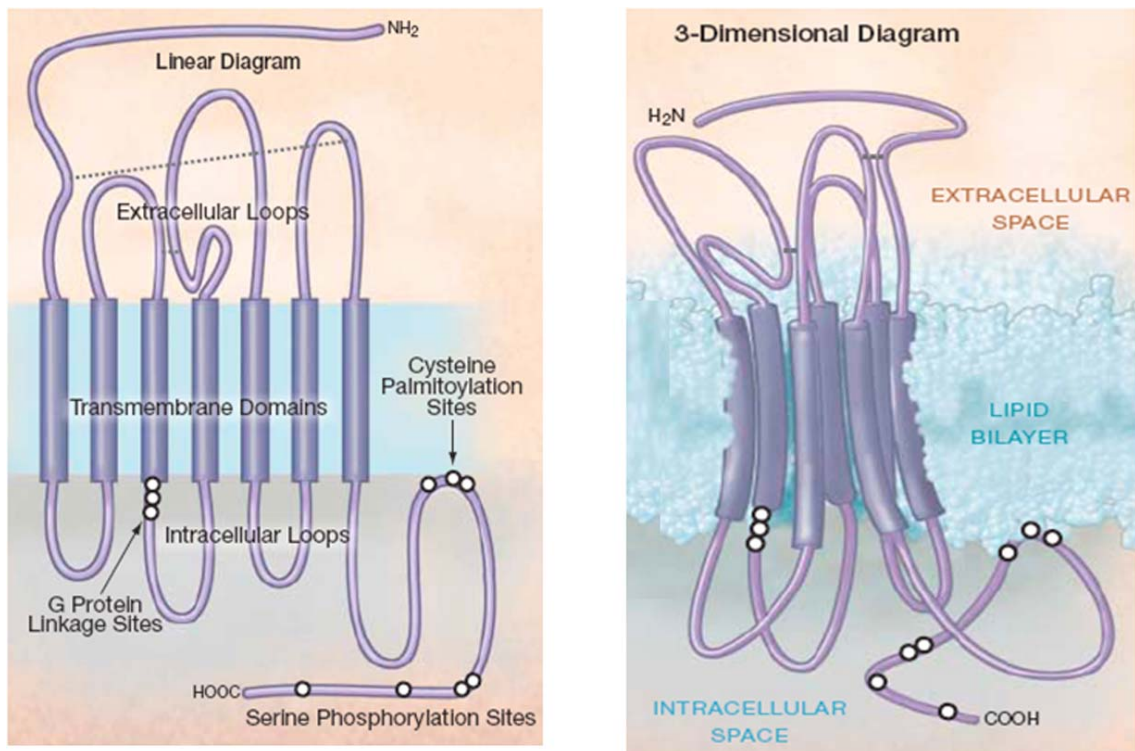
1.5 Der Zelleintritt von HIV-1. Nach der Bindung von gp120 an CD4 werden CD4-induzierte Epitope frei die an den Corezeptor CCR5 binden können. Eine weitere Konformationsänderung in gp120 bringt gp41 zum Vorschein, welches durch Insertion des Fusionspeptids in die Zellmembran die Verschmelzung der beiden Membranen einleitet.

Die Bindung an CD4 alleine genügt nicht, um eine Zelle zu infizieren, löst jedoch eine Konformationsänderung in gp120 aus, welche dann wiederum die Interaktion mit dem Corezeptor ermöglicht (Feng et al. 1996). Diese CD4-induzierbaren Epitope (CD4i) erlauben dann die Bindung an CCR5 bzw. CXCR4 (Abb. 1.5, Bild 2) (Dalglish et al. 1984; Sattentau and Moore 1991; Feng et al. 1996; Trkola et al. 1996; Wu et al. 1996). Mit dieser Art von Kontrolle, daß die gp120-CCR5-Bindung erst nach der Interaktion von gp120 mit CD4 stattfinden kann, werden die hoch-konservierten Epitope im Hüllprotein geschützt und entgehen somit der ständigen Überwachung des Immunsystems (Wyatt and Sodroski 1998; Haynes and Montefiori 2006; Pantophlet and Burton 2006). Nach der Bindung an den Corezeptor kommt es zu einer Destabilisierung des gp120-CD4-Komplexes, was zusätzlich eine Konformationsänderung in der hydrophoben transmembranären Fusionsdomäne in gp41 verursacht (Abb. 1.3, Bild 3). Zwischen Fusionspeptid und Transmembran-Domäne befinden sich nun die beiden helikalen Wiederholungsdomänen HR1 und HR2 (N- und C-Helix) und bilden einen Übergangszustand aus, die *Prehairpin*-Intermediärstruktur (siehe Abbildung 1.8). Im darauffolgenden Schritt entsteht das fusionsaktive *Hairpin*-Trimer, indem sich HR1 und HR2 aneinanderlagern und ein Bündel aus 6 Helices bilden, die sogenannte „*Coiled-Coil*“-Struktur, die im letzten Schritt des Entry-Prozesses benötigt wird (Chan et al. 1997; Lu et al. 1997; Tan et al. 1997; Caffrey et al. 1998). Dieses 6-Helix-Bündel bringt sowohl die Membran der Zielzelle als auch die Virus-Membran so nahe zusammen, daß sich eine Fusionspore bildet (Doms and Moore 2000; Kwong et al. 2000). Die während der Formation des 6-Helix-Bündels freiwerdende Energie wird gleichzeitig für die thermodynamisch ungünstige Membranfusion genutzt (Melikyan et al. 2000).

Insgesamt sind an der Bildung der Fusionspore wahrscheinlich vier bis sechs CCR5- bzw. CXCR4-Rezeptoren (Kuhmann et al. 2000), einige CD4-Moleküle (Layne et al. 1990) und bis zu sechs gp120/gp41 Trimere beteiligt. Anschliessend gelangen die Virusproteine zusammen mit dem Kapsid, welches die virale RNA enthält, in das Innere der Zielzelle und die Replikation des Virus beginnt (Abb. 1.3, letztes Bild) (Gallaher 1987; Moore et al. 1990; Hart et al. 1991).

1.7 Der Chemokinrezeptor CCR5

Die beiden HIV-1 Corezeptoren CCR5 und CXCR4 gehören zur Familie der 7-Transmembran G-Protein-gekoppelten Chemokin-Rezeptoren (GPCRs G protein coupled receptors) (Bockaert and Pin 1999; Murphy et al. 2000; Marinissen and Gutkind 2001). Während CCR5 vor allem von Effektor-T-Zellen (T_H1 und Gedächtnis T-Zellen) und natürlichen Killer Zellen, aber auch von Makrophagen, Monocyten, unreifen dendritischen Zellen und Langerhans Zellen exprimiert wird (Blanpain et al. 2002), ist CXCR4 auf nahezu allen Zelltypen präsent (Murphy et al. 2000) und ist während der Embryonalentwicklung unentbehrlich (Zhou et al. 1998; Lee et al. 1999). CCR5 scheint eine Rolle in der Funktion des Immunsystems zu haben, wie Studien zu CCR5-knock-out Mäusen gezeigt haben (Zhou et al. 1998). Da die Kristallisation komplexer Transmembranproteine wie CCR5 oder CXCR4 bisher noch nicht gelungen ist, wurden sämtliche Interaktionsmodelle anhand der Kristallstruktur des Rinder-Rhodopsins zur Aufklärung von GPCRs simuliert (Palczewski et al. 2000; Teller et al. 2001). Ein Markenzeichen für die Familie der GPCRs sind die beiden Cysteine in der zweiten und dritten extrazellulären Domäne. Der Chemokin-Rezeptor CCR5 enthält 2 zusätzliche Cysteine, welche eine Disulfidbrücke zwischen dem N-Terminus und der dritten extrazellulären Schleife bilden (Abb. 1.6). Mit diesen Disulfidbrücken werden vermutlich die extrazellulären Domänen in eine widerstandsfähigere Struktur gezwungen und dienen so der Stabilisierung des Rezeptors.



1.6 Der CCR5 Rezeptor als lineares und 3-Dimensionales Diagramm. Die extrazellulären Verbindungen der Cysteine stellen Disulfidbrücken dar und sind als gepunktete Linien dargestellt, aus (Lederman et al. 2006)

1.7.1 Die natürliche Funktion des Chemokinrezeptors CCR5

Die natürlichen Liganden der CCR5-Chemokinrezeptoren sind Chemokine (*chemoattractant cytokines*), spezielle Peptide mit 70-130 Aminosäuren, welche von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden. Zu den CCR5 Chemokinen zählen RANTES (*regulated on activation T cell expressed and secreted*, neue Nomenklatur: CCL5), MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein* oder CCL3) und MIP-1 β (CCL4), die nach Rezeptorbindung eine Signaltransduktion bewirken und letztendlich zu Zellbewegungen durch Chemotaxis oder auch Zellaktivierung führen (Samson et al. 1996; Berger et al. 1999; Murphy et al. 2000). Die Gemeinsamkeit der Chemokin-Rezeptoren liegt in ihrer 7-Transmembran-Struktur, bestehend aus extrazellulären und intrazellulären Schleifen (α -Helices), welche durch hydrophobe, Membran-durchspannende Domänen in der Plasmamembran verankert werden (siehe Abb. 3). Die Bindung von Chemokinen an CCR5 bewirkt die Dissoziation des Rezeptor-gekoppelten G-Proteins, welches die Phospholipase C aktiviert. Diese wiederum aktiviert Inositol-1,4,5-Triphosphat und Diacylglycerol, was die Ausschüttung von intrazellulärem Calcium und die anschließende

Aktivierung der Protein-Kinase C bewirkt (Aramori et al. 1997; Zhao et al. 1998). Es wird angenommen, daß die N-terminale Domäne essentiell ist zur Ligandenbindung, während der C-Terminus wichtig für die Protein-G Aktivierung ist (Farzan et al. 1999; Preobrazhensky et al. 2000; Farzan et al. 2002).

Kurz nachdem bekannt wurde, daß CCR5 als Corezeptor von HIV genutzt wird, wurde eine Deletion von 32 Basenpaaren in der kodierenden Region des CCR5-Gens in einigen Menschen identifiziert, welche einem hohen HIV-Infektionsrisiko ausgesetzt waren, sich aber dennoch nicht mit dem Virus infiziert haben. Der Defekt zeigt sich in einer 32bp Deletion ($CCR5\Delta32$) im Bereich der ECL2, welche dann zu einer Rezeptorexpression mit verkürzter AS-Sequenz führt. Aufgrund dieses Allel-Defektes kann der veränderte Rezeptor nicht mehr auf der Oberfläche von Wirtszellen präsentiert werden. Interessanterweise sind etwa 10-15% der europäischen Population von dieser Mutation betroffen (Dean et al. 1996; Stephens et al. 1998), davon etwa 1% homozygote Individuen. HIV-infizierte Patienten mit einer heterozygoten $\Delta32bp$ Mutation des Gens für CCR5 haben eine verminderte Anzahl von CCR5 auf den Zielzellen. Das spiegelt sich in einem verlangsamten Krankheitsverlauf wieder, weshalb dieses Allel bei gesunden Langzeit-infizierten (LTNPs: „*Long-Term Non-Progressors*“) überpräsentiert ist. Deren Immunsystem kann die HIV-Infektion über viele Jahre hinweg auch ohne HAART kontrollieren (Liu et al. 1996; Bieniasz and Cullen 1998; Antoni et al. 2007; Humbert et al. 2007). Menschen, welche homozygot für das $CCR5\Delta32$ Allel sind, haben eine normale Lebenserwartung und scheinbar keine offenkundigen Risiken in infektiöser oder immunologischer Hinsicht, womit der CCR5-Rezeptor ein guter Ansatz für die Therapie darstellen würde. Allerdings wurde aus neueren Studien bekannt, dass diese Mutation ein stark erhöhtes Risiko birgt, eine schwere West-Nil-Virus-Infektion zu entwickeln (Glass et al. 2006). Diese Daten sollten bei der Entwicklung von CCR5-Inhibitoren berücksichtigt werden.

1.7.2 Posttranslationale Modifizierungen des CCR5 Rezeptors

Die Sulfatierung von Tyrosinen in sekretierten und transmembranären Proteinen ist neben der O- und N-Glykosylierung eine der häufigsten posttranslationalen Modifizierungen und übt

außerdem eine Schlüsselfunktion bei extrazellulären Protein-Protein-Interaktionen aus. Viele Proteine, welche Tyrosin-sulfatiert sind, spielen eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen wie zum Beispiel der Rezeptor-Ligand Wechselwirkung, Zellkommunikation, inter- und intrazelluläre Transportmechanismen und bei der Proteinfaltung (Huttner 1982; Somers et al. 2000). Für die Sulfatierung sind die beiden Enzyme Tyrosylsulfotransferase-I und -II verantwortlich, welche eine starke Homologie zueinander aufweisen. Sie kommen membrangebunden vor allem im Trans-Golgi-Netzwerk vor und sulfatieren demzufolge nur Proteine, die dieses Netzwerk durchwandern müssen (Lee and Huttner 1983; Lee and Huttner 1985; Baeuerle and Huttner 1987). Auch für CCR5 ist die Sulfatierung von Tyrosin-Resten notwendig um eine optimale Bindung seiner natürlichen Liganden (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) zu ermöglichen. Im N-Terminus von CCR5 sind 4 Tyrosine vorhanden, die sulfatiert sein können. Die Substitution dieser Tyrosine durch Phenylalanine zeigte, daß die Bindung von MIP-1 α und RANTES um den Faktor 100 abnahm (Agrawal et al. 2004). Eine wichtige Rolle spielen Sulfotyrosine des Weiteren bei der Bindung von HIV-1 an den Corezeptor (Farzan et al. 1999; Cormier et al. 2000; Farzan et al. 2000). Im Vergleich zu anderen Corezeptoren gibt es in den extrazellulären Domänen relativ wenige Homologien, im N-Terminus sind jedoch hohe Übereinstimmungen festgestellt worden. Dort befindet sich eine Vielzahl von Tyrosinen und negativ geladenen sauren Aminosäuren, die essentiell sind für die Fähigkeit, als HIV-1 Corezeptor für R5-trope Viren zu fungieren (Farzan et al. 1999; Cormier et al. 2000). In Studien wurde gezeigt, daß sulfatierte Peptide, welche aus dem N-terminalen Bereich von CCR5 abgeleitet wurden, an gp120 banden und damit den HIV-1-Eintritt hemmen konnten, wogegen deren unsulfatierte Peptidanaloga diese Fähigkeit nicht besaßen (Farzan et al. 1999). Diese sulfatierten Peptide konnten sogar einer CCR5-Variante mit fehlendem N-Terminus deren Corezeptor-Aktivität zurückverleihen (Agrawal et al. 2004). Für die Bindungsaffinität des Corezeptors an gp120 scheinen die Sulfotyrosine an den Positionen Tyr-10 und Tyr-14 am wichtigsten zu sein. Peptide, welche an diesen Positionen sulfatiert waren, blockierten die Bindung der gp120-CD4-Komplexe im Gegensatz zu ihren unsulfatierten Analoga (Farzan et al. 1999; Cormier et al. 2000; Farzan et al. 2000). Eine weitere Studie hat gezeigt, daß auch die Sulfatierung an Position Tyr-3 benötigt wird, um eine Corezeptor-Bindung zu ermöglichen. Auch

Tyr-15 spielt eine Rolle bei der Corezeptor-Bindung, wobei hier vor allem der aromatische Rest der Seitenkette wichtig ist, da dieser bei der Corezeptorbindung zur Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen zum gp120 befähigt ist (Rabut et al. 1998; Cormier et al. 2000; Farzan et al. 2000; Farzan et al. 2002). Abschließend ist also festzustellen, dass *in vivo* mindestens zwei, wenn nicht sogar 4 sulfatierte Tyrosine zur Interaktion mit gp120 benötigt werden (Farzan et al. 1999; Cormier et al. 2001).

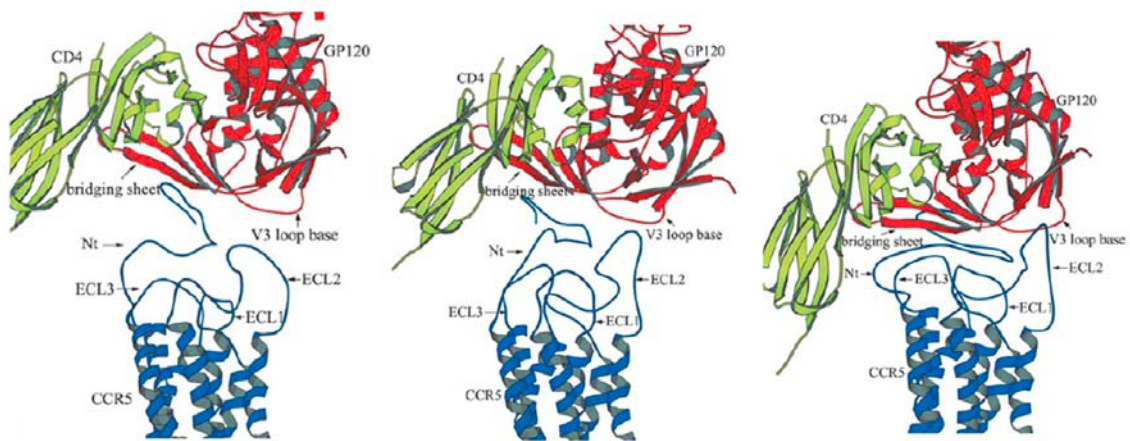
Eine weitere posttranslationale Modifizierung des CCR5 Rezeptors stellt die O-Glykosylierung dar, welche vorzugsweise am Ser-6 im N-Terminus stattfindet (Farzan et al. 1999). Die Entfernung des Oligosaccharids an dieser Stelle unterbrach die Chemokin-Bindung an CCR5, der HIV-Eintritt wurde jedoch nicht beeinflusst (Bannert et al. 2001). In der dritten extrazellulären Schleife befindet sich zudem eine potentielle N-Glykosylierungs-Stelle, die Glykosylierung konnte im CCR5 jedoch nicht nachgewiesen werden (Farzan et al. 1999). Eventuell kann die Proteinmodifikation an dieser Stelle nicht stattfinden, da sich in direkter Nachbarschaft ein Cystein und die dazugehörige Disulfidbrücke zum N-Terminus befindet und deshalb schwer zugänglich ist.

1.7.3 Die Interaktion von gp120 mit CCR5

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von neutralisierenden Antikörpern an die V3-Schleife die Interaktion des CCR5-Rezeptors mit dem gp120/CD4-Komplex verhindert (Wu et al. 1996). Da der humane CCR5 Rezeptor mit dem murinen CCR5 Rezeptor zu 82% homolog ist, wurden verschiedene Substitutionsstudien mit murinem CCR5 durchgeführt. Diese chimären CCR5-Rezeptoren enthielten dann lediglich eine einzige humane extrazelluläre Domäne, der Rest blieb murin. Der Austausch der Aminosäuren Ser-7, Asn-13, Tyr-15 im N-Terminus, Ser-180 in ECL2 und die Kombination von Tyr-18 mit Ser-185 in ECL2 zeigte, daß CCR5 seine Rezeptoraktivität verlor (Bieniasz and Cullen 1998). Monoklonale Antikörper gegen CCR5 ECL2 Epitope konnten die HIV-1-Infektion mit größerer Effizienz hemmen als solche, die gegen den N-Terminus von CCR5 gerichtet waren (Lee et al. 1999; Olson et al. 1999). Synthetische Peptide, welche von den extrazellulären Domänen CCR5's abgeleitet wurden, vor allem ECL2, konnten ebenfalls die HIV-1 Corezeptor-Aktivität hemmen, allerdings nur in höheren

Mikromolaren Konzentrationen (Agrawal et al. 2004; Veljkovic et al. 2007). Auch unsere Gruppe konnte zeigen, daß das aromatische- und saure Aminosäuren-enthaltende YD-Motif des N-Terminus von CCR5, zusammen mit dem FG-Motif der ersten extrazellulären Schleife (ECL1) absolut essentiell für den Eintritt von R5-tropen Viren ist (Konigs et al. 2007).

Die Bindung des viralen gp120 an den CD4-Rezeptor bewirkt in gp120 eine konformationelle Änderung wodurch die hochkonservierten CD4i-Epitope exponiert werden (Thali et al. 1993). Diese sind für die Corezeptor-Bindung entscheidend. Die Corezeptorbindestelle ist aus vier antiparallelen β -Faltblättern aus der V1/V2-Schleife zusammengesetzt, der sogenannten „bridging sheet“ (Kwong et al. 1998; Wyatt et al. 1998; Chen et al. 2005). Sie befindet sich direkt neben der V3-Schleife zwischen den äußeren und inneren Domänen von gp120 und wird im nativen Stadium wahrscheinlich von den V1-V2- und V3-Schleifen verdeckt. Auch die konservierten Regionen an der Basis der V1/V2- und der V3-Schleife werden nach Bindung von gp120 an CD4 exponiert (Lapham et al. 1996; Trkola et al. 1996) (Abb. 1.7 erstes Bild), dabei kommt die flexible V3-Schleife nahe an die Zielzellmembran (Huang et al. 2007).



1.7 Der CCR5 Corezeptor im Komplex mit CD4-gebundenem gp120. Der negativ geladene CCR5 N-Terminus reagiert mit den positiv geladenen Aminosäuren in der „bridging sheet“ von gp120 und die Spitze der gp120-V3-Schleife mit der 2. extrazellulären Schleife von CCR5, (Liu et al. 2007)

Die CD4i Corezeptor-Kontaktseite in gp120 ist demzufolge eine Kombination aus Sequenzen, die über die V3-Schleife, *bridging-sheet* und eventuell anderen Epitopen der variablen Schleifen, die bisher noch nicht dargestellt wurden, verteilt sind. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass bisherige Einblicke in die gp120-Struktur größtenteils auf löslichen monomeren

gp120 Proteinen basieren (Kwong et al. 1998; Chen et al. 2005; Kwong 2005) und das native trimere gp120 noch nicht in der CD4-gp120-CCR5-Konformation dargestellt werden konnte. Besonders wichtig zur Bindung der extrazellulären CCR5-Domänen ist die Spitze der V3-Region (Aminosäurereste 313-327) und die Stammregion (303-312 und 328-338), welche positiv geladene basische Aminosäuren beinhalten (Cormier and Dragic 2002). Mit diesen Domänen interagieren vor allem der N-Terminus und die zweite extrazelluläre Schleife auf der Seite des CCR5 Rezeptors (Dragic et al. 1998; Farzan et al. 1998; Blanpain et al. 1999) (siehe Abb. 1.7).

So werden die sulfatierten Tyrosine im CCR5 N-Terminus von konservierten Taschen der gp120-CD4i-Region mit hoher Selektivität umschlossen, wodurch die flexible V3-Schleife in ein stabiles β -Faltblatt konvertiert wird (Liu et al. 2003; Huang et al. 2007). Die Bindung der ausgedehnten sauren N-Terminalen CCR5-Region an die basische Region der *bridging sheet* induziert eine Konformationsänderung im N-Terminus (Abb. 1.7 erstes Bild). Diese führt dazu, dass die V3-Schleife in engen Kontakt zu ECL2 kommt (Abb. 1.7 zweites Bild). Die weiteren Interaktionen zwischen ECL2 und der V3-Spitze führen zu erneuten Konformationsänderungen in gp120, welche die Verbindung zwischen gp120 und gp41 verändert (Abb. 1.7, letztes Bild). Dieser Fusions-aktive Zustand führt zur Freilegung der gp41-Ektodomäne, die mit der Zielzellmembran interagiert und direkt zum Eintritt des Virus in die Zielzelle führt (siehe Kapitel 1.6).

1.8 HIV-1 Entry Inhibitoren

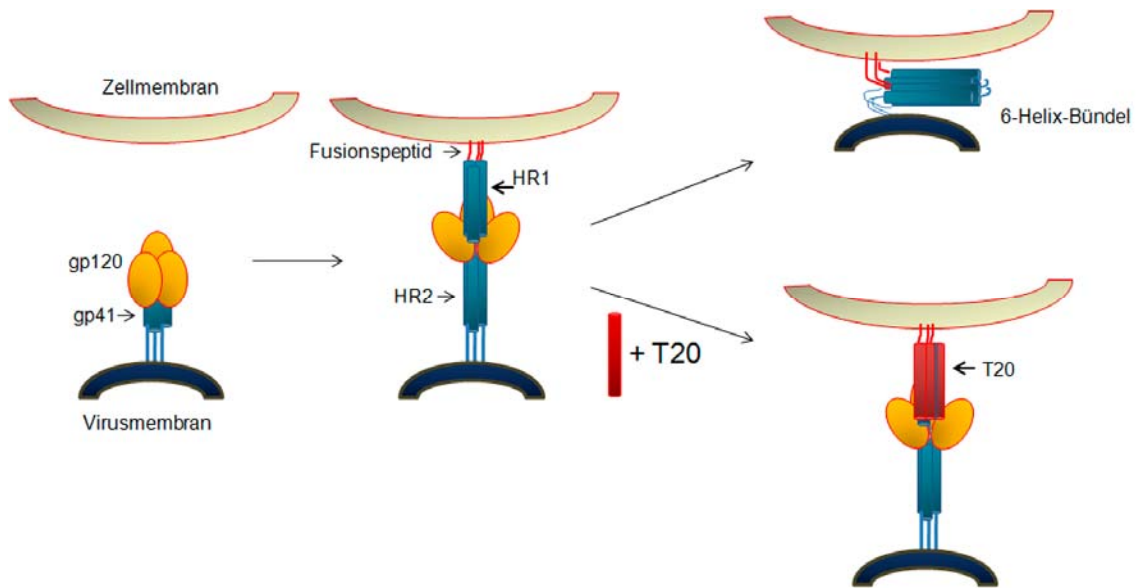
Die derzeitige HAART umfasst die Kombination von Inhibitoren der beiden viralen Enzyme Reverse Transkriptase und Protease. Zur Behandlung von Medikamenten-resistenten HIV-Stämmen wird der Fusionsinhibitor T20 eingesetzt. Dennoch ist die Behandlung mit diesen Wirkstoffen nicht kurativ und verursacht zum Teil schwere Nebenwirkungen. Weitere Inhibitoren, die an früheren Schritten des viralen Entwicklungszyklus greifen würden, wären demzufolge von Vorteil. Theoretisch könnte jeder einzelne Schritt des Eintritts in die Zelle gehemmt werden. Als Entry-Inhibitoren kann man zum jetzigen Zeitpunkt drei Wirkstoffklassen

zusammenfassen. Substanzen, die mit dem Primären CD4-Rezeptor interagieren und somit die erste Bindung des Virus mit der Zelle hemmen, werden als *Attachment*-Inhibitoren bezeichnet. Die Korezeptor-Antagonisten greifen an der Corezeptor-Bindungsstelle an und verhindern damit die Anlagerung von gp120 an CCR5. Fusions-Inhibitoren (FIs) wie T20 binden dagegen reversibel oder irreversibel an eine Domäne des viralen Transmembranproteins gp41 und hemmen die Bildung des 6-Helix-Bündels, welches für die Verschmelzung der beiden Membranen notwendig ist. Aufgrund ihrer Molekülgröße müssen die Fusionsinhibitoren bisher subkutan verabreicht werden.

1.8.1 Fusionsinhibitorische Peptide

Die Bindung sogenannter Fusionshemmer an bestimmte Domänen des transmembranen Proteins gp41 verhindert die Konformationsänderung in gp41 (Abb. 1.8), so daß sich die Intermediärstruktur, das fusionsaktive 6-Helix-Bündel, nicht ausbilden kann (beschrieben in Kapitel 1.5). Die erste Substanz dieser Klasse war der Prototyp T20 (Enfuvirtide, Handelsname Fuzeon®, Trimeris/Roche) und wurde Mitte 2003 in Europa zugelassen. T20 war der erste Peptid-basierte Fusions-Inhibitor, der durch die FDA (American Food and Drug Administration) im März 2003 zur Behandlung der fortgeschrittenen HIV-Krankheit bei Erwachsenen und Kindern zugelassen wurde (Matthews et al. 2004). T20 ist ein semisynthetisches 36 Aminosäuren Peptidderivat aus der zweiten Heptad-Wiederholungsregion des Transmembranproteins gp41 und hat eine hohe antivirale Aktivität gegen R5-, X4- und dual-trophe HIV-1 Isolate (Kilby 1999). Das Peptid hemmt mit einer IC_{50} von 1,7 ng/ml (unter 1 nM) Labor- als auch Wildtypisolate (Wild et al. 1995; Wild 2006).

Enfuvirtide verhindert die Fusion von HIV mit der Targetzelle durch die Blockierung einer Konformationsänderung in gp41 (Abb. 1.8). Die schlechte orale Bioverfügbarkeit hat den Nachteil, daß das T20 Peptid zweimal täglich subkutan in einer Dosis von jeweils 45 mg injiziert werden muss und dadurch zu unerwünschten lokalen Reaktionen an der Injektionsstelle in oder unter der Haut führt. Eine Verabreichung von T20 als Monotherapie führt außerdem relativ rasch zur Resistenzentwicklung, die mit Mutationen der Aminosäuren 36-45 der HR-1 (heptad repeat) Region von gp41 und auch im *env* Gen assoziiert ist (Wei et al. 2002; Lu et al. 2004).



1.8 Bildung des 6-Helix-Bündels. T20 verhindert die Formation des 6-Helix-Bündels indem es an die erste Heptad-Wiederholungseinheit HR1 bindet und das Zusammenklappen von HR1 und HR2 blockiert.

Momentan befindet sich eine neue Generation peptidischer Fusionsinhibitoren vom Typ des Enfuvirtids in der Prälinik: TRI-999 und TRI-1144 (Dwyer et al. 2007) (Trimeris Inc.). Diese Peptide, welche im Vergleich zu Enfuvirtide mehr N-terminal gegen HR2 ausgerichtet sind, erwiesen sich auch gegen Enfuvirtide-resistente Viren als wirksam und zeigten im Vergleich zu T20 eine wesentlich bessere Pharmakokinetik. Mit der Anwendung von organischen Salz-Komplexen will man die Eliminierungsraten der neuen Fusionshemmer reduzieren. Dies hätte den Vorteil, daß die zweimal-tägliche Injektion durch eine einmalige wöchentliche subkutane Applikation ersetzt wird. Sifuvirtide ist ebenso ein neuer peptidbasierter Fusionsinhibitor, der in China entwickelt wird (Dai et al. 2005; Dai et al. 2005; Dai et al. 2005). In Affen zeigte sich eine längere Halbwertszeit gegenüber T-20, allerdings ist die orale Gabe ebenfalls nicht möglich.

Ein weiterer Fusionsinhibitor ist C46, der ebenso wie T20 aus der 2. Heptad Repeat Domäne von gp41 hervorgegangen ist, jedoch noch 10 weitere Aminosäuren in Richtung des N-Terminus von gp41 enthält. In der Arbeitsgruppe von Laer wurde ein retroviraler Vektor, M87o entwickelt, welcher zur Expression einer 46-Aminosäuren langen membran-verankerten Version des Peptids C46 führt (Egelhofer et al. 2004). Dieses Membranständige Peptid ist in der Lage, die gp41-vermittelte Fusion von Virus- und Zellmembran zu verhindern und übt damit einen Schutz auf die transduzierten CD4-Zielzellen aus. So wurde in Zelllinien und primären

Lymphozyten gezeigt, daß M87o die Infektion durch unterschiedliche HIV-Isolate sehr effektiv verhindert. Zudem konnte C46 auch primäre Zellen vor einer HIV Infektion schützen, hatte nur ein geringes Immunogenitätsrisiko und keinerlei toxische Nebenwirkungen. In klinischen Voruntersuchungen wurde eine Gentransferrate von ca. 50% erreicht (Schambach et al. 2006). Nachdem festgestellt wurde, daß weder akuttoxische noch zelluläre und humorale Immunreaktionen auftraten, wurde ein Protokoll zur Durchführung einer klinischen Studie zur Toxizität und Wirksamkeit (Phase I/II) an HIV-infizierten Probanden erstellt. Dieses wurde daraufhin erfolgreich vom Versuchsmaßstab in den klinisch relevanten Produktionsmaßstab übersetzt (Chen et al. 2006; van Lunzen et al. 2007). Allerdings hat auch dieses membranständige C46 zur Resistenzbildung geführt. In der Arbeitsgruppe von Laer konnte Felix Hermann zeigen, daß in den Viren, welche dauerhaft auf Zellen passagiert wurden, die das membranständige Peptid exprimieren, Mutationen nicht nur in gp41 sondern auch in gp120 auftraten (Lohrengel et al. 2005).

Ein natürliches, körpereigenes HIV-hemmendes Peptid wurde von Frank Kirchhoffs Gruppe in Ulm entdeckt. Aus humanem Hämofiltrat, das bei der Dialyse von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz in großen Mengen anfällt, wurde ein körpereigenes Peptid, VIRIP (Virus inhibitory peptide), identifiziert (Munch et al. 2007). Dieses 20-Aminosäuren lange Peptid ist ein Teil des humanen α -1-Antitrypsins, eines Serin-Protease-Inhibitors. Es konnte gezeigt werden, daß VIRIP spezifisch das Fusionspeptid in gp41 blockiert und so den Eintritt von verschiedenen HIV-1 Stämmen in die Zielzellen verhindern konnte. Selbst Viren, die gegen Protease-Hemmer und T20 resistent waren, konnten mit VIRIP gehemmt werden. Durch die Mutation von nur 2 Aminosäuren in VIRIP konnte dessen antivirale Aktivität sogar noch verstärkt werden (Original VIRIP IC₅₀: 26 μ M; VIR-353 IC₅₀: 150 nM).

1.8.2 Chemokine und CCR5-Corezeptor-Antagonisten

Da es einen offenkundigen Zusammenhang zwischen HIV und dem Chemokin-System gab, waren Chemokin-Derivate neben T20 die ersten Entry Inhibitoren, die für die Hemmung des HIV-1 Eintritts in Zielzellen entwickelt wurden. 1995 konnte gezeigt werden, daß die kombinierte Gabe der natürlichen Rezeptorliganden MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES den Eintritt gegen R5-trope Viren in die Wirtszellen verhindert (Cocchi et al. 1995; Pal et al. 1997). Analog dazu wurde derselbe Effekt auch mit SDF-1 für Viren erreicht, die CXCR4 als Corezeptor nutzen (Bleul et al. 1996; Oberlin et al. 1996). Seitdem wurden verschiedene Varianten, hauptsächlich N-terminal modifizierte RANTES- oder SDF-1-Chemokine entwickelt, die eine hohe antivirale Potenz *in vitro* zeigen konnten (Arenzana and Rodriguez de Cordoba 1996; Simmons et al. 1997; Dealwis et al. 1998; Loetscher et al. 1998) (Ylisastigui et al. 1998; Yang et al. 1999).

Neben den natürlichen Chemokinen konnten nicht-agonistische Chemokin-Derivate, monoklonale Antikörper gegen CCR5 sowie typische Wirkstoffmoleküle eine Hemmung von HIV bewirken. Den Wirkstoffmolekülen ist gemeinsam, daß sie den CCR5 Rezeptor allosterisch hemmen indem sie an eine hydrophobe Tasche innerhalb der 7 transmembranen Schleifen des Corezeptors binden (Watson et al. 2005). Dies führt zu einer Konformationsänderung im Rezeptor, so daß dieser nicht mehr an das HIV Hüllprotein binden kann. Der erste Inhibitor dieser Klasse war TAK-779, der während eines chemischen Optimierungsprogramms entdeckt wurde (Baba et al. 2000). TAK (Takeda) ist ein sehr potenter und spezifischer CCR5 Antagonist, der die CCR5-vermittelte Ca²⁺-Aktivierung blockiert. Außerdem verhindert TAK-779 die RANTES-induzierte Ca-Signalgebung in CCR5-exprimierenden Zellen, führt jedoch nicht zur Signalvermittlung oder gar zur Internalisierung (De Clercq 1999). TAK-779 inhibiert die HIV-1 Replikation, indem es die Interaktion des viralen Glykoproteins gp120 mit CCR5 hemmt, wodurch die Virus-Zell-Fusion und somit der Eintritt in die Zelle unterbunden wird (Dragic et al. 2000). Obwohl TAK-779 sehr starke antagonistische und antivirale Aktivität *in vitro* zeigte, wurde dennoch die Weiterentwicklung zum therapeutischen Wirkstoff eingestellt, da sein pharmakologisches und toxikologisches Profil relativ schlecht ausfiel.

CCR5-Antagonisten werden immer in Kombination, vorzugsweise mit 2 Nukleosidanalogen RT-Hemmern eingesetzt. Der Peptidwirkstoff Maraviroc (Handelsname Celsentri®, Kürzel: MVC; früher UK-427,857) ist der derzeit vielversprechendste CCR5-Antagonist. Klinische Studien der beiden anderen CCR5-Antagonisten Vicriviroc (Phase III) und Aplaviroc (Phase II) mussten gestoppt werden, da sie zu starker Lebertoxizität führten (Crabb 2005). Da Maraviroc nur R5-trope Viren hemmt, muss vor einer Therapie der Rezeptortropismus bestimmt werden. Bedenklich sind jedoch Resistenzbeobachtungen, wonach Viren mit erworbenen Resistenzen in der Lage sind, den Rezeptor selbst in der Antagonisten-gebundenen Form zu nutzen (Kondru et al. 2007). In Deutschland war Celsentri® für vorbehandelte Patienten mit R5-tropen Viren und beschränkten Therapieoptionen ab Mitte Oktober 2007 erhältlich (www.HIV-net.de).

Peptide bei der Bekämpfung von HIV werden in nächster Zeit vermutlich weiter an Bedeutung zunehmen. So bietet eine Proteintherapie nicht nur gegenüber der Gentherapie sondern auch gegenüber chemischen Substanzen große Vorteile. Aufgrund ihrer geringen Größe haben Peptide sehr spezifische Funktionen, so dass unerwünschte Nebenwirkungen weitgehend vermieden werden (Huther and Dietrich 2007). Zudem wird die Spezifität durch ihre Expression und Verteilung im Organismus bestimmt (Russell and Clarke 1999).

1.8.3 Neutralisierende Antikörper

Ein weiterer therapeutischer Ansatz besteht in der Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen virale Proteine. Mit einer erfolgreich induzierten Bildung solcher Antikörper würde man einer HIV-Vakzine deutlich näher kommen. In der akuten Phase der Infektion bilden sich HIV-spezifische Antikörper (Serokonversion), die hauptsächlich gegen Epitope der Strukturproteine Env und Gag gerichtet sind. Darunter sind auch solche zu finden, die HIV-neutralisierend wirken (Robert-Guroff et al. 1985; Weiss et al. 1985; Moore and Nara 1991). Diese richten sich hauptsächlich gegen drei Bereiche der Hüllproteine: Den hypervariablen Teil der V3-Schleife des gp120, die CD4-Bindungsstelle im gp120 und den zentralen Bereich des gp41. Der überwiegende Teil der neutralisierenden Antikörper bindet an die V3 Schleife (Vogel et al. 1994). In der späteren asymptomatischen Phase sind Antikörper gegen fast alle viralen Proteine nachweisbar (Burton and Montefiori 1997). Da jedoch HIV aufgrund seines

Replikationsmechanismus´ eine äußerst hohe Mutationsrate besitzt (Preston et al. 1988; Roberts et al. 1988) und die V3 Schleife hypervariabel ist, entstehen ständig neue Phänotypen mit veränderten Epitopen (Palker et al. 1988; Rusche et al. 1988; Javaherian et al. 1989). Die mutierten Viren entkommen dadurch immer wieder der Neutralisation durch Antikörper, die gegen die V3 Schleife gerichtet sind, und werden auch als Fluchtmutanten bezeichnet (Reitz et al. 1988; McKeating et al. 1989; Albert et al. 1990; Nara et al. 1990).

Darüberhinaus gibt es auch Antikörper, deren Neutralisations-Fähigkeit durch die Anwesenheit von CD4 verstärkt wird (Thali et al. 1993). Die Epitope dieser CD4-induzierten (CD4i) Antikörper überlappen mit der Corezeptor-Bindestelle von gp120 (Trkola et al. 1996; Wu et al. 1996). Dennoch haben die Prototypen dieser Antikörper 17b und 48d nur schwach-neutralisierende Eigenschaften (Thali et al. 1993; Sullivan et al. 1998) und neutralisieren T-Zelllinien-adaptierte X4-Isolate besser als R5 Primärisolate (Thali et al. 1993; Pognard et al. 2001). Interessanterweise sind die CDR3 Regionen der CD4i Antikörper reich an Tyrosinen, welche zudem sulfatiert sind. Wie auch im N-Terminus von CCR5 ist die Sulfatierung dieser CDR3-Regionen ausschlaggebend für die gp120-Bindung und eine damit einhergehende Infektionsneutralisation. Diese Tyrosin-sulfatierten Antikörper bevorzugen im Gegensatz zu anderen gp120-neutralisierenden Antikörpern R5-Isolate. Die CDR3-Region des Antikörpers E51 wurde kürzlich mit der Fc-Region von IgG1 als Fusionspeptid exprimiert. Dieses Peptid war in der Lage, HIV-1 besser zu hemmen als Peptide, die direkt aus dem N-Terminus von CCR5 abgeleitet wurden (Dorfman et al. 2006). Ursprünglich bindet der humane Antikörper E51, mit den Epitopen IKQI an den hochkonservierten basischen b-strang von gp120 (aa420-423), eine Region welche in der CCR5-Bindung beteiligt ist. Der mAB wurde aus einem HIV-Patienten isoliert der frühe STI bekam, E51 blockiert die CCR5-Bindung wie 17b an sCD4-gebundenes gp120 (Xiang et al. 2003).

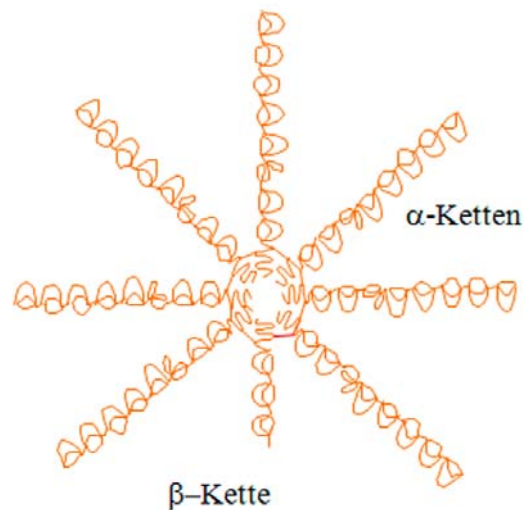
1.9 Multimerisierung von Proteinen

Trotz der enormen Wirksamkeit kleiner therapeutischer Peptide wie T20 haben diese den Nachteil, daß ihre Halbwertszeit sehr kurz ist und die mehrmalige subkutane Verabreichung deshalb zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. Um das therapeutische Potential und auch die Stabilität von Peptiden zu erhöhen, wird die Multimerisierung als Hilfsmittel eingesetzt. In vielen biologischen Systemen dient die Multivalenz dazu, molekulare Interaktionen zu verbessern. Die Vorteile der Multimerisierung sind zum Beispiel die höhere Bindekraft, verbesserte Stabilisierung der Struktur und die Kombination von mehreren Funktionen in nur einem Molekül. Außerdem können auch die pharmakokinetischen Eigenschaften *in vivo* verbessert werden (Willuda et al. 2001). Ein Beispiel für die die Verbesserung phamakokinetischer und antiviraler Eigenschaften durch Vergrößerung oder Multimerisierung von Molekülen ist der Attachment Inhibitor PRO-542. *In vitro* kann die lösliche Form des humanen CD4-Rezeptors (sCD4) labor-adaptierte Virusstämme neutralisieren (Smith et al. 1987; Trauncker et al. 1988). In klinischen Studien konnte sCD4 aufgrund schlechter Bioverfügbarkeit Primärisolate nur schwach neutralisieren (Daar et al. 1990; Kahn et al. 1990). Der entscheidende Fortschritt kam dann durch einen tetravalenten CD4-basierten Antikörper, PRO-542 (Progenics). Dieser rekombinante Antikörper kann an das virale Hüllprotein gp120 binden und verhindert damit das Andocken des HI-Virus an den körpereigenen zellulären CD4-Rezeptor (Allaway et al. 1995). Die Tetravalenz des Antikörpers erhöhte nicht nur die Halbwertszeit (3-4 Tage) sondern auch seine inhibitorischen Eigenschaften gegen verschiedene HIV-1 Primärisolate (Jacobson et al. 2000). PRO-542 befindet sich in Phase II der klinischen Testung sowohl für die systemische als auch die mikrobizide Anwendung.

1.9.1 Das C4b-System

C4bp ist ein humanes Plasma-Glykoprotein mit einer Größe von 500 kDa (ca. 4000 Aminosäuren) und wird, wie die meisten Komplement- und Plasma-Proteine, in der Leber synthetisiert. Seine Konzentration im Plasma beträgt ca. 200 mg/l (Marcovina et al. 1991). Die hauptsächliche Isoform von C4bp im Plasma besteht aus 7 identischen α -Ketten (75 kDa) und einer β -Kette (40 kDa), welche durch Disulfidbrücken im C-terminalen Teil des Zentrums

zusammengehalten werden (Scharfstein et al. 1978; Hillarp and Dahlback 1990). Andere, selten vorkommende Formen bestehen aus 6 α -Ketten und 1 β -Kette oder lediglich 7 α -Ketten. Alle α -Ketten enthaltende C4bp Moleküle zirkulieren im Plasma innerhalb eines hoch-affinen, Calcium-abhängigen Komplexes mit Vitamin-K-abhängigem, antikoagulierendem Protein S (Dahlback et al. 1983). Die C-terminale Region (60 Aminosäuren) sowohl der α - als auch der β -Ketten enthalten jeweils 2 Cysteine sowie eine amphipathische α -Helix Region, welche ebenfalls für den Zusammenschluß von C4bp notwendig ist. Die α - und β -Ketten enthalten 8 und 3 sogenannte Komplement-CCP (*complement control protein*) Komplexe. Im Elektronenmikroskop betrachtet, hat C4bp eine Spinnen-ähnliche Struktur worin die α -Ketten die verlängerten Arme darstellen (Abb. 1.9). Der Multimerisierungsprozess der C4bp-Moleküle verläuft sehr schnell, sie werden innerhalb von 40 min im endoplasmatischen Retikulum vollständig zusammengesetzt (Kask et al. 2002).



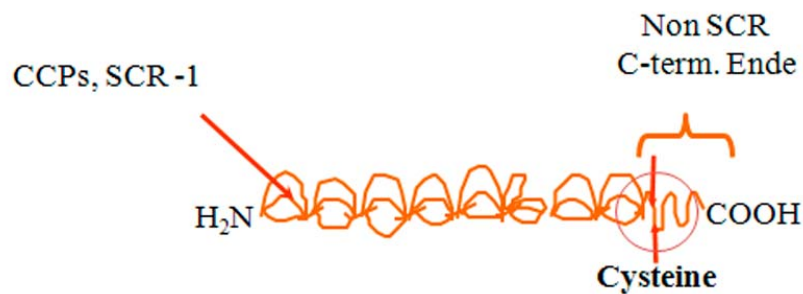
1.9 Das humane C4-bindende Protein. Jeweils 7 α -Ketten und 1 β -Kette bilden das humane C4bp. Die einzelnen Ketten sind durch die beiden im C-Terminus vorhandenen Cysteine über Disulfidbrücken verbunden.

Weitere Experimente zeigten, daß die α -Kette zur Multimerisierung nicht notwendig ist und ihre alleinige Expression zum Rückhalt und zur Degradation innerhalb der Zellen führt (Libyh et al. 1997). C4bp zählt zu den regulatorischen Proteinen der Komplementkaskade, es ist ein wichtiger Hemmer sowohl des klassischen- als auch des Lektin-Komplement-Weges

(Suankratay et al. 1999). Seine hemmende Funktion liegt in der Kontrolle C4bp-vermittelter Reaktionen. Zum Einen wirkt C4bp als Kofaktor von Faktor I (FI) bei der proteolytischen Inaktivierung des löslichen als auch des Zell-gebundenen C4b wo es die Bildung und Rekonstitution der klassischen C3-Konvertase (C4bC2a-Komplex) verhindert. Zum anderen verhindert C4bp die Zusammensetzung der klassischen C3-Konvertase durch die Bindung an neu-entstehendes C4b. Außerdem beschleunigt C4bp den natürlichen Abbau des C4bC2a-Komplexes (Daha and van Es 1980) und agiert als FI Kofaktor bei der Spaltung von C3b womit es den alternativen Komplement-Weg hemmt (Seya et al. 1985; Blom et al. 2003).

1.9.2 C4bp als Multimer

Der C-terminale Teil C4bps hat keinerlei biologische Funktion, ist jedoch verantwortlich für die Polymerisierung des Moleküls im Cytoplasma C4bp-produzierender Zellen (Villoutreix et al. 1998). Aufgrund dieser Eigenschaft, der fehlenden biologischen Funktion sowie der fehlenden Immunogenität eines regulären humanen Plasma Proteins, wurde der C-terminale Teil der α -Kette C4bps ausgewählt um homomultimere Proteine zu generieren (Abb. 1.7).



1.10 Die α -Kette des C4bp. Der C-terminale Teil C4bps (57 Aminosäuren) hat keinerlei biologische Funktion und wird deshalb zur Multimerisierung verwendet. CCPs: complement control proteins; SCR-1 short consensus repeats

Durch molekulares Klonieren kann man diese Oligomerisations-Domänen mit funktionellen Peptidsequenzen kombinieren. Oudin et al. nutzten das C4bp-System um das Glycoprotein CR1, welches auf der Membran-Oberfläche von Erythrozyten vorkommt, zu multimerisieren. Diese Multimere konnten sich an Erythrozyten anheften und bewirkten eine Wiederherstellung und Verstärkung der Immunkomplexbindung (Oudin et al. 2000). Des Weiteren wurde auch humanes CD4 an das C-terminale Ende des C4bp Moleküls fusioniert, wodurch ein lösliches

CD4-Multimer entstand (Shinya et al. 1999). Sowohl das in Zellen als auch in Mäusen, als Organoid synthetisierte CD4-Multimer stellte sich im Vergleich zum löslichen, kommerziell erhältlichen Mono-CD4 als der bessere *in vitro* Hemmer der HIV Infektion dar. Die Plasmakonzentration von multimerem CD4 lag im Vergleich zu monomerem CD4 deutlich höher, was darauf schließen ließ, daß auch die Halbwertszeit multimerer Moleküle erhöht ist.

1.9.3 C46 Multimere zur Hemmung von HIV-1

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein weiteres therapeutisches C4bp-basiertes Multimer entwickelt, das C46-Multimer, welches die Grundlage für diese Arbeit schuf. In (Dervillez et al. 2006) wurde das Fusionsinhibitorische Peptid C46 als Heptamerer Molekül von eukaryotischen Zellen stabil exprimiert. Dies gelang mit Hilfe eines bicystronischen eukaryotischen Expressionsvektors pEF-IRES, der neben dem therapeutischen C46-Peptid auch das Resistenzgen für Puromycin enthält (Hobbs et al. 1998). Ein Signalpeptid wurde vom LNGFR (*low affinity nerve growth factor receptor*) eingefügt, welches zur Sekretion aus dem ER beiträgt. Es wurden verschiedene monomere, dimere und multimere C46-Konstrukte entwickelt, um deren Expression und HIV-1-hemmende Eigenschaft zu untersuchen und zu optimieren. Wir konnten zeigen, daß das Minimalkonstrukt, welches lediglich das Signalpeptid mit der C46-Domäne enthielt, zwar erfolgreich translatiert wurde, jedoch nur im Cytoplasma der Zellen nachgewiesen werden konnte. Ergänzte man dieses Minimalkonstrukt mit der C4bp-Domäne, in der die beiden für die Multimerisierung verantwortlichen Cysteine durch Alanine ersetzt wurden, konnte man das daraus gebildete Monomer (C46-C4bpC1GC2G; ca. 20 kDa) zu einem relativ geringen Teil auch im Zellkulturüberstand finden. Auch das Dimere Protein (40 kDa) verblieb zu 50% innerhalb der Zellen. Das Multimere C46 (C46-C4bp α ; 140 kDa) konnte dagegen hauptsächlich im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Wir folgerten daraus, dass für eine effektive Proteinsekretion aus Zellen die Größe dieser Proteine mindestens 20 kDa betragen muss. Die antivirale Aktivität der C46-Multimere wurde in HIV-1 entry Hemmversuchen *in vitro* getestet (Dervillez et al. 2006). Ein Teil dieser Versuchsergebnisse wird in dieser Arbeit dokumentiert und diskutiert.

1.10 Ziel der Arbeit

Ein aussichtsreicher Ansatz für die Wirkstoffentwicklung ist die Wechselwirkung von gp120 mit dem Corezeptor CCR5. Das Ziel dieser Arbeit war es, neben den C46-Multimeren ein CCR5-Peptidbasiertes System zu generieren, das HIV-1 Entry auf der Ebene der Corezeptor-Bindung hemmen sollte. Im Gegensatz zur klassischen HAART, welche die virale Transkriptase und Protease in bereits infizierten Zellen als Angriffspunkte hat, soll dieses alternative System Zellen vor einer Infektion schützen um die Ausbreitung der Viren im Patienten zu unterbinden. Idealerweise könnten die therapeutischen Multimere in Form einer Proteintherapie oder auch eines topikalen Mikrobizids angewendet werden. Da die extrazellulären Domänen des CCR5 Corezeptors eine Schlüsselfunktion im Eintrittsprozess von HIV-1 darstellen, galt die Multimerisierung dieser Epitope als äußerst vielversprechend. Nicht nur die Original CCR5 extrazellulären Schleifen wurden ausgewählt, um einen optimalen antiviralen Effekt zu erzielen, sondern auch Peptide, welche in Phage-Display Screens von CCR5-Antikörpern gefunden wurden und starke Homologien zu den extrazellulären CCR5 Epitopen aufweisen, sogenannte Mimotope (Konigs et al. 2007). Durch „Imitation“ der interagierenden CCR5 Schleifen in Form von rekombinanten Molekülen sollten HIV-1 Pseudoviren daran gehindert werden, während bestimmter Zeitfenster im HIV-1 Entry-Prozess mit dem echten CCR5 Rezeptor auf den CD4⁺ Targetzellen zu interagieren, um in die Zellen einzudringen. Der Vorteil des eukaryotischen Expressionssystems liegt in der korrekten posttranslationalen Prozessierung, wie z.B. der Sulfatierung der multimerisierten CCR5-Teilstrukturen. Die Multimerisierung dieser CCR5-Strukturen würde zudem die Halbwertszeit im Vergleich zu ihren synthetischen monomeren Pendants erhöhen, und auch aufgrund der Multivalenz eine stärkere antivirale Aktivität aufweisen. Außerdem wären in Folge von Resistenzentwicklungen gegen HAART und T20 weitere Therapie-Alternativen in Form von neuen Targetstrukturen wie z.B. die CCR5-gp120-Interaktion erforderlich. Der Vorteil der Entwicklung solcher HIV-Inhibitoren aus bestimmten Bereichen des humanen CCR5-Rezeptors selbst wäre, dass sich dieses Protein nicht verändert wie das unter hohem Evolutionsdruck stehende Virus. Eventuell würde die Kombination von T20 oder gar Protease- bzw. RT-Hemmern mit CCR5- oder C46-Multimeren zu synergistischen Effekten führen.

2 Material

2.1.1 Chemikalien, Biochemikalien

Chemikalie	Hersteller
100x Rinderserumalbumin (10 mg / ml) (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
30 % Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	BioRad , München
Ammoniumpersulfat (APS #0)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
β -Mercapto-Ethanol	Merck, Darmstadt
BioTherm Taq DNA-Polymerase	Natutec, Frankfurt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Phosphat/Citratpuffer-Tabletten	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
CD4 (recombinant human soluble CD4)	R&D Systems
Coomassie Blue G250	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dithio-1,4-threitol, (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid, (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol ($\geq 99,8$ %)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HPLC-Wasser	Merck, Darmstadt
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol ($\geq 99,7$ %)	Roth, Karlsruhe
Kaleidoskop Protein Marker	BioRad, München
Kaliumdihydrogenphosphat, (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM in 0,85 % NaCl-Lösung)	Bio Whittaker Verviers, Belgien
Luciferin	Promega, Mannheim
Magermilchpulver	Fluka, Buchs, Schweiz
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe

Methanol (>99,8 %)	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Natriumazid NaN_3	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid OPD	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease-Inhibitor Mix	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
QA-Agarose	MP Biomedicals, Solon USA
Tris = TrisHCl ($\geq 99,9$ %) (MW: 121,14 g / mol)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1x)	GibcoTM, Los Angeles USA
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.2 Lösungen, Medien und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
Agarose-Ladungspuffer, 6x	0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol 15% Ficoll
Ampicillin-Stammlösung	100mg/ml in Aqua dest.
Blockingpuffer ECL	50 ml PBS 2,5 g Milchpulver 50 μl Tween 20
Blockingpuffer Odyssey	50 ml PBS 2,5 g Milchpulver
Blottingpuffer	14,41 g Glycin 3,03 g Tris auf 800 ml mit Aqua dest. auffüllen 200 ml Methanol
CASY@ton-Puffer	Casy, Reutlingen
Ethidiumbromidlösung	1% (w/v) Ethidiumbromid in Aqua dest.

Elutionspuffer/ Aekta Prime System	20 mM Natrium Phosphat 500 mM NaCl 500 mM Imidazol mit H ₂ O auf 1l auffüllen und auf pH 8,0 einstellen sterilfiltrieren
LB-Agar	LB-Medium 3% (w/v) Agar, autoklavieren
LB-Ampicillin-Agar	LB-Agar, autoklavieren 1ml Ampicillin-Stammlösung
LB-Ampicillin-Medium	LB-Medium, autoklavieren 0,01% des LB-Medium Volumens Ampicillin-Stammlösung
LB-Medium	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
Luciferase Puffer	1,25 ml Mes-Tris (1 M) pH 7,8 250 µl MgCl ₂ (1 M) 24 mg ATP 8,5 ml dH ₂ O
Luciferin-Reagenz	10 mg Luciferin (Promega) 36 ml KHPO ₄ (5 mM), pH 7,8
Lysispuffer für Luciferase-Test	1,5 ml Mes-Tris (1 M, pH 7,8) 30 µl DTT (1 M) 300 µl 10% (w/v) Triton X 100 3 ml 10% (w/v) Glycerin 25,5 ml dH ₂ O
PBS, 1x / NaN ₃ , 0.02%	10ml 10x PBS, 100 µl NaN ₂ (20%) 90 ml dH ₂ O
Sammelgelpuffer	30,25g Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen mit dH ₂ O auf 500ml auffüllen
SDS-Ladungspuffer, 6x	60% (v/v)Glycerin 18% (w/v)SDS 0,3% (v/v) Bromphenolblau 600mM Tris-HCl

	12% (v/v) β -SH-Ethanol
TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA auf pH 8,0 einstellen
TE-Puffer	GibcoBRL, NY, USA
Trenngelpuffer	1,5 M Tris 10mM SDS auf 200 ml dH ₂ O auffüllen, pH 8,8
Waschpuffer	300 ml PBS(1x) 6 g Milchpulver 300 μ l Tween-20
Waschpuffer/Blockpuffer	1xPBS 1% (w/v) Milchpulver 0,1% (v/v) Tween-20
Zelllysatzpuffer	3,15 g Tris-HCl (40 mM) 4,38 g NaCl (150 mM) 0,19 g EGTA (1 mM) 0,93 g EDTA (5 mM) 5 ml (w/v) Triton X 100 (1%) 2,5 ml NP40 (0,5%) mit dH ₂ O auf 500 ml auffüllen, pH 7,4 sterilfiltrieren
Zelllysatz-Ansatzlösung	10 μ l PMSF (100x) 100 μ l Protease-Inhibitor Mix (10x) In 890 μ l Zelllysatzpuffer lösen
Harvestpuffer/Luciferase-Test	1,5 ml Mes-Tris (1 M, pH 7,8) 30 μ l DTT (1 M) 300 μ l 10% (w/v) Triton X 100 3 ml 10% (w/v) Glycerin 25,5 ml dH ₂ O

2.1.3 Antikörper

Name	Spezies	Beschreibung	Referenz
α -His- IR Dye 800	Kaninchen	Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelt, gegen His-Tag gerichtet.	Li-Cor, Lincoln, USA
α -His	Kaninchen	gegen 6x His-Tag gerichtet	Rockland, USA
α -human- F_c -HRP	Maus	gegen die F_c -Region von humanen Antikörpern, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase gerichtet	Dianova, Hamburg
2F5 IgG2 (α -gp41)	Human	gegen ELDKWA aus der C-terminalen Heptadwiederholung von gp 41 gerichtet	Hermann Katinger, polymun scientific, Wien, Österreich
17b (α -gp120)	Human	gegen HIV-1 gp120 CCR5-binding site gerichtet, biotinyliert	NIH; USA
2F12	Maus	Gegen C4bp α gerichtet	X. Dervillez/ J. Cohen, Reims
α -myc	Maus	gegen humanes c-myc Epitop gerichtet	Dianova, Hamburg
α -mouse- F_c -HRP	Ziege	gegen Maus-IgG (H+L) gerichtet, mit HRP gelabelt	Dianova, Hamburg
α -human- F_c -HRP	Ziege	gegen humanen IgG-(H+L) gerichtet, mit HRP gelabelt	Dianova, Hamburg
α -rabbit-HRP	Schaf	gegen Hasen-IgG (H+L) gerichtet, mit HRP gelabelt	Dianova, Hamburg
2D7 (Cat #3933) IgG2a	Maus	gegen die 2. extrazelluläre Schleife gerichtet von CCR5	NIH
3A9 (Cat #556041) IgG2a	Maus	gerichtet gegen die 1. extrazelluläre Schleife und den N-Terminus von CCR5	NIH/BD

2.1.4 Peptide (hergestellt von Dr. Volker Klaukien, MPI Göttingen)

Peptid	Aminosäuresequenz	Molekulargewicht
„NTCp“ KL2/N-Terminus CCR5 sulfatiert	MDYQVSSPIYDINYYTSEPSQK	2627 Da
E51p sulfatiert an 3 Tyrosinen	GDYADYDGGYYYDMD	2022 Da
KL1/XD3	HKQPWYDYWLLR	1704 Da
3A9-L-5C7	SPIYDSGSGSPWDFGSGSGSGLD	2388 Da

2.1.5 HIV-1 Eintrittsinhibitor

Inhibitor	Verwendung	Referenz
T20/ Enfuvirtide, Sequenz: YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASL	Inhibitionsassays/single- round infection	Der Inhibitor wurde freundlicherweise von Dorothee von Laer zur Verfügung gestellt

2.1.6 *E. coli* Bakterienstamm

Stamm	Beschreibung	Hersteller
<i>E. coli</i> , TOP10	F' <i>mcrA</i> Δ(<i>mmr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 araD139 D (ara-leu) 7697 galK rpsL (Str^R)</i> <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Heidelberg

2.1.7 Plasmide (die Plasmidkarten sind im Anhang Kapitel 8.1 aufgeführt)

Name	Beschreibung	Referenz
pEF-IRESp	Eukaryotischer Expressionsvektor, Kassettenvektor für alle verwendeten C46- und CCR5-Multimere	(Hobbs et al. 1998)
pCMV-dR8.91 (M334)	Expressionsplasmid für die HIV-1 Proteine Gag-pro-pol zur lentiviralen Verpackung, Rev (publizierte Bezeichnung: pCMV-ΔR9)	(Naldini et al. 1996)

M386	Lentiviraler Transfektor mit Luziferase als Markergen. Vektor leitet sich von pHR'SIN-cPPT-SEW ab	(Demaison et al. 2002)
HIV JR-FL Env (M118)	Expressionsplasmid für das Hüllprotein JRFL Env	(Karlsson et al. 1996){(Choe et al. 1996)}
HIV 117.III Env	Expressionsplasmid für das Hüllprotein 117.II Env	{{(Rubsamen-Waigmann et al. 1989)}
HIV 89.6 (M417)	Expressionsplasmid für das Hüllprotein 89.6 Env	B. Schnierle, Paul-Ehrlich-Institut, Langen
HIV HXB2 Env (M104)	Expressionsplasmid für das Hüllprotein HIV HXB2 Env	G. Melikyan, Chicago, IL, USA
HIV Ba_L-wt Env (M749)	Expressionsplasmid für das Hüllprotein HIV Ba_L_wt	(Lohrengel et al. 2005)
LCMV Env (M108)	Expressionsplasmid für das Hüllprotein LCMV-GP WE (HPI) mit CMV-Promotor und β -Globin Intron	(Beyer et al. 2001)

2.1.8 Enzyme und DNA Größenstandards

Enzym	Hersteller
BglII	New England BioLabs, Frankfurt am Main
BspEI	New England BioLabs, Frankfurt am Main
EcoRI	New England BioLabs, Frankfurt am Main
T4 DNA-Ligase & 10x Ligasepuffer	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Alkalische Garnelen Phosphatase & 10x Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
100 bp Größenstandard	New England BioLabs, Frankfurt am Main
1 kb Größenstandard	New England BioLabs, Frankfurt am Main

2.1.9 Oligonukleotide und Primer

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' \rightarrow 3'
pEF-IRES Primer	Sequenzierung	5'-ACT CCC AGT TCA ATT ACA G-3'

Linker (SG4S)2	Ligation	5'-CCG GAG GCG GTG GAA GCT CCG GTG GAG GAG GAG CG-3' 3'-CCG GCG CTC CCT CCT CCA CCG GAG CTT CCA CCG CCT 5'
C-myc-BspEI	Ligation	5'-CCG GAG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TAG-3' 3'-CCG GCT AGA TCC TCT TCT GAG ATG AGT TTT TGT TCT-5'
ECL1	Ligation	5' GAT CTT GGA TGG CCG CCG CCC AGT GGG ACT TCG GAA ACA CCA TGT GCT 3' 3' CCG GAG CAC ATG GTG TTT CCG AAG TCC CAC TGG GCG GCG GCC ATC CAA 5'
ECL2	Ligation	5' GAT CTT GGA TGA GAT CTC AAA AAG AAG GTC TTC ATT ACA CCT GCT CTT CTC ATT TTC CAT ACA GTC AGT ATC AAT TCT GGA AGA ATT TCC AGA CAT TAA AGT 3' 3' CCG GA CTT TAA TGT CTC GAA ATT CTT CCA GAA TTG ATA CTG ACT GTA TGG AAA ATG AGA AGA GCA GGT GTA ATG AAG ACC TTC TTT TTG AGA TCT CAT CCA A 5'
ECL2 SDM C→A	Ligation	5' GAT CTT GGA TGA GAT CTC AAA AAG AAG GTC TTC ATT ACA CCT CTT CTT CTC ATT TTC CAT ACA GTC AGT ATC AAT TCT GGA AGA ATT TCC AGA CAT TAA AGT 3' 3' CCG GAC TTT AAT GTC TCG AAA TTC TTC CAG AAT TGA TAC TGA CTG TAT GGA AAA TGA GAA GAA GAG GTG TAA TGA AGA CCT TCT TTT TGA GAT CTC ATC CAA 5'
ECL3	Ligation	5' GAT CTT GGA TGC AGG AGT TCT TCG GCC TGA ACA ACT GCT CCT CCT CCA ACA GGC TGG ACC AGG CCT 3' 3' CCG GAG GCC TGG TCC AGC CTG TTG GAG GAG CAG TTG TTC AGG CCG AAG AAC TCC TGC ATC CAA 5'
3A9-L-5C7	Ligation	5' GAT CTT GGA TGT CCC CCA TCT ACG ACT CCG GCT CCG GCT CCG GCT GGG ACT TCG GCT CTG GAT CTG GAT CTG GAA GGC TGG ACT 3' 3' CCG GAG TCC AGC CTT CCA GAT CCA GAT CCA GAT CCG AAG TCC CAC GGG GAG CCG GAG CCG GAG TCG TAG ATG GGG GAC ATC CAA 5'
N-term. CCR5 (NTC)	Ligation	5' GAT CTT GGA TGG ATT ATC AAG TGT CAA GTC CAA TCT ATG ACA TCA ATT ATT ATA CAT CGG AGT 3' 3' CCG GAC TCC GAT GTA TAA TTG ATG TCA TAG ATT GGA CTT GAC ACT TGA TAA TCC ATC CAA
pE51	Ligation	5' GAT CTT GGA TGG GAG ACT ACG CCG ACT ACG ACG GCG GCT ACT ACG ACA TGG ACT 3' 3' CCG GAG TCC ATG TCG TAG TAG CCG CCG TCG

		TAG TCG GCG TAG TCT CCC ATC CAA 5'
c-myc	Ligation	5' GAT CTG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TAT 3' 3' CCG GAT AGA TCC TCT TCT GAG ATG AGT TTT TGT TCA 5'
XD3	Ligation	5' GAT CTT GGA TGC ACA AGC AGC CCT GGT ACG ACT ACT GGC TGC TGA GGT 3' 3' CCG ACC TCA GCA GCC AGT AGT CGT ACC AGG GCT GCT TGT GCA TCC AA 5'

2.1.10 Klonierte Plasmide

Plasmidbezeichnung	Insert	Referenz
pEF-IRESp XD SP-L-C4bp α 364H(SG4S)3	C46 als Insert, 3-fach Linker SG4S, C4bp als Multimerisierungsdomäne, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp XD SP-L-C4bp α 364H(SG4S)5	C46 als Insert, 5-fach Linker SG4S, C4bp als Multimerisierungsdomäne, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp XD SP-L-C4bp α 364H(SG4S)7	C46 als Insert, 7-fach Linker SG4S, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp XD SP-L-C4bp α 364H(SG4S)9	C46 als Insert, 9-fach Linker SG4S, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp XD SP-L-C4bp α 364H(SG4S)11	C46 als Insert, 11-fach Linker SG4S, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp AH SP-5L-C4bp α	humanes c-myc als Insert, 5-Linker, C4bp als Multimerisierungsdomäne, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp AH SP-3A9-L-5C75L-myc-5L-C4bp α	CCR5-Mimotope als Insert, humane c-myc-Domäne, 5-Linker, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp AH SP-N-term. CCR5-myc-5L-C4bp α	N-Terminus von CCR5 als Insert, humane c-myc-Domäne, 5-Linker, His-Tag, Multimer („NTC“)	A. Hüther
pEF-IRESp AH SP-CCR5/ECL-1-myc-5L-C4bp α	Extrazelluläre loop 1 von CCR5 als Insert, humane c-myc-Domäne, 5-Linker, C4bp als Multimerisierungsdomäne, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp AH SP-CCR5/ECL-2-myc-5L-C4bp α	Extrazelluläre loop 2 von CCR5 als Insert, humane c-myc-Domäne, 5-Linker, C4bp als Multimerisierungsdomäne, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp AH SP-CCR5/ECL-2-SDM-myc-5L-C4bp α	Extrazelluläre loop 2 von CCR5 als Insert mit mutiertem Cystein \rightarrow Alanin, humane c-myc-Domäne, 5-Linker, C4bp als Multimerisierungsdomäne, His-Tag, Multimer	A. Hüther

pEF-IRESp AH SP-CCR5/ECL-3-myc-5L-C4bp α	Extrazelluläre loop 3 von CCR5 als Insert, humane c-myc-Domäne, 5-Linker, C4bp als Multimerisierungsdomäne, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp AH SP- Δ E51-myc-5L-C4bp α	CDR3 Region des mABs E51 (CD4i-Epitop) als Insert, humane c-myc-Domäne, 5-Linker, C4bp als Multimerisierungsdomäne, His-Tag, Multimer	A. Hüther
pEF-IRESp AH SP-DE51-5L-C4bp α C1GC2G	CDR3 Region des mABs E51 (CD4i-Epitop) als Insert, humane c-myc-Domäne, 5-Linker, C4bp mit 2 mutierten Cysteinen \rightarrow Glycin, His-Tag, Monomer	A. Hüther

2.1.11 Zellkultur-Medien und Zusätze

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
0,25%Trypsin/1mMEDTA-Lösung	Invitrogen, Eggenstein
DMEM	Bio Whittaker, Verviers, Belgium
DMEM supplementiert (Kulturmedium)	DMEM 10% FCS 5% Glutamin 1% Pen/Strep
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH, South America
Glutamin-Lösung	Bio Whittaker, Verviers, Belgium
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Bio Whittaker, Verviers, Belgium

2.1.12 Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz	Medium
293T	Humane embryonale Nieren-Zellen, enthalten das <i>large T cell</i> T-Antigen aus SV40	ATCC Nr. CRL 11268	DMEM-supplementiert
U87CD4 CCR5	Humane Glioblastoma-Zellen (Astroglom) mit CD4 CCR5 Genen transfiziert unter Kontrolle des MLV Promotors	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Katalog Nummer: 4035 Ndung'u 2001	DMEM-supplementiert 1 μ g/ml Puromycin, 300 μ g/ml G418

U87CD4 CXCR4	Humane Glioblastoma-Zellen (Astroglom) mit CD4 CXCR4 Genen transfiziert unter Kontrolle des MLV Promotors	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Katalog Nummer: 4035	DMEM-supplementiert 1µg/ml Puromycin, 300 µg/ml G418
--------------	---	---	---

2.1.13 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Äkta FPLC	GE Healthcare, München
Analysenwaage 420-42	Kern, Albstadt
Analysenwaage R160 P	Sartorius, Göttingen
Autoklav HAST 4-5-6 E	Zirbus Technology, Bad Grund
Brutschrank Function Line B 12	Heraeus, Hanau
Brutschrank für Zellkulturen, Cytoperm	Heraeus, Hanau
DNA-Elektrophorese-Apparatur Pac 200 + 300	BioRad, München
DNA-Sequenzierungen, 3100-Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystem, Weiterstadt
Elektriphoresis Power Supply St 606 GIBCO BRL	Gibco, Los Angeles USA
Gefrierschrank	Liebherr, Biberach
Gel Doc 2000	BioRad, München
Heizblock DRI-BLOCK DB 2D	Techne, England
Kühlschrank	Liebherr, Biberach
Kühlzentrifuge Avanti J20	Beckmann, München
Kühlzentrifuge Biofuge17RS	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Rottina 48R	Hettich, Tuttlingen
Lichtmikroskop	Leica, Bensheim
Magnetischer Halter MPC	Dynal, Hamburg
Magnetrührer	IKA Werke, Staufen
Nano Drop ND-1000 Spektrometer	Wilmington, USA
pH-Meter HI 9321	Hanna Instruments, Kehl
Photometer SmartSpec™ 3000	BioRad, München

Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetboy accu	Integra Biosciences, Fernwald
Pump P-1, LKB Pump P-500, Rec 2	GE Healthcare, München
Röntgenfilmentwickler Optimax Typ TR	Schroeder und Henke, Wiesloch
Schüttelinkubator TH 25 swip	Edmund Bühler, Tübingen
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Nürnberg
SDS-PAGE-und Westernblot-Apparatur für Proteingele, mini Protean II	BioRad, München
Spannungsquelle Power Pac 1000	BioRad, München
Speed Vac Plus SC 110A	Savant, Ramsey USA
Sterilbank für Zellkulturen, Microflow	Nunc, Wiesbaden Biebrich
Sterilbank Lamin Air	Holten, Allerod (DK)
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich Moco 20, Schweiz
UV-Transilluminator, Gel Doc 2000	BioRad, München
Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellzählgerät (Zellkultur)	Casy, Reutlingen

2.1.14 Labormaterialien, Verbrauchsmittel

Labormaterialien	Hersteller
0,2ml Reaktionsgefäße 1,5ml Reaktionsgefäße 2,0ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnbrecht
10µl Pipettenspitzen 200µl Pipettenspitzen 1000µl Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
10µl Safetytips 200µl Safetytips 1000µl Safetytips	Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag
14ml Reaktionsröhrchen	BD Falcon, Heidelberg

15ml Reaktionsröhrchen 50ml Reaktionsröhrchen	
250ml Reaktionsröhrchen	Costar, Corning, NY, USA
5ml Pipetten 10ml Pipetten 25 ml Pipetten	Costar, Corning, NY, USA
5ml Spritzen 10ml Spritzen	Medox (Codan/Dahlhausen/Omnifix)
Amicon Ultra 15 50 kDa	Millipore, Bedford, USA
Amicon Ultra 4 50 kDa	Millipore, Bedford, USA
Dialyse-Kassette	Pierce, Rockford, USA
Dialyse-Schlauch	Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA
ELISA-96-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen
Filtereinheiten (\varnothing 0,45 μ m)	Millipore, Eschborn
Fotofilm Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
His-Trap FF Ni-Sepharose 1 ml Säule	GE Healthcare, München
Kryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kulturflaschen	Becton-Dickson, Heidelberg
Kulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Latexhandschuhe, Gentle Skin, Größe L	Meditrade, Kiefersfelden
Pasteurpipetten	DrakeMedox, Vancouver, Kanada
Pipettenspitzen 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Greiner, Frickenhausen
Skalpelle	Swann-Morton, Sheffield, England
Sterilfilter low binding protein (\varnothing 0,22 μ m)	Millipore, Eschborn
TC-96-Loch-Platten	Costar, Corning NY, USA
Wester Blot psQ Transfer Membran	Millipore, Eschborn
Whatmanpaper	Schleicher-Schuell Bioscience, Dassel

2.1.15 Kits

Kit	Hersteller
ECL-Plus Western Blotting Detection Kit	Amersham Bioscience, Little Chalfont, England
Gel Extraktion/ PCR Cleaning Kit	Macherey Nagel, Düren
Gel Extraktion/PCR Clean up, Nucleo Spin Extract 2	Macherey Nagel, Düren
Plasmid Maxi Prep, Nucleo Bond	Macherey Nagel, Düren
Plasmid Mini Prep peQlab Gold	peQlab, Erlangen

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien und DNA

3.1.1 Analytische Plasmidpräparation aus *E. coli* (Minipräp)

Es wurden jeweils 5 ml LB Medium mit einer *E. coli* Kolonie mit dem entsprechenden Plasmid angeimpft und bei 37°C schüttelnd ca. 6 Stunden in Anwesenheit von Puromycin (100µg/ml) inkubiert. Die Plasmidpräparation aus dieser Flüssigkultur erfolgte mit dem Minipräp Kit (Macherey & Nagel).

3.1.2 Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli* (Maxipräp)

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden 250 ml LB Medium mit ca. 200 µl einer Flüssigkultur *E.coli* angeimpft und für ca. 12 Stunden über Nacht inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem Maxipräp Kit. Um das Insert zu überprüfen, wurde nach der Plasmidpräparation ein Restriktionsverdau durchgeführt.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmungen der isolierten DNA-Proben erfolgten mit dem NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer. Für eine Messung genügt bereits 1 µl einer Lösung. Die DNA-Konzentration wird durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 280 nm bestimmt.

3.1.4 Analyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmiden und DNA-Fragmenten wurden TypII Restriktionsendonukleasen verwendet, die DNA an spezifischen, meist 4-8 bp langen Erkennungssequenzen schneiden. Es wurden 5 Units der Restriktionsendonukleasen zu 500 ng DNA zugegeben. Der Verdau erfolgte

etwa 1h und wurde zur Kontrolle auf erfolgreiche Ligation von DNA-Fragmenten mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 3.1.6).

3.1.5 Hybridisierung synthetisch hergestellter DNA-Fragmente

Die in dieser Arbeit verwendeten CCR5-Inserts entstanden durch Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge. Zur Hybridisierung wurden die Oligonukleotide im äquimolaren Verhältnis zusammengegeben (je 500 pmol), auf 100°C erhitzt und anschliessend in 10°C Schritten auf Raumtemperatur im PCR-Cycler abgekühlt. Die Hybridisierung konnte mit Hilfe eines 2-4%igen Agarosegels überprüft werden. Die hybridisierten Fragmente wurden anschliessend in den geschnittenen und dephosphorylierten Kassettenvektor ligiert.

3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophorese Systemen. Dabei variierte die Gelkonzentration von 1% bei großen Fragmenten bis zu 4% bei kleinen Fragmenten. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE-Puffer eingesetzt. Die Agarose wurde mit dem Puffer versetzt und in der Mikrowelle gelöst. Dann wurde der abgekühlten, aber noch flüssigen Agaroselösung Ethidiumbromid [0.5 g/l] zugesetzt und das Gel gegossen.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Loadingdye versetzt. Die aufgetragene Menge richtete sich nach DNA-Größe und -Konzentration und betrug 1-10 µl (analytische Gele) bzw. 20-50 µl (präparative Gele). Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 V. Die Sichtbarmachung der Ethidiumbromid-markierten DNA-Banden erfolgte durch UV-Licht am UV-Präparationstisch, danach konnte das Gel photographiert und als JPEG-Datei gespeichert werden (Gel-Doc-System).

3.1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt. Im langwelligen UV-Licht wurde das entsprechende Fragment aus dem Gel herausgeschnitten. Unter Anwendung des Protokolls aus dem Macherey & Nagel Gel-Extraction Kit konnte die DNA aus dem Agarosegel isoliert werden.

3.1.8 Ligation

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Das Verhältnis Vektor- zu Fragment-DNA richtete sich nach den abgeschätzten Mengen und betrug ca. 1:2, 1:3, 1:6. Vektor- und Fragment-DNA wurden mit sterilem H₂O bidest versetzt sowie Zugabe von 2µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase („sticky ends“). Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte 10 min bei 65°C.

3.1.9 Sequenzierung, Verdau und Dephosphorylierung von Plasmiden

Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch die erforderlichen Restriktionsenzyme geschnitten. Um die Selbstligation der linearisierten Vektor-DNA zu verhindern, wurde diese direkt nach der Restriktionsspaltung mit antarktischer alkalischer Phosphatase nach Herstellerangaben behandelt. Die AP wurde anschliessend durch Erhitzen bei 65°C 10 min. inaktiviert.

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte durch die Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977) um eine korrekte Insertion in den Vektor zu bestätigen. Dabei werden während der Sequenzierreaktion fluoreszenzmarkierte Dideoxynucleotide (ddNTPs) zufällig in den DNA-Strang eingebaut, dies führt zum Abbruch der Reaktion. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem 3100 Avant *Genetic Analyzer* von Frau Margot Landersz (AG Dietrich) am Institut durchgeführt.

3.1.10 Transformation in kompetente TOP10 Zellen

Die Einschleusung fremder DNA in Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. *E. coli*-Zellen können nur dann DNA aus dem umgebenden Medium aufnehmen, wenn sie zuvor darauf vorbereitet, d.h. kompetent gemacht, wurden. 50 µl kompetente Zellen (TOP10) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 ng Vektor-DNA bzw. der Hälfte (10 µl) des Ligationsansatzes sowie 1 µl 1M β-Mercapto-Ethanol gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 1 Minute bei 42 °C. Nach weiteren 3 Minuten auf Eis wurden 140 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz 30-60 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer Ampicillin-Agarplatte, die 200 µg/ml Ampicillin enthielt, ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Mit den erhaltenen Kolonien wurden entweder 250 ml für einen Maxi- oder für einen Mini-Ansatz 5 ml LB-Medium (200 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Diese Kultur wurde sowohl zum Anlegen einer Glycerinkultur als auch für die Plasmidpräparation verwendet. Aus den einzelnen Kolonien der transformierten Ligationsansätze wurde eine ÜNK angeimpft und eine analytische Plasmidpräparation, wie in Kapitel 3.1.2. beschrieben, durchgeführt.

3.1.11 *E. coli* Kryokulturen

Vorkulturen mit einer OD größer als 1,0 in LB Medium wurden mit 0,25 Volumen 80 % Glycerin versetzt und bei –80 °C aufbewahrt. Aus der Glycerinkultur kann direkt eine Kultur zur Präparation von Plasmid-DNA angeimpft werden.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Dazu wurde ein diskontinuierliches Gel verwendet. Dies bestand aus einem Sammelgel (4%) und einem Trenngel (8%).

Tabelle 3.1 Zusammensetzung für SDS-Polyacrylamidgele

Stammlösung	Sammelgel (4%)	Trenngel (8%)
30% (w/v) Acrylamid/ 0,8% (w/v) N,N'-Bisacrylamid	650 µl	3,52 ml
Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris)	1,05 ml	-----
Trenngel-Puffer (1,5M Tris)	-----	3,35 ml
Aqua dest.	2,5 ml	6,5 ml
10% Amoniumsulfat (APS #0)	25 µl	42 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	8 µl	12 µl

Es wurden alle Lösungen in einem 15 ml Falcon tube zusammen pipettiert, das APS und das TEMED zur Polymerisation hinzugefügt. Die Trenngelmischung wurde dann vorsichtig zwischen die Glasplatten der Gießapparatur gegossen und zum Luftabschluß mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Mit einem Kamm wurden im Sammelgel zehn Auftragsaschen für die Proben geformt. Die Elektrophoresekammer wurde zusammengesetzt und mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 100°C zur Denaturierung der Proteine aufgeköcht. Pro Tasche wurden zwischen 1 und 20µl Probe in 7 µl Auftragspuffer aufgetragen. Unter denaturierenden Bedingungen wurden die Proben zusätzlich mit β-Mercapto-Ethanol versetzt (reduzierte Bedingungen = 600 mM β-ME) um die Disulfidbrücken der Multimere zu reduzieren. Eine schrittweise Reduktion der Multimere erfolgte unter Verwendung von 0,1-600 mM β-ME im Ladepuffer. Dann wurde je eine Bahn des jeweiligen Polyacrylamidgels mit dem Molekulargewichtsmarker (Rainbow-Dye, Biorad) beladen. Die Elektrophorese wurde bei 56 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

3.2.2 Western-Blotting

Beim Western-Blotting werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Millipore) zur nachfolgenden Immundetektion überführt. Das Blotting wurde im Tank-Blot-Verfahren durchgeführt. Etwa 30 min vor Abschluss der SDS-PAGE wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert und danach in Transferpuffer äquilibriert. Das Blot-Sandwich wurde luftblasenfrei nach Beendigung der Gelelektrophorese zusammengesetzt, wobei die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode gerichtet war. Der Transfer wurde für 1 h bei einer konstanten Spannung von 110 V durchgeführt.

3.2.3 Immundetektion durch Fluoreszenz

Die Membran wurde zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 1 h bei Raumtemperatur mit Blocking-Puffer (5% Milchpulver, PBS) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper lichtgeschützt für 1 h bei Raumtemperatur. Der primäre Antikörper (α -His-IRDye 800), welcher gegen das Zielprotein gerichtet und direkt mit dem IRDye 800 gekoppelt war, wurde in Blockingpuffer mit 0,1% Tween entsprechend den Herstellerangaben 1:10000 verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1% Tween für 10 min und einmaligem Waschen mit PBS wurde der Farbstoff-gekoppelte Antikörper mit dem „Odyssey Infrared Imaging System®“ detektiert.

Mit einem speziellen lasergestützten Detektionssystem wurde der am Antikörper gebundene IRDye 800 detektiert ($\lambda = 800\text{nm}$) und mit einer entsprechenden Software nach Herstellerangaben bearbeitet. Durch dieses Verfahren konnte sowohl die Proteinbande als auch ihre Intensität bestimmt werden.

3.2.4 Immundetektion durch Chemolumineszenz

Die sekundären Antikörper sind mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert. Bei Zugabe geeigneter Substrate bildet das Enzym ein Licht-emittierendes Produkt, das am Ort seiner

Entstehung Licht ausstrahlt (Chemilumineszenz). Für die Chemilumineszenz-Reaktion wurde das ECL Western-Blot Detektion-System verwendet. Die ECL Western Blot-Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 5 min auf die PVDF-Membran gegeben (1 ml/Proteinmembran). Die Membran wurde anschließend in Klarsichtfolie verpackt und in eine Röntgenfilm-Kassette mit einem Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gelegt. Der Film wurde 0,5-60 min belichtet und danach in einer Curix 160-Apparatur (AGFA, Köln) entwickelt.

3.2.5 Coomassiegel-Färbung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für jeweils 3x 10 Minuten in Aqua dest. geschüttelt und anschliessend für 1h in der Färbelösung (Brilliant Blue-Kit Biorad) inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wurde durch Schütteln des Gels für mindestens 2h in H₂O entfernt, welches etwa alle 30 min gewechselt wurde. Das Gel wurde anschließend in eine Luftdicht-abgeschlossene Zellulosemembran eingespannt und unter Vakuum getrocknet.

3.2.6 Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Gel Doc System

Zur Protein-Konzentrationsbestimmung wurde die TIF-Bilddatei des Odyssey-Systems im *Gel-Doc Software-System* aufgerufen. Mit Hilfe bekannter Proteinstandards in steigender Konzentration (10-100 ng 364H-7L oder 364H-9L, 364H-11L) konnte mittels *Gel-Doc System* eine Eichkurve erstellt werden. Anhand dieser Kurve konnten die Konzentrationen der zu ermittelnden Proben bestimmt werden.

3.2.7 Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-Peptiden

Die Reinigung der His6-tag-CCR5-Fusions-Multimere erfolgte mittels einer HisTrapFF-TM - Säule (1 ml, Amersham GE Healthcare), die in die Chromatographie-Apparatur (Aekta Prime,

Amersham GE Healthcare) bei 4°C (Coldlab) eingespannt wurde. Die Säule wurde zuerst mit ca. 15 ml Äquilibrationpuffer gewaschen. Dann wurden ca. 300-1000 ml des Zellkulturüberstandes mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen (Programm „AlexHisTrap“). Danach wurde die Säule mit ca. 15 ml Äquilibrationpuffer gewaschen. Die gebundenen Multimere wurden dann in einem linearen Gradient von 1-500 nM Imidazol (Elutionspuffer) eluiert und in 2 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung und Western-Blot-Analyse auf Reinheit und Identität des Zielproteins getestet.

3.2.8 Ultrafiltration von His-Peptiden

Eine geeignete Methode für das schnelle Konzentrieren von Proteinlösungen stellt die Ultrafiltration dar. Hierzu wurden Ultrafiltrationseinheiten der Firma Millipore mit einem MWCO von 50 000 Da verwendet. Die Zentrifugation der vereinigten Eluatfraktionen der Multimere erfolgte bei 4000 rpm und 4°C. Dabei wurde gleichzeitig der Imidazol-enthaltende Eluatpuffer mit PBS ersetzt, was einer Dialyse entsprach.

3.2.9 Quantifizierung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Aufreinigung erfolgte mittels Western Blot und geeigneten C46-Standard-Multimeren. Dazu wurde ein WB, der mit dem Odyssey System entwickelt und dort als Bilddatei gespeichert wurde, mit dem „Quantity One“-Programm des GelDoc-Software-Systems aufgerufen. Unterschiedliche aber bekannte Konzentrationen eines 364H-7L oder 364H-9L Proteinstandards dienten als Konzentrationsabgleich. Mit diesen konnte im Gel-Doc System eine Eichkurve erstellt werden, mit dessen Hilfe die Konzentration der zu quantifizierenden CCR5-Multimerbanden evaluiert wurde.

3.2.10 2D7-ELISA mit Multimeren

Zur weiteren Charakterisierung der Multimere wurde ihre Bindung an monoklonale CCR5-Antikörper untersucht. Dazu wurden Multimerüberstände in Triplikaten mittels ELISA getestet. Eine 96-well ELISA-Platte wurde entweder mit α -His- oder α -myc-Antikörper über Nacht in PBS beschichtet. Die Platte wurde gewaschen um überschüssige Antikörper zu entfernen, danach erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit Multimer-Überständen bei 37°C. Nach einem erneuten Waschschrift wurde der Primärantikörper zugegeben (2D7 oder α -His) und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Der ELISA wurde dann durch Zugabe des Substrates OPD entwickelt und die Absorption konnte bei einer Wellenlänge von 620 nm im ELISA Reader gemessen werden. Als Ausschlusswert („cut-off“) wurde die 3-fache OD des Mittelwertes der Negativkontrolle (Überstand von nicht-transfizierten 293T Zellen) verwendet.

3.2.11 HIV-1 ADA gp140-ELISA mit Multimeren

Zur Überprüfung einer eventuellen Bindung des pE51 Multimers an CD4i-Epitope in gp120 wurde ein ELISA mit trimerem ADA gp140 Env durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine ELISA-Platte mit α -His (50 ng/well) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platte wurde gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschliessend erfolgte eine 2-stündige Inkubation mit den aufgereinigten pE51-Multimeren (50-700 ng/well) bei 37°C. Parallel dazu wurde trimeres ADA gp140 Env aus CHO-Zellkulturüberstand in einer 1:20 Verdünnung mit PBS/0,1%BSA zusammen mit löslichem CD4 (40 nM) bei 37°C vorinkubiert. Als Kontrolle wurde CHO-Überstand nicht-transfizierter Zellen analog zu den Env-Partikeln mit CD4 inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die mit CD4-inkubierten Env-Partikel bzw. Env-Partikel ohne CD4, bzw. der CHO-Überstand mit und ohne CD4 zu den pE51-Multimeren auf der ELISA-Platte gegeben. Nach 2-stündiger Inkubation und einem erneutem Waschschrift (PBS/0,1% BSA) wurde HIV-1-positives humanes Serum in einer 1:4000 Verdünnung mit PBS/0,1% BSA

zugegeben (1h/37°C). Die Detektion erfolgte mit einem HRP-gekoppelten α -Human Sekundärantikörper, die Entwicklung wurde bereits in 3.2.10 beschrieben.

3.2.12 Immunpräzipitation von Multimeren mit 2D7

Zur Immunpräzipitation des Multimers ECL2-SDM wurden zunächst α -Maus-Beads mit dem Antikörper 2D7 (1 μ g mAB/10 μ l Beads) in einem Volumen von 1 ml PBS/0,1%BSA über Nacht auf dem Rotator inkubiert (4°C). Am nächsten Morgen wurden die Beads abzentrifugiert und mit jeweils 10 ml PBS/0,1% BSA dreimal gewaschen (5 min bei 2000 rpm). Anschliessend wurden 15 ml unaufgereinigter Zellkulturüberstand des ECL2-SDM-Multimers über Nacht mit den Beads auf dem Rotator inkubiert. Als Kontrollen dienten Überstände von untransfizierten 293T Zellen sowie der Überstand des NTC-Multimers. Die Beads wurden erneut jeweils dreimal mit 10 ml PBS/0,1% BSA gewaschen und anschliessend in 2 Fraktionen aufgeteilt. Eine Fraktion wurde mit reduziertem Ladepuffer aufgeköcht, die andere mit nicht-reduziertem. Anschliessend wurden die Beads kurz abzentrifugiert und der Überstand auf ein PAA-Gel aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte über einen Western Blot mit α -His (siehe 3.2.2, 3.2.3).

3.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Materialien wurden, wenn sie nicht steril verpackt waren, autoklaviert. Lösungen und Puffer wurden vor ihrem Einsatz sterilfiltriert. Handschuhe wurden vor den Arbeiten unter der Sicherheitswerkbank mit 70% Ethanol desinfiziert. Alle Medien und Lösungen wurden vor ihrem Einsatz bei 4°C gelagert.

3.3.1 Kultur und Passage von adhärenenten Zelllinien

Zur Kultur wurden die humanen Zellkulturlinien 293T und U87 CD4 CCR5 bzw. U87 CD4 CXCR4 verwendet. Alle Zelllinien wurden in 175 cm² bzw. 375 cm² Kulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit vermehrt und bei 80%-iger Konfluenz entsprechend der Teilungsraten 1:5 bis 1:65 gesplittet. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 10 ml warmem PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin benetzt. Überschüssiges Trypsin wurde entfernt und die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das vollständige Ablösen der behandelten Zellen wurde im Mikroskop überprüft. Anschließend wurden die Zellen in das zugehörige Kulturmedium aufgenommen und im entsprechenden Volumenverhältnis in neue Zellkulturflaschen transferiert.

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde quantitativ mit dem CASY-Zellzähler in Form einer Dreifachmessung bestimmt. Dazu wurden 100 µl trypsinierter, homogener resuspendierter Zellen in ein kleines Gefäß mit Casytone-Puffer pipettiert. Das Gefäß wurde dann in die CASY-Apparatur gestellt und die Zellzahl automatisch bestimmt. Das Messprinzip basiert auf der Messung des elektrischen Widerstandes. Da lebende Zellen einen höheren Widerstand als tote Zellen bieten, kann mit dem spezifischen Widerstand einer Zelllinie die Zellzahl bestimmt werden.

3.3.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen analog der Passagierung (s. Kap. 3.3.1) trypsiniert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 200 x g wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 10% DMSO/FCS zur Kryokonservierung resuspendiert und in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt (2-3x10⁶ Zellen pro Kryoröhrchen). Die Kryoröhrchen wurden zunächst in einer dickwandigen Styroporbox auf -80°C heruntergekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Nach 48 Stunden wurden die

Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196°C) umgelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad gegeben und bei 37°C vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml warmes Kulturmedium langsam aufgenommen und 5 min bei 200 x g sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in Kulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versorgt.

3.3.4 Transfektion eukaryotischer Zelllinien

293T Zellen wurden 20 bis 24 Stunden vor der Transfektion mit einer Aussaatdichte von 6×10^6 Zellen pro cm^2 (humane Endothelzellen) in Zellkulturschale a 10 cm Durchmesser ausgesät, in 12 ml DME-Medium pro Kulturschale kultiviert und am folgenden Tag bei 50-60% Konfluenz transfiziert. Alle Transfektionen wurden in 10 cm Zell-Kulturschalen durchgeführt. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich jeweils auf eine Schale. Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurden 30 μg Plasmid-DNA mit Auqa dest. zu einem Volumen von 500 μl in einem 15 ml Reaktionsgefäß versetzt und kurz mit einem Vortexer gemischt. Nach Zugabe von 50 μl Calcium-Chlorid wurde der Ansatz noch einmal gemischt. Anschliessend wurden 500 μl HEPES Puffer tropfenweise und durch ständiges vortexen zugegeben und 20 min zur Komplexbildung bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubation wurde das Kulturmedium der Zellen mit 10 μl Chloroquin (10 M), zur Erhöhung der Transfektionseffizienz supplementiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz gleichmäßig auf die Zellen getropft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und mit 12 ml frischem, Puromycin-versetztem (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) DMEM Medium ersetzt und unter Standardbedingungen kultiviert.

3.3.5 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Zur Selektion transfizierter Zelllinien wurden 293T Zellen 3 Tage nach der Transfektion mit Puromycin-haltigem Medium (20 µg/ml) kultiviert. Der Mediumwechsel wurde in der ersten Woche jeden Tag durchgeführt um nicht transfizierte und somit sterbende Zellen zu entfernen. Nach etwa 3 Wochen waren die Zellen konfluent und die erste Selektion beendet. Mit Hilfe einer limitierenden Verdünnungsreihe wurden dann die selektierten Zellen in eine 96-well Platte transferiert, in der von Reihe zu Reihe die Zellzahl pro Vertiefung (*well*) abnahm bis theoretisch nur noch eine Zelle pro *well* kultiviert wurde. Die Zellkulturüberstände der Klone wurden nach etwa 3-4 Wochen auf Proteinexpression untersucht und anschliessend mit steigender Puromycinkonzentration weiter selektiert. Die Zellklone mit der besten Proteinexpression wurden zukünftig mit 80 µg/ml Puromycin-haltigem Medium kultiviert.

3.3.6 Herstellung von Zelllysaten

Um Proteine zu detektieren, die im Überstand nicht bzw. nur sehr schwach zu detektieren sind, wurden Zelllysate der jeweiligen 293T-Zellklone durchgeführt. Dazu wurde eine mittlere Flasche adhärenter 293T Zellen zunächst mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Die Zellen wurden in 15 ml PBS 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert, das PBS verworfen und das Pellett anschließend mit eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellett wurde dann in 1 ml eiskaltem Lysispuffer inklusive Protease-Inhibitoren suspendiert und 1/2h auf Eis gelagert. Dabei wurde das Pellett alle 5 Minuten zur Verstärkung der Zellyse gevortext. TritonX-100, welches im Lysispuffer enthalten ist, umlagert aufgrund seiner lipophilen Anteile die Proteine und solubilisiert diese wegen seiner hydrophilen Bestandteile in wässriger Lösung. Die Proteaseinhibitoren verhindern eine Degradierung der Proteine während der Prozedur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Zelllysate 10 min bei 13 000 rpm/4°C zentrifugiert um Zelldebris, Membranbestandteile und Organellen zu sedimentieren. Das klare Proteinhaltige Zelllysate im Überstand wurde dann in Aliquots a 15µl bei -20°C weggefroren.

3.3.7 Generierung von HIV-1 Pseudoviren mittels 3-Plasmid Transfektion

Um sogenannte HIV-1 Pseudoviren herzustellen, wurden 293T Zellen mittels Calcium-Phosphat-Methode (siehe 3.3.4) transient transfiziert. Für die Transfektion wurden gleichzeitig 3 Plasmide verwendet (freundlicherweise von der AG von Laer zur Verfügung gestellt, siehe Tabelle 3.2): Das *gagpol*-Expressionsplasmid, den Transfektor mit dem Luziferasegen und das HIV-1-Env Expressionsplasmid für die jeweiligen verschiedenen HIV-Envs (ein LCMV Env als Kontrolle). Die Inkubation der 293T Zellen mit den DNA-Präzipitaten erfolgte ca. 6-8h, danach wurde das Medium mit 12ml frischem Medium pro Platte ersetzt. Die Virushaltigen Überstände wurden nach 48h gesammelt, über einen 0,45µm Filter sterilfiltriert und bis zur Aufkonzentration bei 4°C gelagert.

Tabelle 3.2 Zusammensetzung des Transfektionsansatzes

	Lentivirale Vektoren	DNA-Menge/ H ₂ O
<i>Gagpol</i> -Expressionsplasmid	M334 (siehe Kapitel Material)	12,5 µg
Transfektorplasmid	M386 (siehe Kapitel Material)	7,5 µg
<i>Env</i> -Expressionsplasmid	HIV oder LCMV Env	1 µg
H ₂ O		Ad. 450 µl
CaCl ₂		50 µl
HEPES		500 µl

3.3.8 Konzentrieren von HIV-1 Pseudoviren

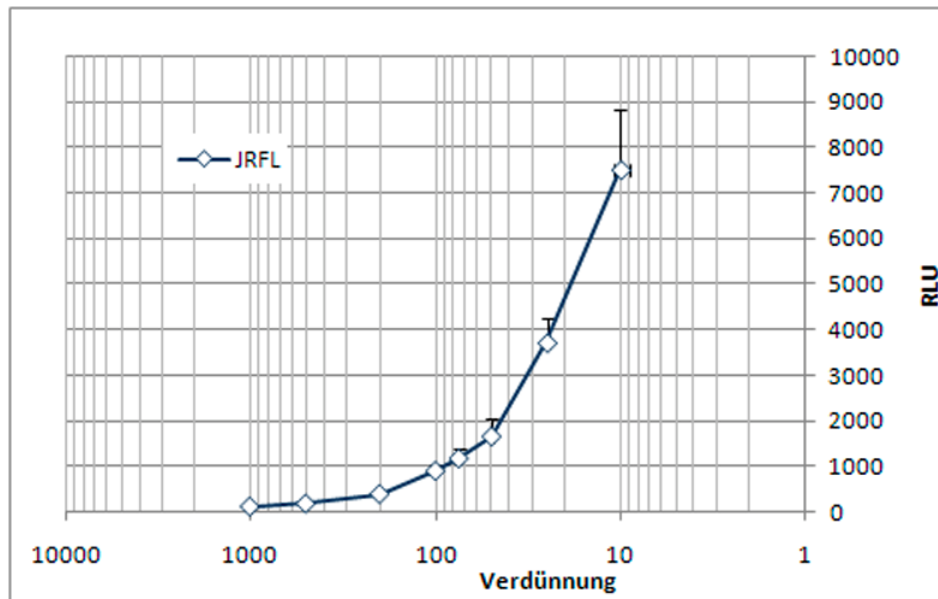
Die Konzentrierung der Virus-Überstände erfolgte per Ultrazentrifugation bei 25000 rpm. Dazu wurden jeweils 30 ml Überstand in UZ-Röhrchen aufgeteilt und diese mit 4 ml 20%iger Saccharose/PBS-Lösung vorsichtig unterschichtet. Die Zentrifugation erfolgte 2h bei 25000 rpm bei 4°C. Anschliessend wurde das Viruspellett in etwa 300-500 µl DMEM Medium aufgenommen und über Nacht bei 4°C auf dem Rollschüttler suspendiert. Die konzentrierten Virusstocks wurden dann aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.3.9 Titration retroviraler Zellkulturüberstände mittels Luziferase-Reporter-Gen-Assay

Die Virusstocks wurden auf adhärennten U87 CD4 CCR5 Zellen bzw. U87 CD4 CXCR4-Zellen titriert welche am Tag vor der Transduktion ausgesät wurden. Am darauffolgenden Tag wurde eine Verdünnungsreihe des Virusstocks von 1:10 bis 1:1000 hergestellt. Das Medium wurde abgenommen und mit frischem Medium der jeweiligen Virusverdünnung ersetzt. Die Zellkulturplatte wurde daraufhin 1h bei 2000 rpm bei 31°C zentrifugiert. Zwei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen mit Lysispuffer lysiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 100 µl PBS pro Vertiefung gewaschen. Nach vollständigem Absaugen des Puffers wurden pro Vertiefung 55 µl Lysispuffer zum Lysieren der Zellen verwendet. Nach 20 minütiger Inkubation bei 37°C wurden 50 µl des Lysates in eine weiße 96-well-Zellkulturplatte luftblasenfrei überführt. Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz wurde die relative Lichtintensität (RLU: *relative Light Units*) im Luminometer mit angeschlossener FB12 Sirius Software gemessen. Als Leerwert wurde der zur Lyse der transfizierten Zellen verwendete Puffer eingesetzt. Die Chemilumineszenz wurde durch automatische Injektion von 50 µl Luziferin-Reaktionsgemisch für 10 sec gemessen und der Messwert in RLU/s ausgegeben. Der gemessene RLU-Wert des Leerwertes wurde automatisch von den Messwerten der Proben abgezogen. Die Transduktionseffizienz der Pseudoviren wurde anhand der aus den RLU-Werten errechneten Kurve (Abb. 3.1) bestimmt. Jene Verdünnungen, bei welchen ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetztem Volumen und Luziferaseaktivität bestand, wurden für die Multimer/T20-Inhibitionsassays verwendet. Die dazu verwendete Formel war:

$$\text{Luziferaseaktivität/ml} = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{RLUs}$$

Ein Beispiel der Titration des R5-tropen Pseudovirus JRFL ist in der unteren Grafik dargestellt, demzufolge wurde eine JRFL-Virusstock-Verdünnung von 1:100 eingesetzt.



3.1 Titration retroviraler JR-FL Zellkulturüberstände auf U87 CD4 CCR5 Zellen. Die Zielzellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen Viruskonzentrat (1:10-1:1000) transduziert

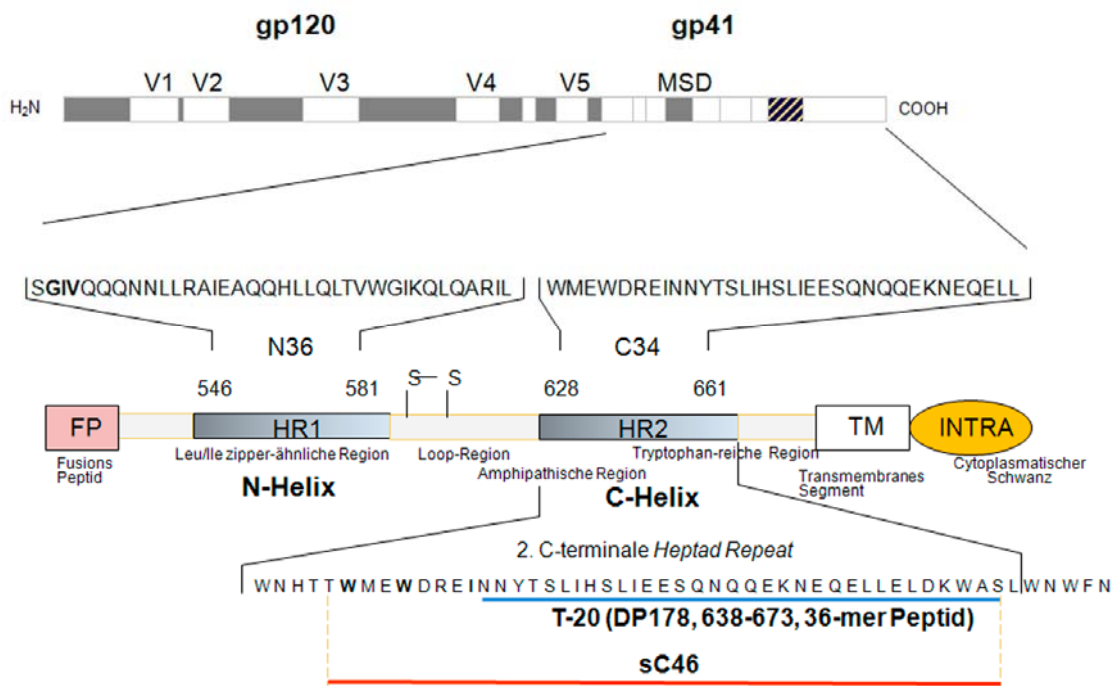
3.3.10 Multimer/T20 Inhibitionsassay

Die HIV-1 entry-hemmende Aktivität der Multimere wurde direkt auf den Zielzellen U87 CD4 CCR5 bzw. U87 CD4 CXCR4 bestimmt. Dazu wurden die Zellen in eine 96-well Platte ausgesät und am darauffolgenden Tag mit Virusstocks in Anwesenheit der Inhibitoren transduziert. Die Multimere, bzw. die Peptidkontrollen NTCp, E51p und T20 wurden zuvor mit DMEM in 96-well Platten verdünnt und mit dem entsprechen verdünnten Virusstock vorinkubiert. Hierbei wurde die Endkonzentration der Peptidmenge für das Gesamtvolumen, 40 $\mu\text{l/well}$, inklusive des Virusstocks berechnet, d.h. die 2-fache Verdünnung wurde mit einbezogen. Die Virus-Vorinkubation betrug $\frac{1}{2}$ h, anschliessend wurde die Peptid/Virus-Lösung (40 $\mu\text{l/well}$) mit Hilfe einer Mehrfachkanalpipette auf die zuvor Mediumfreien Zellen pipettiert. Die Zellkulturplatten wurden 1h bei 31°C und 2000 rpm zentrifugiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 2 Tagen im Brutschrank, danach wurden die Zellen mit etwa 80 μl PBS gewaschen und mit 55 μl Lysispuffer lysiert. Nach Überführung der Zelllysate in eine weiße ELISA-Platte, erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität durch Zugabe des Substrats Luziferin am Luminometer (siehe auch Kapitel 3.3.9).

4 Ergebnisse

4.1 Generierung rekombinanter Multimere

Um die Halbwertszeit kleiner Peptide und deren antivirales Potenzial zu erhöhen, wurde das fusionsinhibitorische Peptid C46 als Prototyp für die Multimerisierung mit dem C-terminalen C4bp ausgewählt. Das Peptid ist ebenso wie T20 aus der zweiten Heptad-Wiederholungsregion des viralen gp41 abgeleitet (Abb. 4.1) und zeichnet sich durch eine hohe antivirale Aktivität aus (Wild et al. 1995; Kilby 1999; Wild 2006). Dieses Projekt wurde von Xavier Dervillez in Kollaboration mit der AG von Laer initiiert und durchgeführt.



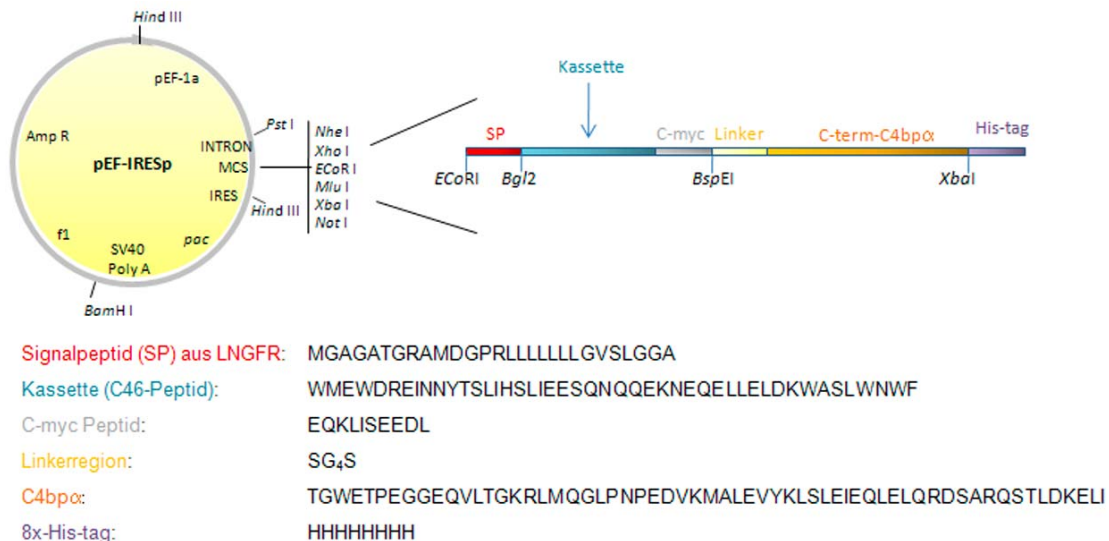
4.1 Das virale Glycoprotein gp41 im Detail. Die fusionsinhibitorischen Peptide T20 (blaue Linie) und C46 (rote Linie) leiten sich aus der zweiten Heptad-Repeat Region aus gp41 ab.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Linker-Varianten zwischen die C46-Domäne und die Multimerisierungsregion von C4bp unter Verwendung spezifischer Primer kloniert, welche die Flexibilität des Moleküls verbessern sollten. Des Weiteren wurde auch ein Multimer, welches statt C46 lediglich die humane c-myc-Sequenz trägt, als Kontrolle für die Inhibitionsversuche mit den Multimeren generiert. Aufbauend auf die C46-Multimere wurden

anschliessend CCR5-abgeleitete Multimere entwickelt und im Vergleich zu den C46-Multimeren getestet.

4.1.1 Klonierung von C46-Multimeren mit unterschiedlicher Linkerlänge

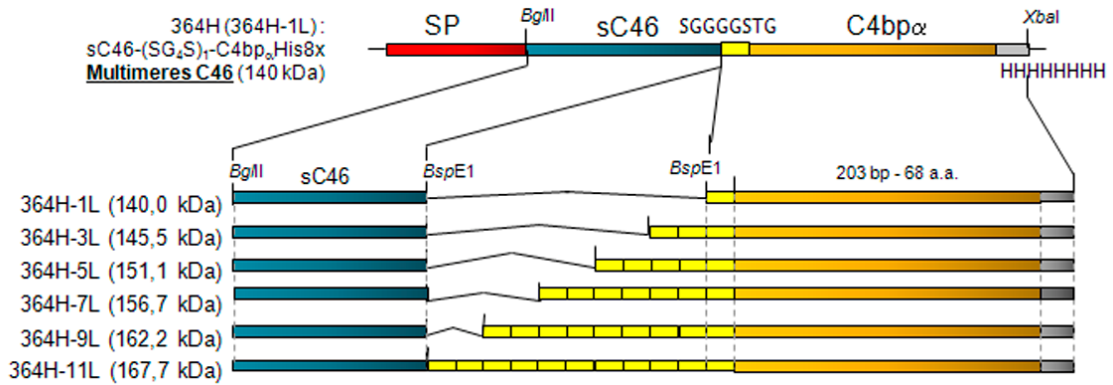
Alle C46-Konstrukte wurden in den bicystronischen pEF-IRES (*Internal ribosome entry side*)-Expressionsvektor kloniert (Hobbs et al. 1998), der sowohl die Multimerisierungsdomäne des C-Terminus aus C4bp, einen Linker, bestehend aus SG₄S, sowie eine Resistenzkassette mit Puromycin (siehe Abb. 4.2) enthielt (Dervillez et al. 2006). Das Signal zum Transport des Proteins an die Zelloberfläche lieferte ein Signalpeptid aus dem humanen *Low-affinity nerve growth-factor Receptor* (LNGFR).



4.2 Der bicystronische Expressionsvektor pEF-IRES. Die Kassettenregion enthält die Sequenz des C46-Peptids, das humane c-myc- und verschiedene Längen der SG₄S Gelenkregion wurden nachträglich eingeführt.

Zur Erhöhung der Flexibilität der einzelnen Multimerarme in den C46-Konstrukten wurde die ursprüngliche einfache Gelenkregion verlängert. Dazu wurde der SG₄S-Linker zwischen der C46- und der MD-Domäne sequentiell durch Annealing eines 36-bp Codonoptimierten (SG₄S)₂ Linkers (siehe Tabelle 2.1.12, Material) verlängert (Abb. 4.4). Die Oligonukleotide wurden annealt, phosphoryliert und in den zuvor mit *BspEI* linearisierten 364H-Kassettenvektor ligiert. Die doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden so optimiert, dass nur Inserts mit korrekter

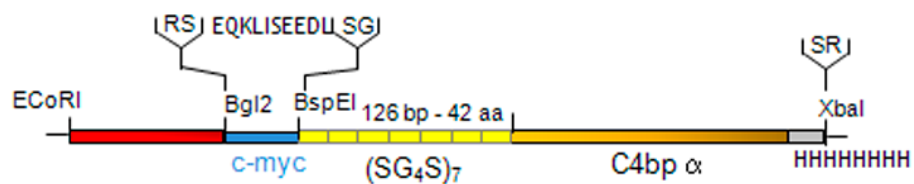
Orientierung in den zuvor linearisierten Vektor passten, d.h. die *BspE1* Schnittstelle befand sich N-Terminal.



4.3 C46-Konstrukte mit unterschiedlichen Längen der Gelenkregion. Der Linker zwischen C46 und C4bp wurde sequentiell durch ein 36bp Oligonukleotid (SG₄S) verlängert. Es wurden C46-Multimere mit bis zu 11 Linkern (364H-11L) generiert.

4.1.2 Klonierung des Kontroll-Multimers Multi-c-myc

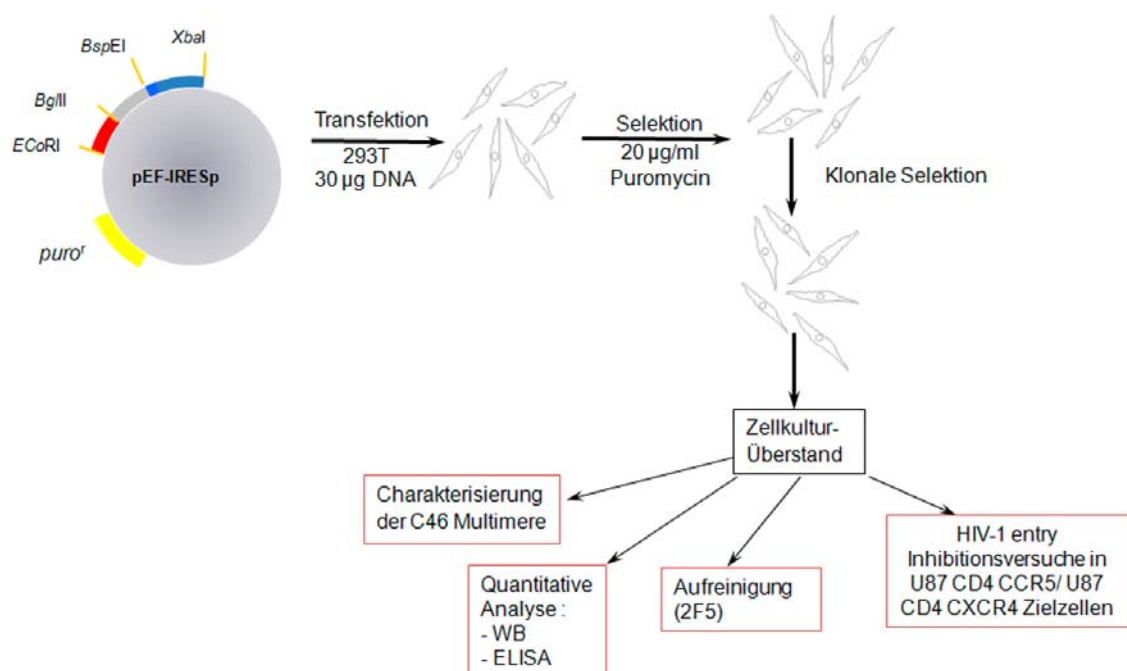
Als Ausgangskonstrukt des c-myc-Multimers diente das C46-7L-Multimer (364H-7L, siehe Abb. 4.4). Nach Ausschneiden der C46-Sequenz über die beiden Restriktionsschnittstellen *BspE1* und *BglII* wurde ein Oligonukleotid-Linker mit der c-myc-Sequenz EQKLISEEDL und den passenden Schnittstellen in den pEF-IRES Vektor eingefügt (Abb. 4.5). Das Konstrukt diente als generelle Kontrolle für die Multimere und wurde in den C46- als auch in den CCR5-Hemmversuchen eingesetzt (Dervillez et al. 2006).



4.4 Das multimere c-myc. Das Konstrukt enthielt statt der C46-Region lediglich die Sequenz des humanen c-myc Peptids und wurde deshalb als Kontrollkonstrukt für die Inhibitionsversuche verwendet.

4.2 Expression verschiedener C46-Konstrukte in 293T Zellen

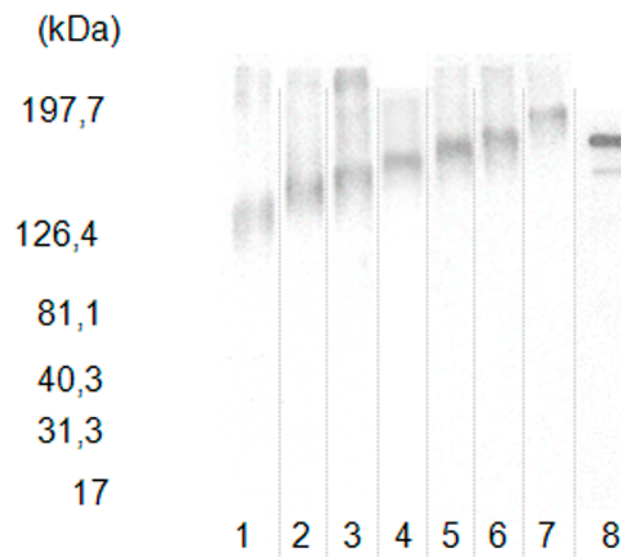
Die C46-Konstrukte mit unterschiedlich langen Gelenkregionen, sowie das C46-myc-Konstrukt wurden stabil in 293T Zellen transfiziert. Nach der Selektion mit Puromycin wurden die Zellen subkloniert und deren Zellkultur-Überstände daraufhin auf Multimer-Expression untersucht (siehe Abb. 4.5). Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung (Dervillez et al. 2006) erfolgten weitere Charakterisierungen sowie Inhibitionsversuche mit verschiedenen Pseudoviren zur Überprüfung auf ihre antivirale Aktivität.



4.5 Übersicht des Ablaufs nach Transfektion der Konstrukte in 293T Zellen. Die transfizierten 293T Zellen wurden mit Puromycin klonal selektiert. Die Überstände der Zellklone wurden auf Multimerexpression überprüft und charakterisiert, über Affinitätschromatographie aufgereinigt, quantifiziert und auf ihr antivirales Potenzial in HIV-1-entry Inhibitionsassays untersucht.

4.2.1.1 Expression der C46-XL-Multimere

Die Expression der verschiedenen C46-XL-Multimerklone wurde mittels Western Blot untersucht. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 10 µl des Zellkulturüberstandes unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Nach dem Blotting wurden die C46-Multimere mit Hilfe des Antikörpers 2F5 detektiert, der gegen das ELDKWA-Epitop in gp41 gerichtet ist.



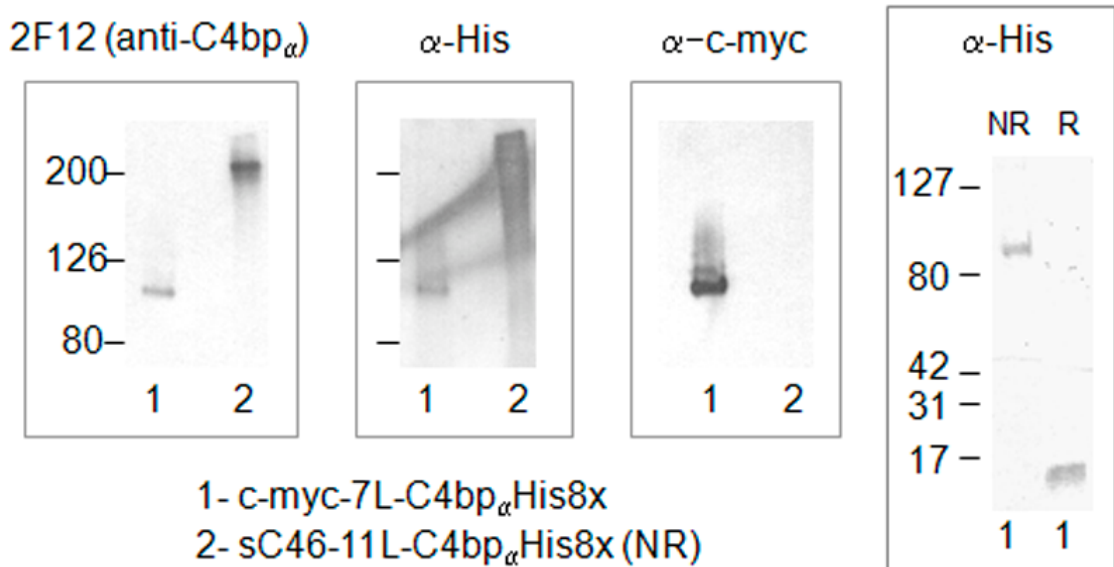
4.6 Expression der verschiedenen C46-Multimere. Western Blot mit jeweils 10 μ l Zellkultur-Überstand 1: C46-1L, 2: C46-3L, 3: C46-5L, 4: C46-7L, 5: C46-9L, 6: C46-11L, 7: C46-myc-11L, 8: 2F5 mAB. Detektion mit 2F5 (α -gp41) und α -human-HRP unter nicht-reduzierten Bedingungen.

Aus dem Western Blot aus Abbildung 4.6 geht hervor, dass die Molekulargewichte der Multimere mit zunehmender Größe der Gelenkregion korrelieren, eine Größenzunahme um jeweils etwa 5 kDa pro $(SG_4S)_2$ -Vielfaches: C46-1L: 140 kDa, C46-3L: 145,5 kDa, C46-5L: 151 kDa, C46-7L: 156,7 kDa, C46-9L: 162,2 kDa, C46-11L: 167,7 kDa, C46-myc-7L: 176 kDa. Der Bandenschmear der C46-XL-Multimere wurde auch bei den C46-1L-Multimeren beobachtet und ist auf Glykosylierungen der Multimere zurückzuführen, da sich innerhalb der C46-Sequenz eine N-Glykosylierungsstelle (NYT) befindet (siehe Abb. 4.1). In Reihe 8 wurde der humane α -gp41 Antikörper 2F5 zur Kontrolle aufgetragen, der vom HRP-gekoppelten α -human Sekundärantikörper detektiert wurde. Die leichte und die schwere Kette des Antikörpers kann man anhand der beiden scharfen Banden erkennen.

4.2.1.2 Expression des C-myc Multimers

Das c-myc Multimer hat ein Molekulargewicht von 90 kDa und ist somit auch das kleinste der Multimere. Die Expression der c-myc Multimere von 293T Zellen war relativ niedrig (im unaufgereinigten Zellkulturüberstand etwa 50 nM), somit war auch die Ausbeute nach der

Aufreinigung sehr niedrig gewesen (Projekt Xavier Dervillez). In den vier Western Blots (Abb. 4.7) sind jeweils 10 μ l der c-myc-Multimer-Zellkulturüberstände im Vergleich zu C46-11L Multimeren aufgetragen worden. Die 3 Blots wurden mit verschiedenen Antikörpern inkubiert, um die jeweiligen Epitope, welche in den Multimeren vorhanden sind, zu detektieren.



4.7 Detektion des c-myc Multimers. Die beiden Multimere C-myc-7L und C46-11L wurden mit 3 verschiedenen Antikörpern detektiert: 2F12 (gerichtet gegen das humane C4bp $_{\alpha}$), α -His und α -c-myc.

Mit dem 2F12 Antikörper konnte die C-terminale Multimerisierungsdomäne (C4bp $_{\alpha}$) in beiden Multimeren detektiert werden. Auch der Antikörper, welcher gegen den His-tag gerichtet ist, erkannte die an jedem Ende der Multimerarme vorhandenen Histidine. Das Vorhandensein des c-myc-Epitopes im c-myc Multimer wurde abschließend durch einen α -c-myc Antikörper bewiesen, während das C46-11L Multimer nicht erkannt wurde (Abb. 4.7, Blot 3). Unter denaturierenden Bedingungen (Abb. 4.7, Blot 4) konnten die c-myc-Multimere zu ca. 13 kDa großen Monomeren reduziert werden. Es ist zu beachten, dass das c-Myc-Multimer im Vergleich zum C46-11L-Multimer eine distinkte Bande darstellt, da die c-myc-Sequenz keine Glykosylierungsstelle enthält.

4.3 Auswahl der extrazellulären CCR5 Bereiche

Die Interaktion CD4-induzierter Epitope auf dem HIV-1 Hüllprotein gp120 mit den extrazellulären CCR5 Domänen ist entscheidend für den anschließenden Fusionsprozess der viralen Hüllmembran mit der Membran der Zielzelle. Daher werden die CCR5 Domänen als besonders vielversprechend zur Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen die HIV-1 Infektion angesehen. Unser Ziel war es also, neben den C46-Multimeren auch CCR5-Multimere zu generieren, welche an die viralen CD4i-Epitope in gp120 binden und diese so vor der Interaktion mit dem zellulären CCR5 hindern sollten. Zur Generierung jeder einzelnen extrazellulären CCR5-Schleife wurden deren jeweilige Sequenzen verwendet (NCBI/Pubmed), welche in Tabelle 4.1 aufgelistet sind:

Tabelle 4.1 Übersicht der Aminosäuresequenzen der extrazellulären CCR5 Schleifen.

extrazelluläre CCR5 Domänen	Aminosäuresequenz
N-Terminus (Aminosäuren 1-18)	MDYQVSSPIYDINYYTSE
Extrazelluläre Schleife 1	AAAQWDFGNTMC
Extrazelluläre Schleife 2	RSQKEGLHYTCSHFYPYSQYQFWKNFQTLK
Extrazelluläre Schleife 3	EQEFFGLNNCSSSNRDLQA

Des Weiteren wurden zwei CCR5-ECL-ähnliche Peptide aus vorhergehenden Arbeiten (Christoph Königs und Xavier Dervillez) zur Multimerisierung verwendet: 3A9-L-5C7 und XD3. Das Peptid 3A9-L-5C7 stammt ursprünglich aus einem Phage Display Screening, in dem die beiden HIV-1-neutralisierenden Antikörper 3A9 und 5C7 (Königs, 2007 #1226) alternierend als Target verwendet wurden. Die Phagen, welche an die Epitope der beiden Antikörper gebunden haben, wiesen eine starke Homologie zu den extrazellulären Epitopen des CCR5-Corezeptors auf. Das XD3 Peptid wurde bei einem weiteren Phage Display Screening gegen native HIV-1 gp120-Spikes in Gegenwart von CD4 selektioniert (Dervillez & Klaukien, in Bearbeitung). Dabei wurden die Phagen zuerst mit löslichem CD4 als Negativselektion inkubiert, anschliessend mit MLV gagpol/HIV-1 89.6 env Pseudoviruspartikeln und als Positivselektion mit denselben

Viruspartikeln in Anwesenheit von CD4, um spezifische Phagen zu erhalten, die an CD4i-Epitope in gp120 binden. Die Sequenz der erhaltenen Phagenmimotope (Tabelle 4.2) ähnelte ebenfalls den extrazellulären CCR5 Epitopen (Dervillez et al., in Vorbereitung).

Ein weiteres CCR5-ähnliches Peptid, pΔE51, wurde aus einer Publikation (Dorfman et al. 2006) zur Multimerisierung verwendet. In dieser Arbeit wurde der Antikörper E51, welcher ursprünglich aus einem HIV-infizierten Patienten isoliert, kartiert und dessen CDR3-Epitope mit einem humanen IgG-F_c-Teil fusioniert. Seine Epitope ähneln in seiner Sequenz mit insgesamt 6 sulfatierten Tyrosinen dem N-Terminus von CCR5 (im Original NT von CCR5 sind nur 4 Tyrosine enthalten) und würden theoretisch, wenn sie in Form von Multimeren von eukaryotischen Zellen produziert werden, zusätzlich posttranslational modifiziert und somit sulfatiert bzw. phosphoryliert werden. Dies wiederum käme der ursprünglichen Form und Ladung dieses Corezeptorteils sehr nahe und würde eine Interaktion mit den positiv geladenen Aminosäuren in der gp120-V3 Region begünstigen.

Tabelle 4.2: Aminosäuresequenzen der CCR5-ähnlichen Peptide

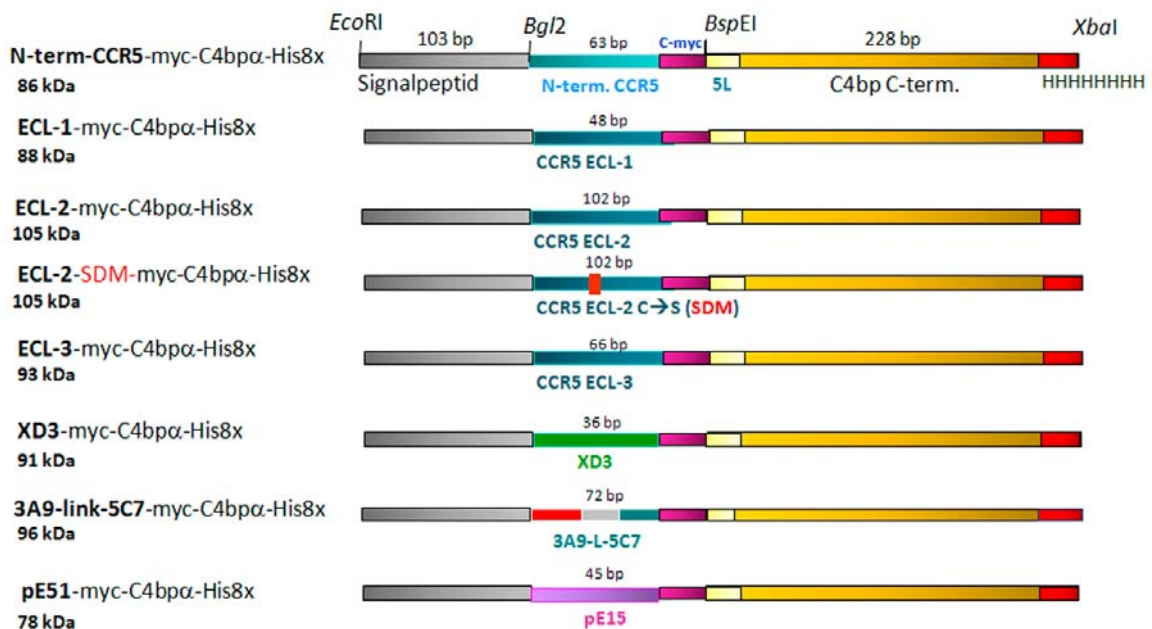
CCR5-ähnliche Domänen	Aminosäuresequenz
XD3	HKQPWYDYWLLR
3A9-L-5C7	SPIYD-SGSGS-PWDFG-SGSGS-GRLD
pE51	GDYADYDGGYYYDMD

4.3.1 Klonierung der CCR5-Konstrukte

Die Klonierung der CCR5 Multimere erfolgte über Oligonukleotide, die an ihrem 3' bzw 5' Ende bereits die für den Expressionsvektor relevante Restriktionsschnittstelle trugen. Diese wurden in den C46-Expressionsvektor pEF-IRES kloniert (Abb. 4.2), welcher bereits für die C46-Multimere verwendet wurde und sowohl die Multimerisierungsdomäne des C-Terminus von C4bp, einen Linker, bestehend aus (SG₄S)₅ sowie eine Resistenzkassette mit Puromycin enthielt (Dervillez et al. 2006). Der Kassettenvektor wurde über die beiden Restriktionsschnittstellen *BspEI* und *BglII* geschnitten, um die C46-Kassette zu entfernen, die Oligonukleotide wurden hybridisiert,

und in den geschnittenen und dephosphorylierten Vektor ligiert. Nach einem Kontrollverdau wurden die Konstrukte in *E. coli* transformiert und die DNA sequenziert (siehe Methoden, Kapitel 3.1.1-3.1.10). Der Expressionsvektor wurde dann in 293T Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde eine c-Myc-Sequenz zwischen der Kassettenregion und dem Linker eingefügt, um sowohl eine Detektion als auch eine Aufreinigung mit Hilfe eines gegen c-Myc gerichteten Antikörpers zu ermöglichen.

In der Sequenz des ECL2-Konstruktes wurde nachträglich das darin enthaltene Cystein gegen ein Alanin ausgetauscht (siehe Tabelle 4.1). Dies erfolgte ebenfalls mit Oligonukleotiden, welche die *BspEI* bzw. *BglII*-Schnittstellen trugen (siehe Abb. 4.8).

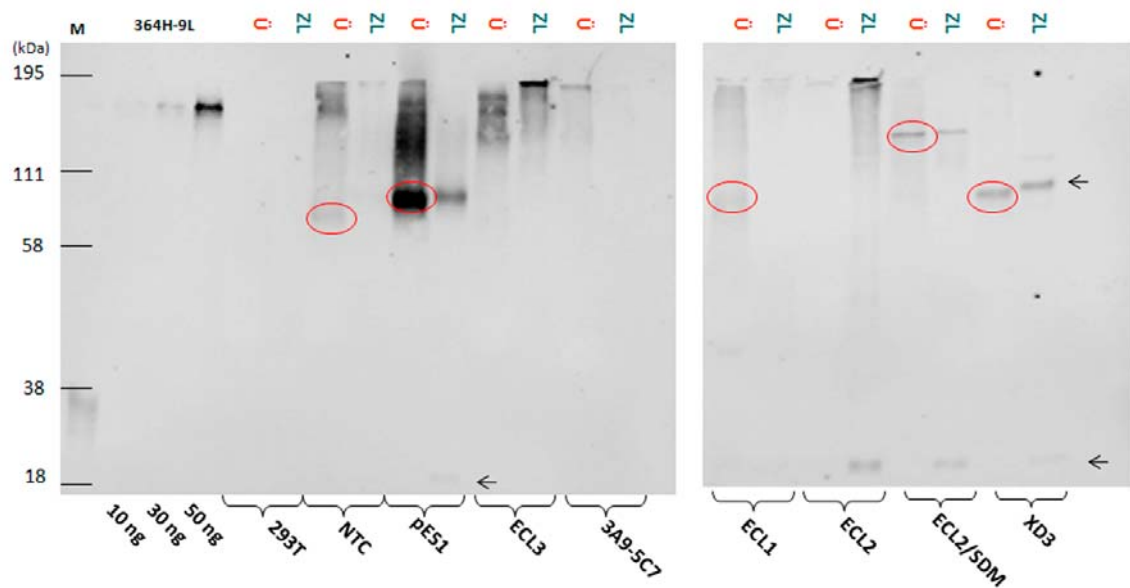


4.8 Schematische Darstellung der CCR5-Konstrukte. Die jeweiligen CCR5-Konstrukte sind aus dem Kassettenvektor 364H-myc-5L entstanden. Im ECL2 Konstrukt wurde nachträglich ein Cystein gegen Alanin ausgetauscht, um eine Interaktion mit den Cysteinen aus der C4bp α -Domäne zu vermeiden.

4.3.2 CCR5-Multimerexpression in 293T Zellen

Ebenso wie die C46-Konstrukte wurden die CCR5-Konstrukte in 293T Zellen stabil transfiziert und deren Überstände auf Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Da einige Multimere (ECL2, XD3, ECL3) nicht in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden konnten, wurden auch die Zelllysate der entsprechenden 293T-Zell-Klone untersucht. Unzureichende Expression in den Zellkulturüberstand kann mehrere Ursachen haben: zum

Beispiel kann die Größe des zu sekretierenden Proteins zu gering sein, wie am Beispiel von SP-C46-His bereits gezeigt wurde (Dervillez et al. 2006). Erst ab einem bestimmten Molekulargewicht, ab etwa 12 kDa, konnten die C46-Multimere aus den Zellen sezerniert werden. Mit Hilfe von Zelllysaten kann man im Western Blot Proteine nachweisen, die im Inneren der Zellen vorhanden sind und nicht in ausreichender Form in den Überstand sekretiert werden (siehe Methoden, 3.3.6).



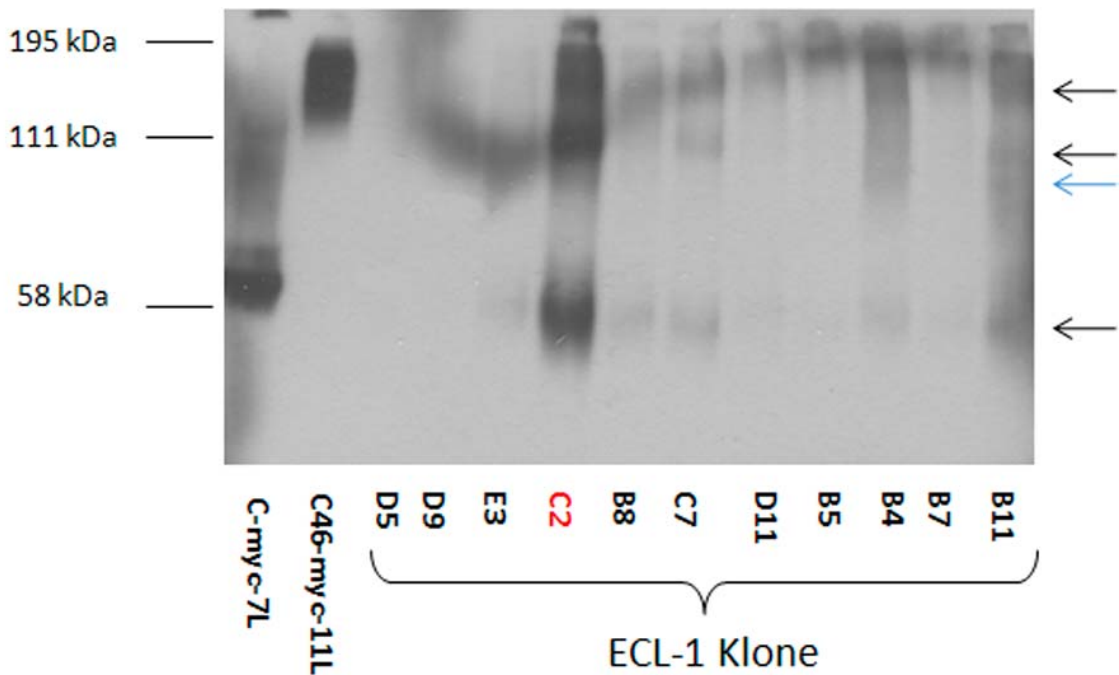
4.9 Nachweis der Multimere im Überstand und im Zelllysat. PAA-Gradient-Gel 12-, 8-, 4%, Auftrag 2 μ l Zelllysat und 10 μ l Zellkulturüberstand unter nicht-reduzierenden Bedingungen; Detektion mit α -His mAB. Die schwarzen Pfeile deuten im Bereich um 18 kDa die Monomere, im Bereich zwischen 70-140 kDa die Multimere an. Die in den Zellkultur-Überstand sekretierten Multimere sind Rot umrandet.

Um im selben Blot sowohl kleine Monomere als auch die Multimere erkennbar zu machen, wurde ein PAA-Gradient über drei Konzentrationen 4-, 12-, und 8% Polyacrylamid verwendet. Der Western Blot (Abb. 4.9) zeigt, daß die Sekretion einiger Multimere in den Überstand tatsächlich unzureichend war, diese Multimere jedoch im Inneren der Zellen nachgewiesen werden konnten, wie z.B. das multimer ECL2 (Bande 4, rechter Blot). Da sich in der Sequenz des ECL2 ein Cystein befindet, wurde dieses durch ein Alanin ausgetauscht. Das enthaltene Cystein führte möglicherweise zu einer Disulfidbrücke mit den anderen Cysteinen in der C4bp Domäne, womit eine korrekte Faltung und der Transport des Multimers aus der Cytoplasmamembran behindert worden sein könnten. Nach dem AS-Austausch in ECL2

konnten die ECL2-SDM-Multimere detektiert werden. PE51, NTC, ECL3 sowie ECL2-SDM zeigten im Überstand bzw. im Zelllysate zwei unterschiedlich große Proteinbanden. Das höhere Molekulargewicht der Multimere im Zelllysate könnte durch das noch vorhandene Signalpeptid zustande gekommen sein, das erst kurz vor dem Proteinexport aus den Zellen abgespalten wurde. Erwartungsgemäß konnten in den Zelllysaten auch die Monomere detektiert werden (E51, ECL2, ECL2-SDM, XD3), welche noch nicht über Disulfidbrückenbindungen verbunden waren. Bei den anderen Multimer-Zelllysaten wurden die Monomere erst nach längerer Belichtungszeit nachgewiesen (Western Blot nicht gezeigt).

4.3.3 Subklonierung der CCR5-Multimer-Bulk-Kultur zur Verbesserung der Proteinexpression

Innerhalb einer Misch-Zellkultur, der sogenannten „Bulk“-Kultur, befinden sich verschiedene Zellklone mit unterschiedlichem Expressionsprofil. Eine optimale Proteinexpression lässt sich durch die gezielte Selektion gut-exprimierender Zellklone aus der Mischkultur erzielen. Dies kann durch eine Subklonierung der *Bulk*-Kultur erreicht werden. Dazu wurde die *Bulk*-Kultur per limitierender Verdünnung in 96-well Platten ausgesät, um die heterogene Zellpopulation zu vereinzeln (siehe Methoden, 3.3.5). Somit konnte man etwa 3 Wochen später die Multimer-Expression jedes einzelnen Klons vergleichen und jene Klone mit der höchsten Proteinexpression zur weiteren Kultivierung ausselektieren. Exemplarisch für die Subklonierung, die mit allen CCR5-Multimeren durchgeführt wurde (mit Ausnahme des pE51-Zellklons), werden verschiedene ECL1-Klone in Abb. 4.10 gezeigt. Im Falle des pE51-Multimers wurde die *bulk*-Kultur weiterkultiviert, da die Expression wesentlich stärker war im Vergleich zu den anderen subklonierten Multimer-Klonen (WB nicht gezeigt).



4.10 Proteinexpression subklonierter ECL1 Klone. Jeweils gleiche Volumina (15 μ l) der Zellkultur-Überstände subklonierter ECL1 293T Zellklone wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen und mittels α -His Antikörper detektiert. Die schwarzen Pfeile befinden sich auf Höhe der beobachteten Multimerbanden, der blaue Pfeil befindet sich auf der Höhe des theoretisch errechneten Heptamers.

Die Detektion der rekombinanten Proteine aus dem Überstand erfolgte mit Hilfe eines α -His Antikörpers im Western Blot. Die theoretisch erwartete molekulare Masse am Beispiel des ECL1 Multimers war 88 kDa, die drei auf dem Western Blot detektierten Proteinbanden lagen knapp unter 58 kDa, bzw. bei 140 kDa und 180 kDa. Oft zeigen Proteine jedoch in der SDS-PAGE ein anderes Laufverhalten, als ihr theoretisches Molekulargewicht erwarten lässt. Eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit den Multimeren ist auszuschließen, da alle detektierten Banden auch mit einem Antikörper, der gegen das c-myc-Epitop gerichtet war, beobachtet wurden (Western Blot nicht gezeigt). Darüberhinaus könnten die verschieden großen Proteinbanden theoretisch auch unterschiedliche -Mere darstellen. Dies wird in Kapitel 3.4 in Form einer mit β -Mercaptoethanol durchgeführten Reduzierung der Multimere erläutert.

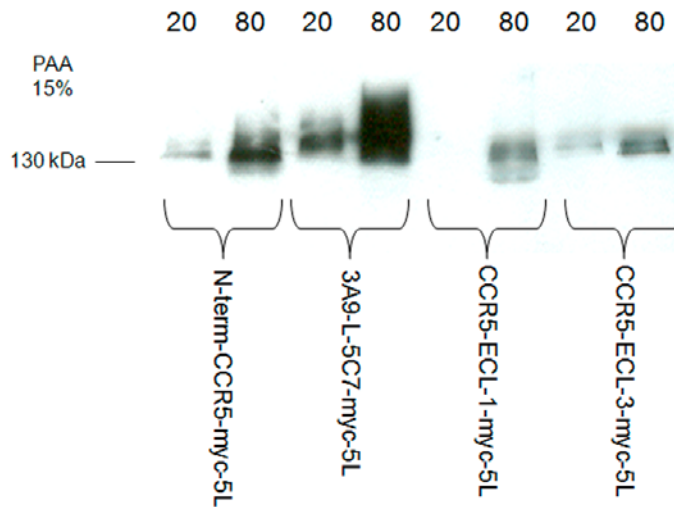
Es fällt außerdem auf, dass die Banden nicht distinkt sind, sondern den Schmierbanden der C46-Multimere ähneln. Da ECL1 jedoch weder *N*- noch *O*-Glykosylierungsstellen enthält, muss davon ausgegangen werden, dass andere Modifikationen stattgefunden haben könnten. In der ECL1-Domäne befindet sich an letzter Position ein Cystein, das mit der zweiten ECL des

CCR5-Rezeptors eine Disulfidbrückenbindung zur Stabilisierung seiner 3-D-Konformation eingeht (siehe Einleitung, Abb. 1.6). Das Cystein könnte im vorliegenden Fall eventuell mit Cysteinen aus der C4bp-Domäne des Multimers Disulfidbrücken bilden.

Aus dem Western Blot (Abb. 4.10) ging hervor, dass bei Klon C2, im Vergleich zu den anderen Klonen und der *bulk*-Kultur (Abb. 4.9) die Multimerexpression am höchsten war (Reihe 6). Dieser Klon wurde deshalb weiter kultiviert, während die anderen Zellklone bei -80° eingefroren wurden. Da für alle CCR5-Multimere die Subklone mit der besten Expression weiterkultiviert wurden (außer das pE51-Multimer als *bulk*-Kultur), werden die vollständigen Klonbezeichnungen in kommenden Western Blot-Abbildungen nicht mehr erwähnt.

4.3.4 Gesteigerte Proteinexpression durch Erhöhung der Puromycin-Konzentration

Eine Steigerung der Multimerexpression bereits subklonierter 293T Zellen wurde beobachtet, indem die Konzentration des Selektionsantibiotikums Puromycin im Zellkultur-Medium erhöht wurde (X. Dervillez). Nach jedem Zellsplit wurde die anfängliche Puromycinkonzentration des Mediums von 20 $\mu\text{g/ml}$ um weitere 10 $\mu\text{g/ml}$ erhöht, um nach etwa 10 Zellsplits eine Konzentration von 80 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin im Medium zu erhalten (siehe Methoden, 3.3.5). Die Multimer-Expression der Zellen, welche mit 80 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin kultiviert wurden, war im Vergleich zu jenen Zellen, die mit der Ausgangskonzentration 20 $\mu\text{g/ml}$ kultiviert wurden, deutlich erhöht (siehe Abb. 4.11). Die Klone mit der höchsten Proteinexpression wurden für das Sammeln des Überstandes weiter kultiviert. Alle Multimerklone wurden mit steigender Puromycin-Konzentration kultiviert, einige Zellklone sind im Western Blot in Abb. 4.11 exemplarisch dargestellt. Mit dieser Methode konnte bei den CCR5-Multimeren eine bis zu 5-fache Expressions-Steigerung erzielt werden.



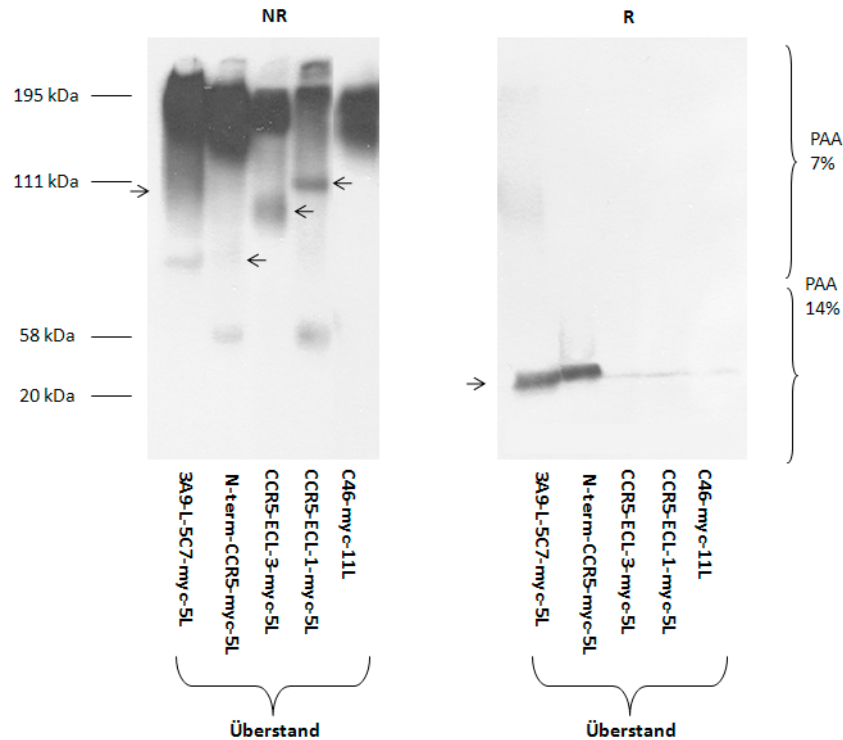
4.11 Steigende Puromycin-Konzentration erhöht die Expressioneffizienz von 293T Zellen.
Vergleich der Proteinexpression von 293T Zellen bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. PAA-Gel 15%, Western Blot mit Zellkultur-Überständen (20 μ l), Detektion mit α -myc.

4.3.5 Optimierte Expression der CCR5-Multimere

Nach erfolgreicher Subklonierung und verstärktem Selektionsdruck durch hohe Puromycinkonzentrationen konnte die Proteinexpression bei einigen CCR5-Multimeren gesteigert werden. Im Vergleich zu den C46-Multimeren war die Expressions-Effizienz dennoch sehr niedrig und hat bei einigen Multimeren wie dem ECL2- bzw. ECL2-SDM-Multimer keine Verbesserung erzielt.

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen stimmen die theoretischen Größen der Multimere größtenteils mit den schwächeren Banden zwischen 70 und 110 kDa auf dem Western Blot überein, wobei die deutlicheren Banden um 150-200 kDa möglicherweise ein Vielfaches der Heptamere oder posttranslationale Modifizierungen darstellen könnten (Abb. 4.12). Diese hochmolekulare, nicht zuzuordnende Bande trat generell bei allen CCR5-Multimeren auf. Mit den Pfeilen wurden jene Banden angedeutet, die heptameren Molekülen entsprechen könnten, deren theoretisches Molekulargewicht auch dem beobachteten entsprach. Wenn man die Expression des ECL1-Multimers (Klon C2) verfolgt, kann man eine deutliche Steigerung der

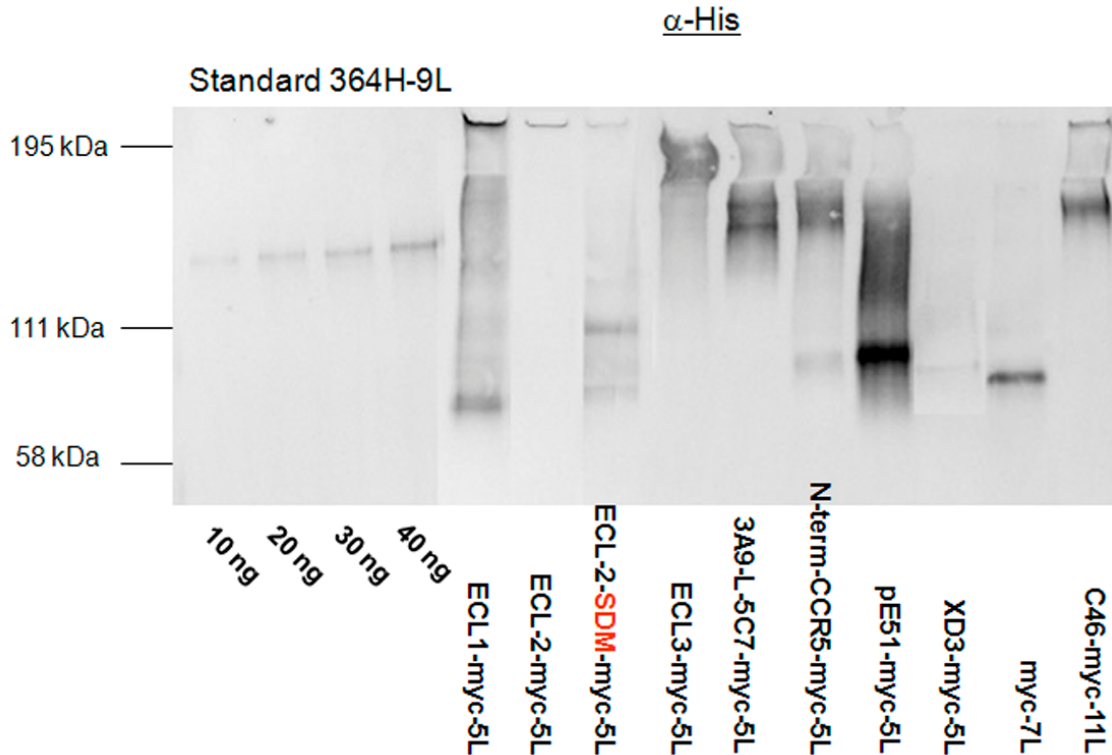
Protein-Expression durch die Subklonierung und Puromycinselektion erkennen (Vergleich Abb. 4.9; 4.10; 4.11).



4.12 Expression der CCR5-Multimere. PAA-Gradient-Gel 7 und 14%, Western Blot, Detektion mit α -His. Überstand (20 μ l/Probe) verschiedener CCR5-Multimere im Vergleich zum C46/364H-11L-Multimer unter nicht-reduzierten und reduzierten Bedingungen. Die schwarzen Pfeile deuten die Multimere in heptamerer Größe an.

Unter reduzierenden Bedingungen konnten die Disulfidbrücken-freien monomeren Peptide bei einer Größe zwischen 20 und 35 kDa detektiert werden, was dem theoretisch errechneten Molekulargewicht der jeweiligen Monomere entsprach. Die schwereren, nicht zuzuordnenden Banden konnten unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 4.12 rechter Blot) nicht mehr nachgewiesen werden. Dies würde außerdem dafür sprechen, dass es sich bei den nicht-zuzuordnenden höheren Molekulargewichten entweder um eine Agglomeration aus mehreren Multimeren oder um Okta-, Nona- oder Dekamere handelte, welche unter Einwirkung von β -Mercapto-Ethanol zu Monomeren reduziert wurden. Bei den Multimeren ECL1 (Klon C2) und ECL3 (Klon 4) ist die reduzierte Bande im Bereich 20-40 kDa nur sehr schwach im Vergleich zu den Banden der 3A9-L-5C7 (Klon 1)- und NTC-Multimere (Klon C10). Allerdings war bei

letzteren, trotz gleicher Auftragsvolumina (20 µl Überstand), die Proteinkonzentration höher als in den ECL1- und ECL3-Überständen.



4.13 Vergleich der Proteinexpression aller CCR5-Multimer-293T-Zellklone. PAA-Gel 8%, Western Blot mit jeweils 10 µl Zellkultur-Überstand unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit 364H-9L Multimer als Standard (Detektion mit α -His mAB).

Wie aus zusammenfassender Abbildung 4.13 und Tabelle 4.3 ersichtlich ist, war die Proteinexpression der verschiedenen Multimer-exprimierenden 293T Zell-Klone trotz Optimierung unterschiedlich stark ausgeprägt. Während die Expression des Multimers pE51 (78 kDa, *bulk*-Kultur) deutlich erhöht war, konnte man die theoretisch errechneten Banden der Multimere ECL2 (Klon 5), ECL2-SDM (Klon C10), XD3 (Klon 1) und 3A9-L-5C7 (Klon B3) nur sehr schwach detektieren, lediglich die ausgeprägten Banden um 150 kDa waren relativ deutlich und wie bereits für die ECL1-Multimere beschrieben wurde, auf größere Multimere (mehr als 7 Valenzen) hindeutet. Die Multimere ECL1 (Klon C2) und NTC (Klon C10) wurden dagegen moderat exprimiert (Proben 5 und 10). Außerdem fällt bei pE51 ein Bandenschmier über der theoretisch berechneten Multimer-Bande auf, der eine eventuelle posttranslationelle Modifizierung darstellen könnte. Die Sequenz des pE51 enthält fünf Tyrosine, die unter

physiologischen Bedingungen sulfatiert oder auch phosphoryliert sein könnten und deshalb einen Hinweis für den Bandenschmear geben. Interessanterweise konnte das Multimer ECL2 nach Austausch des Cysteins in der ECL2-Sequenz detektiert werden, wie in den Proben 6 und 7 erkennbar ist. Bei dem Kontroll-Multimer c-myc konnte im Vergleich zu den anderen Multimeren nur eine Bande im Bereich von 70 kDa detektiert werden, welche auch dem theoretischen Molekulargewicht des Multimers entsprach. Die Konzentrationen der Multimere im Überstand wurden mit Hilfe des Programmes *GelDoc-System* errechnet, wobei der Abgleich der CCR5-Multimerbanden mit einem quantifizierten 364H-9L-Standard erfolgte (X. Dervillez).

Tabelle 4.3: Expressionseffizienz der CCR5-Multimere.

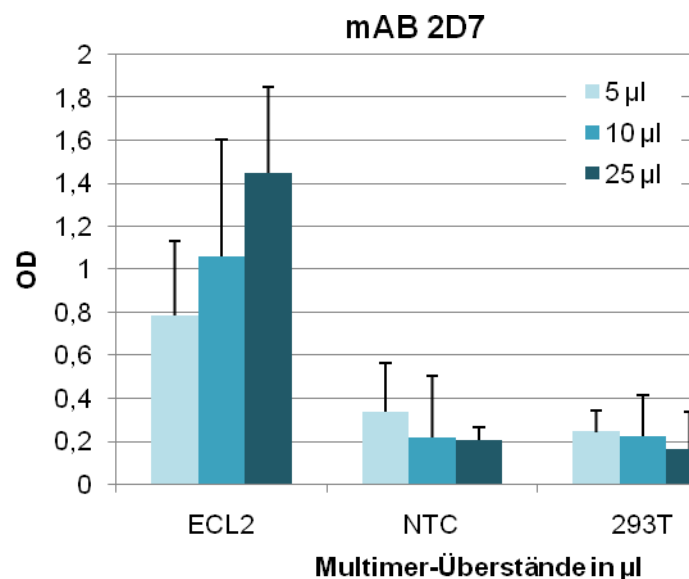
Multimer	Molekulargewicht kDa (Heptamer)	Zellkulturüberstand ng/μl	Molarität/nM
NTC	86	4,4	46
ECL1	88	3,7	40
ECL2 (inkl. C)	105	0	0
ECL2-SDM (C→A Mutation)	105	0,86	8
ECL3	93	0,67	7
3A9-L-5C7	96	1	10
XD3	91	0,95	10
pE51	78	14,2	150

4.3.6 Das ECL2-Multimer bindet im ELISA an den CCR5-Antikörper 2D7

Die lineare Struktur der CCR5-Domänen in den jeweiligen Multimerarmen ließ die Frage aufkommen, ob eine Interaktion bestimmter CCR5-Epitope aus den Multimeren mit monoklonalen Antikörpern stattfinden kann, welche gegen konformationelle Epitope des CCR5-Rezeptors gerichtet sind. Dies wurde mit den CCR5-Multimeren und Antikörpern, welche gegen CCR5-ECL-Epitope gerichtet sind, mittels ELISA untersucht (siehe Methoden, Kapitel 3.2.10).

Für diese Interaktionsstudie wurde der monoklonale Antikörper 2D7 verwendet. Aus Literaturangaben ging hervor, dass die konformationellen Epitope ¹⁷⁰QKEGL¹⁷⁴ und ¹⁹⁵TL¹⁹⁶ des Antikörpers 2D7 in der ECL2 liegen (Khurana, 2005 #1948). Da 2D7 an Epitope auf der zweiten extrazellulären Schleife von CCR5 bindet, wird auch die Chemokinbindung beeinflusst, da ECL2 die für die Chemokin-Signaltransduktion wichtigen Domänen enthält (Wu et al. 1997). Ebenso wie 3A9 kann auch 2D7 die Infektion mit R5-tropem HIV-1 neutralisieren (Wu et al. 1997).

Für den ELISA wurde der Zellkultur-Überstand des ECL2-Multimeres mit Hilfe von α -His Antikörpern auf einer ELISA-Platte immobilisiert und mit 2D7 inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mittels α -Maus-HRP (Abb. 4.14). Als Kontrolle wurde Überstand des NTC-Multimers verwendet, welches keinerlei Ähnlichkeit mit der ECL2-Region aufweist, sowie der Überstand nicht-transfizierter 293T Zellen.



4.14 ELISA mit CCR5-Multimerüberständen. *Unterschiedliche Volumina der Überstände wurden in Dreifachbestimmungen auf α -His-ELISA Platten gecoatet, die Detektion erfolgte mit einem gegen den monoklonalen 2D7 Maus-Antikörper gerichteten α -Maus-HRP.*

Der *cut-off* (Ausschlusswert) belief sich auf eine OD von 0,6, was dem 3-fachen Wert der optischen Dichte der Negativkontrolle (Überstand von 293T Zellen OD 0,2) entspricht. Demzufolge konnte eine Reaktion des 2D7 Antikörpers beim ECL2-Multimer als spezifisch

angesehen werden (OD 0,8-1,4). Die Interaktion war zu vermuten, wobei 2D7 normalerweise konformationsabhängige Epitope in der zweiten ECL erkennt (Wu et al. 1997). Das Multimer NTC konnte mit dem Antikörper 2D7 kaum interagieren (OD 0,2-0,3), da keine Homologie zu den ECL2-Epitopen bestand.

4.3.7 Immunopräzipitation von ECL2-SDM-Multimer mit CCR5 Antikörper 2D7

Der im vorangegangenen Kapitel 4.3.6 beschriebene ELISA mit dem 2D7 Antikörper zeigte eine deutliche Interaktion des ECL2 Multimers (mit mutiertem Cystein in ECL2) mit dem 2D7 Antikörper. Zur weiteren Bestätigung dieser Aussage wurde eine Immunodetektion, in Form einer Immunopräzipitation, mit den beiden potenziellen Interaktionspartnern durchgeführt (siehe Methoden, Kapitel 3.2.12).

Zur Kontrolle dieser Wechselwirkung wurde der ECL2-SDM-Zellkulturüberstand mit Beads präzipitiert, welche an ihrer Oberfläche 2D7 gebunden haben. Als Kontrolle diente der Zellkulturüberstand nicht-transfizierter 293T Zellen. Das Präzipitat wurde dann auf die Anwesenheit der Interaktionspartner untersucht. Die Detektion der Multimer-Antikörper-Immunkomplexe erfolgte mit einem α -His-Antikörper mittels Western Blot (Abb. 4.15).



Abbildung 4.15: Immunopräzipitation von ECL2-SDM Überstand mit 2D7 mAB-Beads. SDS-Gel 8%, Western Blot Detektion mit α -His mAB.

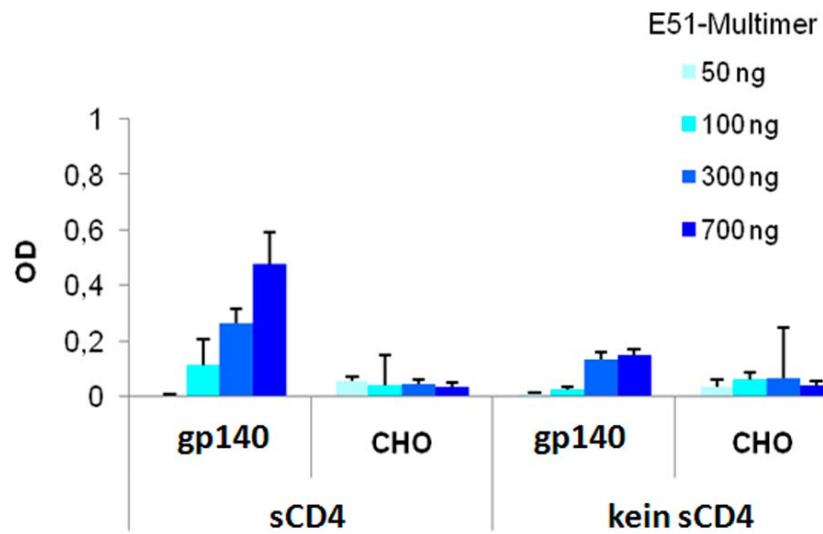
Das Multimer ECL2-SDM konnte mit dem Antikörper 2D7 präzipitiert werden, wie im Western Blot auf Abb. 4.16 erkennbar ist. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist eine Bande bei etwa 100 kDa, welche der Größe des ECL2-Multimers entspricht, deutlich erkennbar. Nach der Reduzierung des Multimers mit 1 M β -Mercapto-Ethanol konnten 2 leichtere Doppelbanden im Bereich zwischen 20-30 kDa nachgewiesen werden, was dem Molekulargewicht eines Monomers bzw. eines Dimers entsprechen würde. Die 293T Kontrolle wurde dagegen nicht von dem Antikörper präzipitiert. Ein leichter Schatten in Höhe des nicht-reduzierten Multimers ist zwar in der Negativkontrolle (293T Überstand) erkennbar, dieser stammt jedoch von der Probe des nicht-reduzierten ECL2-Überstandes daneben.

Die erfolgreiche Detektion des ECL2-Multimers durch den 2D7 Antikörper birgt zudem eine Alternative zur His-Tag-Aufreinigung. Der Antikörper könnte kovalent an eine Affinitätschromatographische Säule gekoppelt werden, mit welcher die ECL2-Multimere aus dem Überstand herausgefiltert werden.

Eine Erkennung durch 2D7 im Western Blot wurde nicht bestätigt, was höchstwahrscheinlich am denaturierten ECL2-Epitop liegt, das der Antikörper in dieser Konformation nicht mehr erkennen kann (Western Blot nicht gezeigt).

4.3.8 Bindung von pE51 Multimer an trimeres gp140

Da vor allem sulfatierte Tyrosine des Antikörpers E51 an CD4-induzierte Epitope auf HIV-1 gp120 binden (Dorfman et al. 2006), wurde abschließend noch überprüft, ob auch die multimerisierte Version der CDR3-Domäne aus pE51 in Anwesenheit von humanem CD4 mit trimerem gp140 interagiert. Das trimere gp140 wurde rekombinant von CHO Zellen in den Überstand sekretiert und unaufgereinigt im ELISA verwendet (freundlicherweise von S. Antoni zur Verfügung gestellt). Die pE51-Multimere wurden auf His-gecoatete ELISA-Platten mit CD4 und trimerem gp140 inkubiert und anschließend mit einem gegen c-myc gerichteten Antikörper detektiert (Abb. 4.16). Als Negativkontrolle wurde der Zellkultur-Überstand nicht-transfizierter CHO-Zellen verwendet (siehe Methoden, 3.2.11).



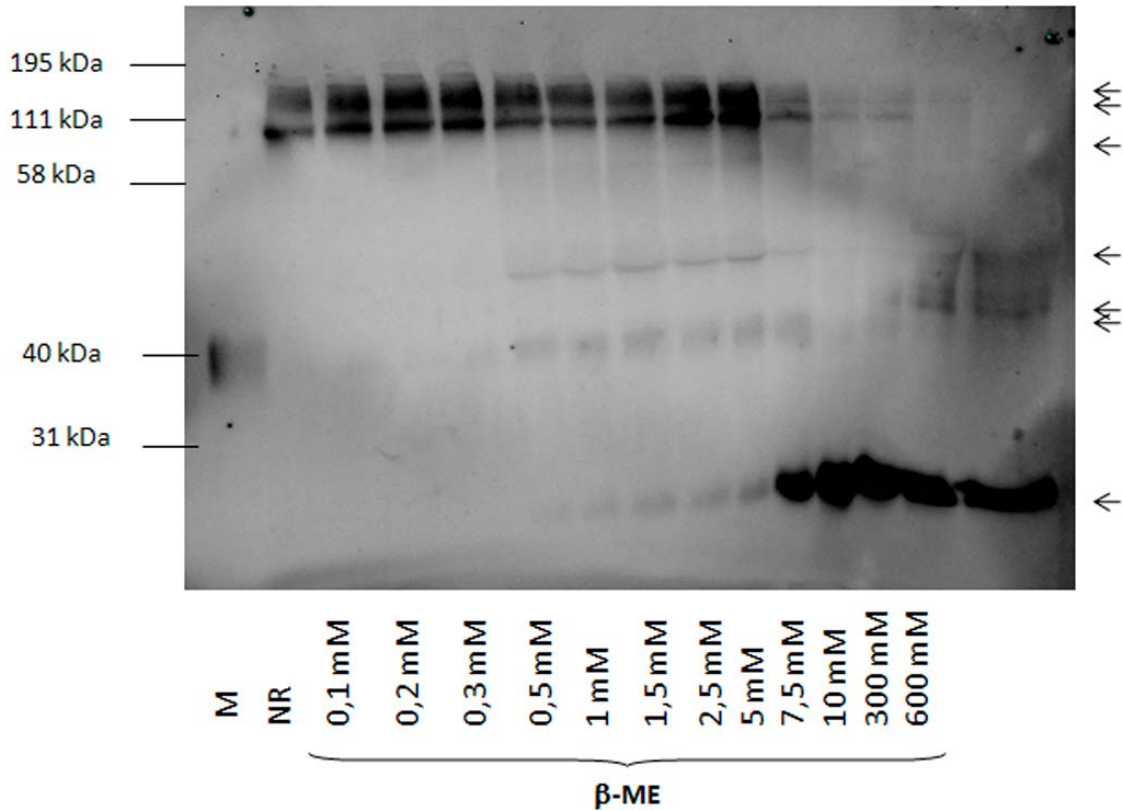
4.16: ELISA mit pE51 Multimeren und trimerem ADA gp140. Zur Kontrolle wurde Überstand nicht-transfizierter CHO-Zellen verwendet. Auf His-gecoateten Platten wurden verschiedene Konzentrationen der aufgereinigten pE51-Multimere in Anwesenheit von löslichem humanen CD4 inkubiert (bzw. ohne CD4). Die Detektion erfolgte über α -myc.

Aus Abbildung 4.16 geht hervor, dass das Multimer pE51 in konzentrationsabhängiger Weise an das trimere gp140 Env band. Die Interaktion war zudem CD4-abhängig und spezifisch, was sich in der nur schwachen Bindung an gp140-freien CHO-Überstand zeigt. Die Konzentration, bei der pE51 an gp140 bindet (700 ng), ist allerdings recht hoch, die OD betrug in diesem Fall maximal 0,5. Abzüglich des dreifachen *cut-offs* der CHO-Negativkontrolle (OD 0,1), blieb nur noch eine OD von 0,2 zurück. In niedrigeren Multimer-Konzentrationen (zwischen 50 und 300 ng) betrug die OD lediglich 0,1-0,3, was dem Hintergrund des CHO-Überstandes entsprach. Angesichts seiner mindestens 7 Valenzen fiel die Bindung des pE51-Multimers an gp140 insgesamt relativ schwach aus.

4.4 Schrittweise Reduktion der CCR5 Multimere zu Monomeren

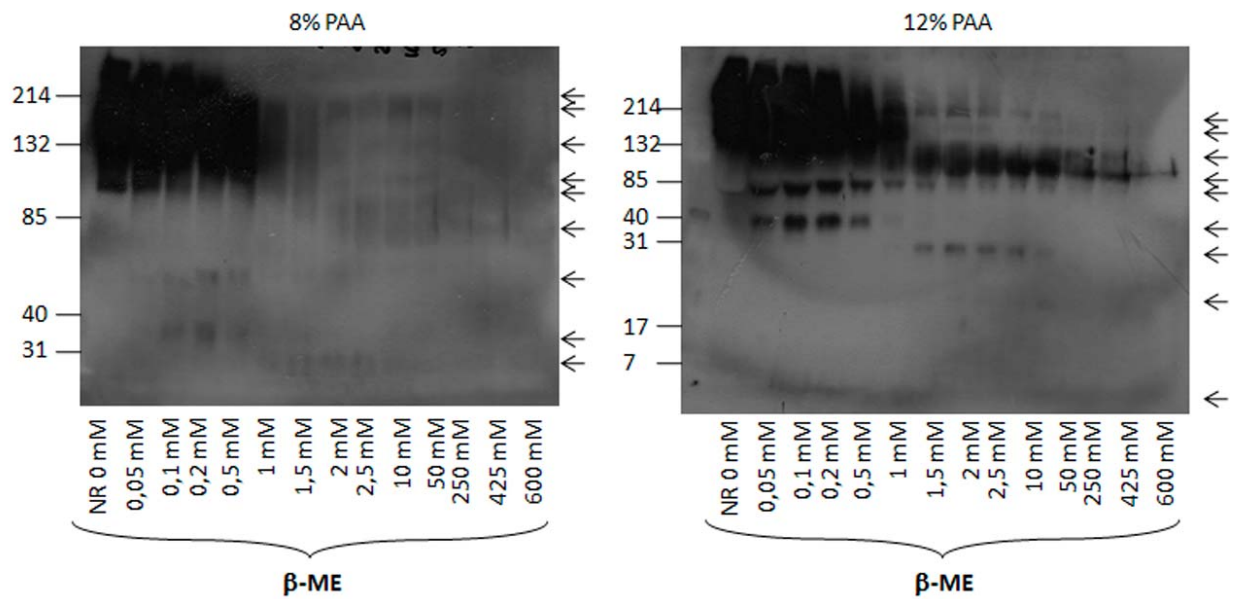
Die Anzahl der Multimer-Valenzen am Beispiel des Multimers pE51 sollte mit steigender Konzentration von β -Mercapto-Ethanol (β -ME) überprüft werden (siehe Methoden, 3.2.1), da Thiol-reduzierende Agenzien, wie β -ME, Disulfidbrücken in Cysteinhalten Proteinen

aufbrechen. Das Prototyp-Multimer C46-C4bp α konnte bei steigender β -ME-Konzentration schrittweise vom Heptamer zum Monomer reduziert werden (Dervillez et al. 2006).



4.17 Schrittweise Reduktion von pE51-Multimeren mit steigender β -Mercapto-Ethanol-Konzentration. Jeweils 10 μ l des pE51-Zellkultur-Überstandes wurden mit reduzierendem Ladepuffer in steigender β -Mercapto-Ethanol-Konzentration (0 mM/NR-600 mM/R) aufgekocht und auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen. Schwarze Pfeile symbolisieren die Zwischenstufen der reduzierten Multimere. Western Blot, Detektion mit α -His.

Wie auf dem Blot 4.17 ersichtlich ist, konnten die pE51-Multimere erst ab einer Konzentration von 0,5 mM β -ME reduziert werden. Die Intensität der stärkeren Banden um 111-150 kDa wurde erst ab 7,5 mM β -ME schwächer, wogegen die Monomerbande um 20 kDa reziprok stärker wurde. Es lassen sich einige Zwischenformen bei 40, 50 und 60 kDa beobachten (siehe Pfeile in Abb. 4.17). Theoretisch könnte es sich bei diesen Größenordnungen um Di-, Tri- und Tetramere handeln. Die Behandlung mit β -ME könnte möglicherweise auch eine schrittweise Reduktion der Sulfatgruppen an den Tyrosinen bewirkt haben, allerdings würden vorhandene oder nicht-vorhandene Sulfate im Molekulargewicht kaum auffallen.



4.18 Schrittweise Reduktion des N-terminalen CCR5 Multimers mit verschiedenen β ME-Konzentrationen. Jeweils 10 μ l des NTC-Zellkultur-Überstandes wurden mit reduzierendem Ladepuffer in steigender β -Mercaptoethanol-Konzentration (0 mM/NR-600 mM/R) aufgekocht und auf ein 8-(linker Blot), bzw. 12%-iges SDS-Gel (rechter Blot) aufgetragen. Western Blot, Detektion mit α -His.

In den obigen 12%igen PAA-Gelen erfolgte die Reduktion des NTC-Multimers schon ab 50 μ M (Abb. 4.18). Im Vergleich zum pE51 Multimer, bei dem eine sichtbare Reduktion erst ab 500 μ M auftrat, reagierte das NTC-Multimer scheinbar empfindlicher auf β -ME. Ab 50 μ M traten außer der starken Schmierbande zwischen 120 und 200 kDa zwei weitere Proteinbanden bei 40 und 85 kDa auf. Die Schmierbande könnte auf eine Überladung der Proben hindeuten (Banden 1-6), das Einsatzvolumen des Überstandes war jedoch für alle Proben gleich (20 μ l). Mit steigender β -ME-Konzentration nahm die Intensität jener Banden ab, wogegen im Bereich der Monomere, um 20 kDa, die Intensität der Banden leicht zunahm. Ab einer Konzentration von 1,5 mM β -ME konnte man erkennen, dass der Bandenschmier verschwand und dieser ursprünglich aus mindestens 2 Banden hervorging: 140 und 214 kDa. Interessanterweise korreliert eine Erhöhung der β -ME-Konzentration mit einer generellen Abnahme der Bandenintensität des NTC-Multimers. Möglicherweise werden mit steigender Konzentration des Reduktionsagens' auch Epitope der Multimere (z.B. der His-tag) geschädigt. Dies hätte zur Folge, daß der Erstantikörper diese geschädigten Epitope nur noch bedingt erkennt, was dann zu einem geminderten Signal des Zweitantikörpers führen könnte. Dies konnte im Western Blot mit dem pE51-Multimer (Abb. 4.17) nicht beobachtet werden, dort nahm der Anteil monomerer Proteine

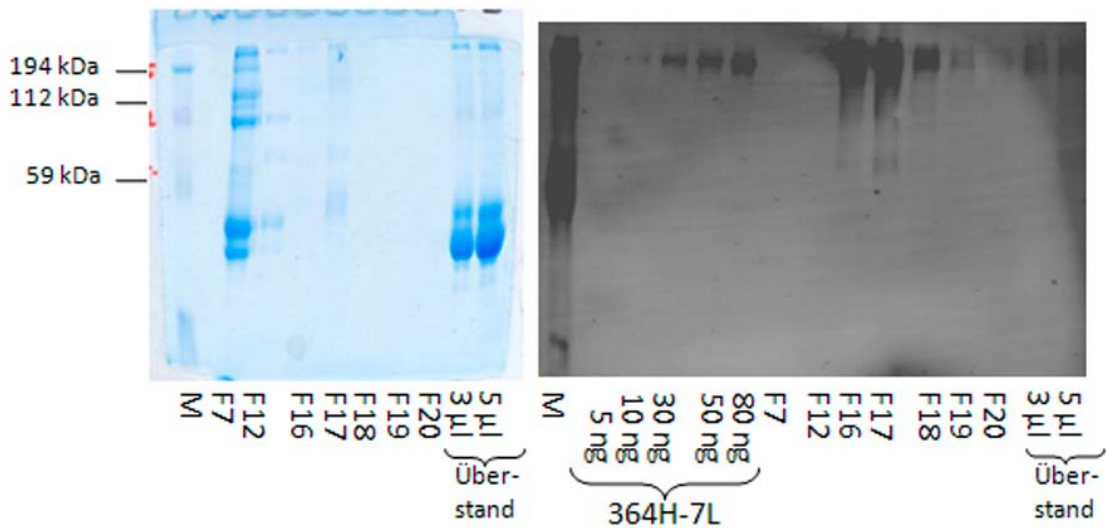
mit steigender β -ME-Konzentration stetig zu, gleichzeitig nahm die Intensität der Multimerbanden wie erwartet ab.

4.5 Aufreinigung der CCR5 Multimere über Affinitätschromatographie

Die Überstände mit den darin enthaltenen rekombinanten CCR5-Multimeren wurden affinitätschromatographisch mit Hilfe von His-Trap-Säulen und dem Äkta-Prime System (GE Healthcare, mit freundlicher Unterstützung von Thorsten Geier und Benjamin Dälken) aufgereinigt (siehe Methoden, 3.2.7). Die einzelnen Eluatsfraktionen wurden in Form eines Diagramms, welches die UV-Absorption der Fraktionen misst, dokumentiert. Die C46-Multimere wurden ebenfalls chromatographisch aufgereinigt, allerdings unter der Verwendung von 2F5-gekoppelten Antikörpern. Auf diese Aufreinigung wird in dieser Arbeit nicht eingegangen, sie wurde bereits in (Dervillez et al. 2006) publiziert.

4.5.1 Überprüfung der Eluatsfraktionen mittels Western Blot und Coomassie Gel

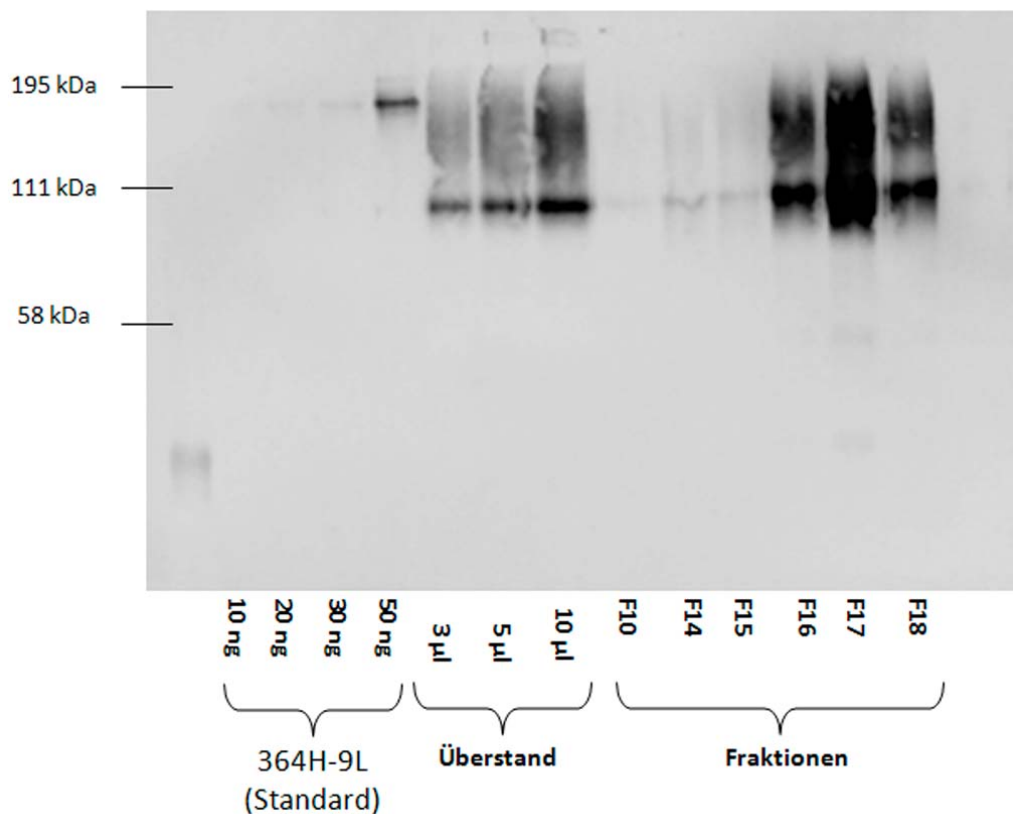
Die Elution der rekombinanten Proteine fand über einen Imidazolgradienten statt, dadurch wurden die His-tag Proteine mit steigender Imidazolkonzentration (bis 500 mM) eluiert (siehe Methoden 3.2.7). Anschliessend wurden insgesamt 22 Fraktionen mit jeweils 2 ml Eluat im Western Blot und Coomassie-Gel überprüft.



4.19 Elutionsfraktionen einer Aufreinigung von rekombinanten N-term. CCR5-Multimeren.

Fraktionen F7-F20 und unaufgeeinigte Überstände, Linkes Gel: Coomassie-Färbung, rechts: Western Blot mit α -His.

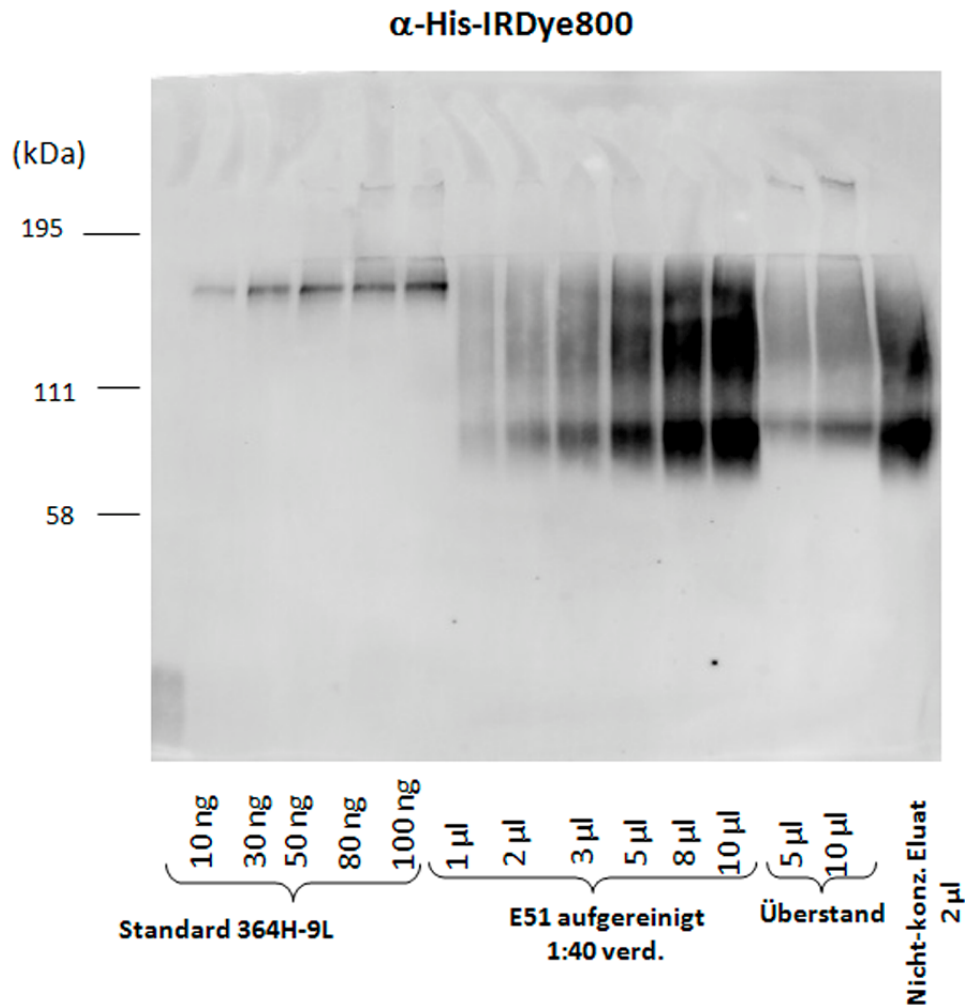
Die Waschschrirte der Fraktionen 1-12 mit der niedrigsten Imidazolkonzentration (20 mM) enthielten überwiegend natives Medium mit Proteinkontaminationen, gröÙtenteils durch angereichertes BSA, wie in Abb. 4.19 in F7 sichtbar ist. Der Säulenhersteller (GE Healthcare) gibt an, daÙ neben dem markierten Protein im Zellkulturmedium enthaltenes BSA ebenfalls eine hohe Affinität zu den His-Trap-Säulen hat. Somit ist auch die Kapazität der Säule erniedrigt, da BSA mit den His-Multimeren um die Ni^+ -Chelat-Bindung konkurrieren kann. Während der Elution wurde neben dem His-Multimer auch das BSA von den Säulen gespült, welches sich vorwiegend in den Fraktionen 7-15 (50-200 mM Imidazolgradient) wiederfand. Erst mit der höchsten Imidazolkonzentration (500 mM), wurden die Multimere (schwache Bande zwischen 80-90 kDa) verstärkt eluiert. Die höchste Konzentration der Multimere wurde in den Fraktionen 16-18 erreicht. Diese Fraktionen waren nahezu BSA-frei (starke Bande bei etwa 50 kDa) wie auf dem Coomassie-Gel zu sehen ist (Abb. 4.19, Coomassie-Gel) und wurden deshalb mit Hilfe von Amicon-Filter Röhrchen dialysiert (cut-off 50 kDa), aufkonzentriert und für funktionelle Assays verwendet. Der Western Blot der Eluatsfraktionen nach Aufreinigung des multimeren pE51 ist in Abb. 4.20 gezeigt.



4.20 Elutionsfraktionen einer Aufreinigung von rekombinanten pE51-Multimer. Western Blot, jeweils 2 µl der Eluatsfraktionen wurden im Vergleich zum Überstand vor der Aufreinigung (10 µl) aufgetragen und mit α -His mAB detektiert.

4.6 Quantifizierung der CCR5-Multimere mittels Western Blot

Die Quantifizierung der aufgereinigten und aufkonzentrierten Multimere erfolgte mit Hilfe vorhandener C46-Multimer-Standards (X. Dervillez). Die Überstände wurden als Vergleich vor der Aufreinigung ebenfalls quantifiziert. Zur genauen Berechnung der Proteinkonzentration wurde die Software *GelDoc* verwendet, mit welcher ein grafischer Vergleich der Multimerbanden unbekannter Konzentration mit den verwendeten C46-Standards möglich ist. Abbildung 4.21 zeigt als Beispiel die Quantifizierung des E51-Multimers nach Aufreinigung und die zugehörige Konzentrationsbestimmung per *GelDoc*-System. Die Konzentrationen wurden in ng/µl von der Software angegeben und anschliessend mit Hilfe des Molekulargewichts der Multimere in Molarität umgerechnet.



4.21 Quantifizierung des aufgereinigten und konzentrierten pE51 Multimers. *Western Blot, die aufgereinigten und aufkonzentrierten Fraktionen wurden verdünnt, in verschiedenen Volumina (1-10 µl) aufgetragen und mit dem α -His-IR-Dye 800 detektiert. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit dem GelDoc System, als Standard wurden 10-100 ng 364H-9L verwendet.*

Die aufkonzentrierten Multimere, hier am Beispiel von pE51 (Abb. 4.21), wurden 1:40 verdünnt wovon jeweils 1-10 µl aufgetragen wurden. Als Quantifizierungs-Vergleich diente das 364H-9L Multimer sowie der unaufgereinigte Überstand und 1 µl des ursprünglichen nicht-aufkonzentrierten Eluats. Verglichen mit dem Überstand, der etwa 150 nanomolarem E51 Multimer (Konz.: 17 ng/µl) entspricht, wurde durch den Aufreinigungs- und Konzentrierungsprozess ein hoher Anteil des aufgereinigten Proteins verloren (siehe Tabelle 4.4). Die Multimerkonzentration des Überstandes vor der Aufreinigung betrug 8,5 mg in 500 ml Überstand. Nach Dialyse und Aufkonzentrierung betrug das Endvolumen etwa 190 µl und hatte eine Gesamtkonzentration von 0,334 mg, was einem 25-fachen Verlust entsprechen würde.

Dieser Verlust kann zum Einen durch schlechte Affinität der Multimere zu den His-Trap-Säulen bei der Aufreinigung zustande gekommen sein, zum Anderen auch durch das Aufkonzentrieren mit den Amicon-Membran-Säulen. Bei letzterem Schritt gingen erneut Multimere verloren, was eventuell mit einer Adsorption der Multimere an die Filtermembran der Amicon-Säulen zusammenhängen könnte.

Tabelle 4.4

pE51	Konzentration ng/ μ l	Molarität/ nM
Überstand	17	110-160 (500 ml)
Eluat (nicht konzentriert)	170	1700 (6 ml)
Eluat auf-konzentriert	1760	18400 (190 μ l)

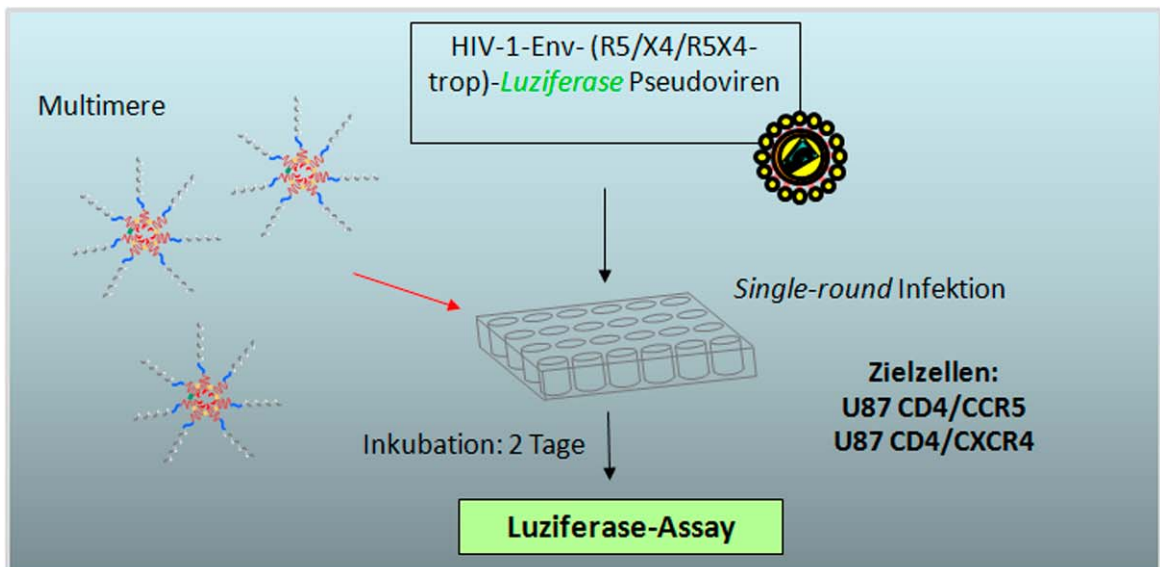
4.7 Funktionelle Tests zur Messung der antiviralen Aktivität der Multimere

Ziel der Arbeit war es, Multimere zu generieren, die den Eintritt von HIV-1 in Rezeptorzellen verhindern sollten. Um deren antivirale Aktivität zu prüfen, wurden die Multimere, bzw. T20 und weitere Peptide in Anwesenheit von verschiedenen HIV-1 Pseudoviren mit Targetzellen inkubiert. Es muss beachtet werden, dass die Konzentrationen der Peptide und Multimere in Molaritäten berechnet wurden, was zwar die gleiche Anzahl an Molekülen untereinander bedeutete, aber nicht die Anzahl der einzelnen Valenzen der Multimere berücksichtigte. Ein Schema dieser sogenannten „*single-round*-Infektionsassays“ ist in Abbildung 4.22 dargestellt.

Dazu wurden U87 CD4 CCR5 bzw. U87 CD4 CXCR4 Rezeptorzellen in Gegenwart der Multimere in Triplikaten mit den jeweiligen Pseudoviren transduziert. Die Transduktionseffizienz lag bei etwa 30% Infektion, was vorher in Titrationsversuchen mit den jeweiligen Pseudoviren (siehe Methoden 3.3.7, 3.3.9, Abb. 3.1) ausgetestet wurde. Demnach erfolgte die Transduktion der Zielzellen mit der gleichen Anzahl infektiöser Einheiten der jeweiligen Pseudoviren. Nach 48h wurde die Luziferase-Aktivität der zuvor lysierten Zielzellen in Form von relativen

Lichteinheiten mit einem Luminometer gemessen. Je höher die gemessenen Lichteinheiten waren, desto effizienter wurden die Zellen mit den Pseudoviren transduziert und desto niedriger war somit die HIV-1-hemmende Aktivität der rekombinanten Multimere.

Die relativen Lichteinheiten der Positivkontrollen, Zellen, welche nur mit dem Virus transduziert wurden, sind in jedem Versuch gemittelt worden (mindestens 6 Werte) und dienen als Basis, welche fiktiv 100% Infektion der Zellen entsprach. Ausgehend von dieser Positivkontrolle wurden dann die RLU-Werte lysierter Multimer- bzw. T20-behandelter Targetzellen im 3-Satz berechnet. Das Ergebnis der transduzierten Zellen in % wurde daraufhin von 100% (maximale Transduktion der Positivkontrolle) subtrahiert um die Entry-Hemmung in Prozent auszudrücken, die in jeder Grafik dargestellt wurde. Als Kontrollen dienten in allen Versuchen der Fusionsinhibitor T20 und das synthetische Peptid NTCp (freundlicherweise von Dr. Volker Klaukien zur Verfügung gestellt) die in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurden.



4.22 Schema der Inhibitionsassays. U87 CD4 CCR5 bzw. U87 CD4 CXCR4 Rezeptorzellen wurden in Anwesenheit verschiedener Multimere mit R5- bzw. X4-tropen Pseudoviren transduziert. Nach 2 Tagen Inkubationszeit wurde die Luziferaseaktivität gemessen.

Eine Liste der verwendeten Pseudoviren ist in Tabelle 4.5 dargestellt. Die Pseudoviren wurden von 293T Zellen verpackt, welche zuvor mittels 3-Plasmid-System mit den viralen Genen

transfiziert wurden (siehe Methoden, Kapitel 3.3.7). Die Viruspartikel wurden anschliessend aufkonzentriert, titriert und für die *single-round*-Infektionsassays verwendet.

Tabelle 4.5 Verwendete Pseudoviren und deren Tropismus.

Pseudovirus	Tropismus	Zielzellen
JRFL	R5	U87 CD4 CCR5
Ba-L WT	R5	U87 CD4 CCR5
Ba-L FH	R5	U87 CD4 CCR5
117.III	R5	U87 CD4 CCR5
HXB2	X4	U87 CD4 CXCR4
89.6	R5/X4 (Dual-trop)	U87 CD4 CCR5/ U87 CD4 CXCR4

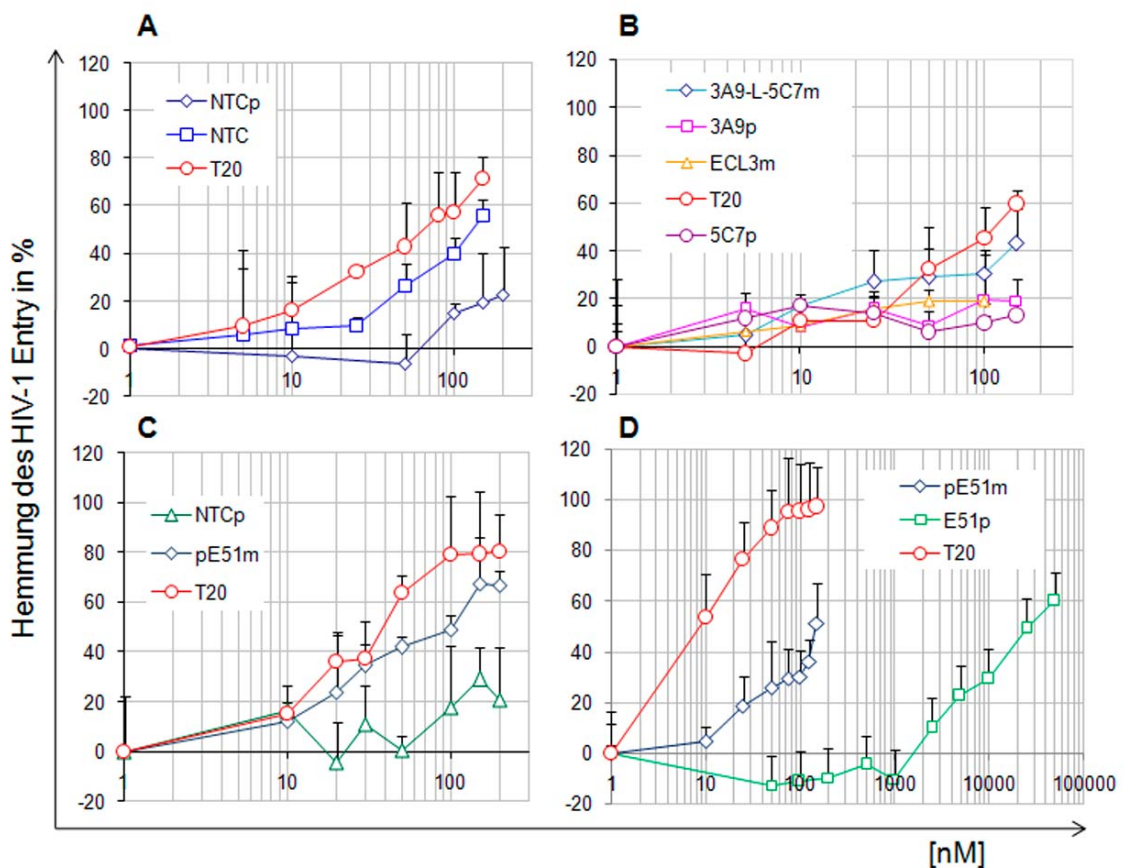
4.7.1 Hemmung des Eintritts von R5-tropen HIV-1 JRFL Pseudoviren

Die mit dem JRFL Env pseudotypisierten Viruspartikel wurden zur Transduktion von U87 CD4 CCR5 Zellen verwendet. In Gegenwart der Pseudoviren wurden verschiedene CCR5-Multimere in steigenden Konzentrationen auf antivirale Aktivität getestet.

In Abbildung 4.23 A konnte man eine konzentrationsabhängige Neutralisationskurve des NTC-Multimers beobachten. In niedrigen Molaritäten (0-10 nM) wurde nur ein leicht-hemmender Effekt, bis zu 20% Inhibition, verzeichnet. Die IC_{50} (Konzentration, bei der 50% des Virus neutralisiert wird) betrug für das multimeres „NTCm“ etwa 140 nM. Mit der maximalen Konzentration 150 nM konnte eine Inhibition von 80% erreicht werden. Aufgrund geringer Protein-Ausbeuten nach der Aufreinigung der NTC-Multimere konnten keine höhere Molaritäten getestet werden. Mit dem synthetischen monomeren Pendant NTCp konnte der HIV-1 Eintritt bei der maximalen Konzentration von 200 nM nur bis zu 20% verhindert werden. Höhere Konzentrationen des Peptids (bis 200 μ M) wurden in weiteren Versuchen getestet, führten jedoch nicht zur Verstärkung der antiviralen Aktivität (Dervillez et al., in Bearbeitung). Mit T20

konnte eine effektive Hemmung von 50% mit 60 nM erzielt werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass dieser Wert verglichen, mit den Versuchen in Abb. 4.23 C und D zu hoch ist.

In Abbildung 4.23 B wurden die synthetischen Peptide 3A9p und 5C7p und deren multimeres Kombinationspendant 3A9-L-5C7m auf ihre antivirale Aktivität hin untersucht. Auch in diesem Versuch konnte man einen kleinen Vorteil der Multimerisierung von Peptiden erkennen, indem die Multimer-Version der kombinierten 3A9-5C7 Peptide den HIV-1 Eintritt um ca. 40% (ab 150 nM) hemmte, wogegen die synthetischen Peptide kaum antivirale Aktivität aufwiesen. (Abb. 4.23 B). Die IC_{50} von T20 lag bei 125 nM und somit zu hoch. Wie auch bei den NTC-Multimeren konnten aufgrund der niedrigen Expression der 3A9-L-5C7 Multimere keine höheren Molaritäten ausgetestet werden. Dies gilt auch für das ECL3-Multimer, welches mit der höchsten Konzentration von 100 nM nur eine maximale Hemmung von 20% erreichte.

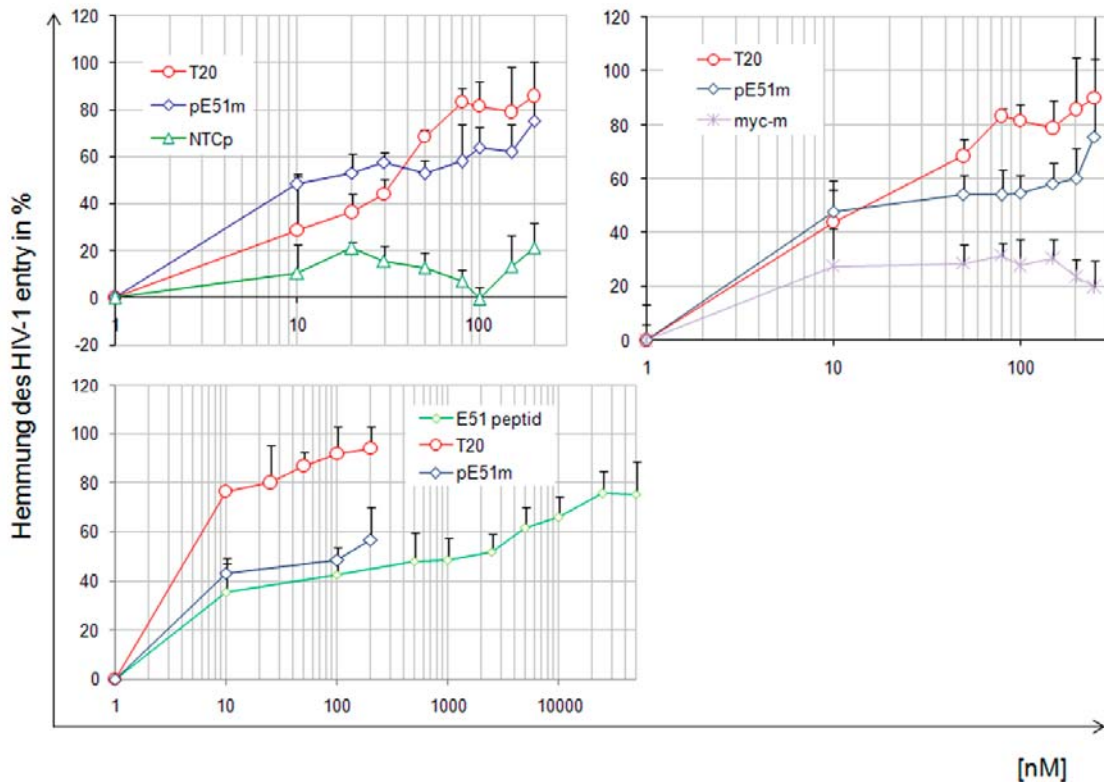


4.23 Hemmung von R5-tropen JRFL Pseudoviren. Single-round Infektion mit JR-FL verschiedenen CCR5 Multimeren NTCm, 3A9-L-5C7m, pE51m und ECL3m im Vergleich zu T20 und den synthetischen Peptiden 3A9p, 5C7p, NTCp und E51p.

Die Abbildungen 4.23 C und 4.23 D zeigen Versuche zum Test der pE51 Multimere im Vergleich zum synthetischen N-terminalen CCR5- (NTCp) bzw. zum E51-Peptid. In beiden Beispielen konnte eine bessere Hemmung von JRFL Pseudoviren mit multimerem pE51m bewirkt werden. Die IC_{50} für das pE51-Multimer betrug ca. 100 nM (Abb. 4.23 C) bzw. 70 nM (4.23 D), wobei eine maximale Hemmung von 70% (C) mit 150 nM bzw. 50% bei 150 nM erreicht wurde. Verglichen mit der IC_{50} von T20 (40 nM C, bzw. 10 nM D), lag diese jedoch deutlich höher. Das synthetische Peptid NTCp zeigte lediglich 20-25% Entry-Hemmungs-Aktivität (100-200 nM). In niedrigen Peptidkonzentrationen (Abb. 4.23 D, Grafik rechts) konnte eine Verstärkung der Infektion beobachtet werden, was sich in den Werten im Negativbereich widerspiegelt. Weitere Hemmversuche mit höheren Molaritäten des synthetischen pE51p zeigten jedoch, daß mit etwa 25 μ M eine 50%ige Inhibition von JRFL-Pseudoviren eintrat, mit 50 μ M Peptid konnten ca. 60% der JRFL Pseudoviren neutralisiert werden (Abb. 4.23 D).

4.7.2 Hemmung des Eintritts von R5-tropen HIV-1 Ba-L_wt Pseudoviren

Die Hemmung von HI-Viren, die mit dem Ba-L Hüllprotein pseudotypisiert wurden, ist in Abbildung 4.24 gezeigt. Als Kontrollen dienten sowohl das synthetische E51p Peptid, das CCR5 N-Terminus-Peptid NTCp, T20 und das c-myc-Multimer.



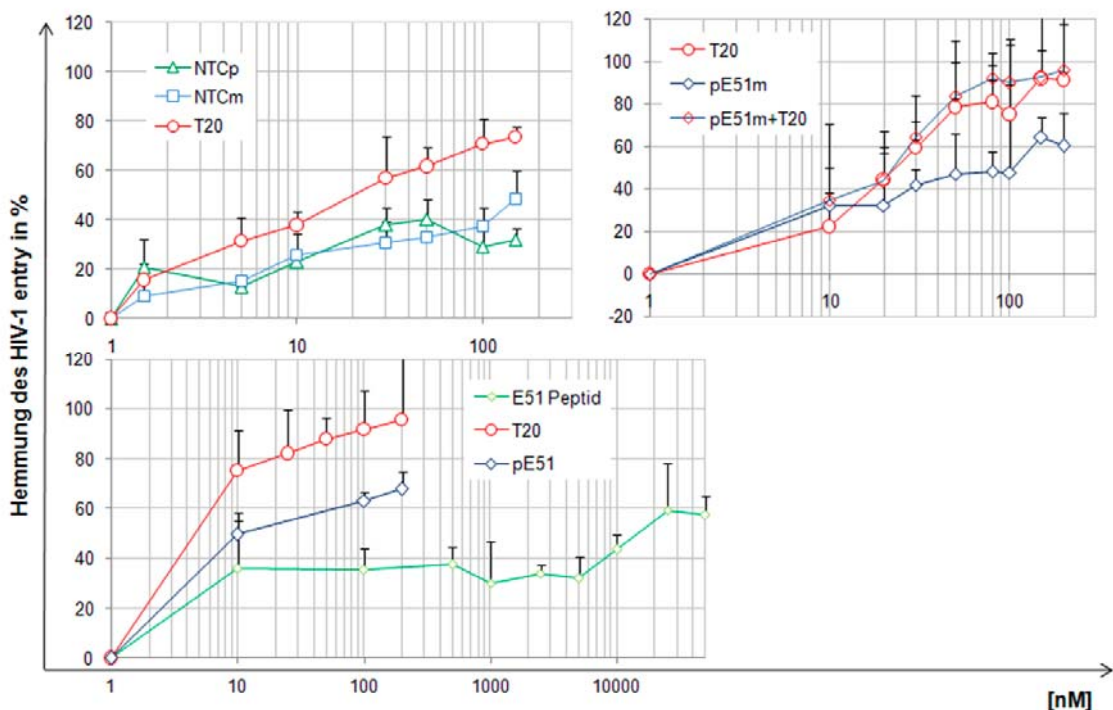
4.24 Hemmung von R5-tropen HIV-1 Ba-L_{wt} Pseudoviren durch Multimere. *Single-round Infektionsassay mit multimerem pE51m, synthetischem NTCp, T20 und multimerem c-myc (myc-m).*

Mit dem Multimer pE51m konnten Ba-L-Pseudoviren mit einer IC_{50} von etwa 20 nM (Abb. 4.24) neutralisiert werden. Interessanterweise konnte schon mit niedrigen Multimerkonzentrationen (20-20 nM) eine Hemmung zwischen 50 und 60% erzielt werden, wobei steigende Molaritäten zu einem Plateau-ähnlichen Verlauf führten und erst ab 200 nM nochmals ein deutlicher Anstieg der antiviralen Aktivität (80% Hemmung) zu verzeichnen war. Dagegen verlief die Hemmungskurve des Fusionsinhibitors T20 relativ linear, mit steigenden Molaritäten stieg auch die Hemmung proportional an. Die IC_{50} von T20 lag bei etwa 33 nM (Abb. 4.24 linkes Bild), bzw. 15 nM (Abb. 4.24, .rechtes Bild). Dagegen konnte mit dem synthetischen NTCp nur eine geringe Hemmung von maximal 20% erzielt werden. Die Hemmung von BaL-Env pseudotypisierten Viruspartikeln mit dem c-myc Kontroll-Multimer stieg mit zunehmender Molekülkonzentration auf knapp 30% (150 nM) an, wobei sich die Werte auch nach steigenden Konzentrationen auf ein Plateau-ähnliches Niveau zwischen 20 und 30% einpendelten (Abb. 4.24, rechtes Bild).

Mit dem synthetischen E51p konnte eine sehr gute konzentrationsabhängige Neutralisation verzeichnet werden (Abb. 4.24 untere Grafik), wobei die IC_{50} mit 10 μ M verglichen mit der von T20 oder dem E51 Multimer wesentlich höher lag (IC_{50} T20: 5 nM, IC_{50} Multi-E51: 100 nM).

4.7.3 Hemmung des Eintritts R5-troper HIV-1 117.III Pseudoviren

Im Falle der Hemmung von R5-tropen 117.III Pseudoviren konnte der Vorteil der Multimerisierung des NTC-Peptids in Konzentrationen zwischen 1 und 50 nM nicht beobachtet werden. Die Neutralisation mit dem NTC-Multimer hatte jedoch in höheren Molaren Konzentrationen (150 nM) eine Steigerung gegenüber dem NTCp um etwa 20%, und erreichte damit sogar die IC_{50} (Abb. 4.25, linkes Bild). Der Fusionsinhibitor T20 erreichte bei etwa 20 nM seine IC_{50} , die maximale Hemmung von nahezu 80% wurden mit 150 nM erreicht.



4.25 Hemmung des Eintritts von R5-tropen 117.III Pseudoviren. Single-round Infektionsassay von U87 CD4 CCR5 Zellen in Anwesenheit der pE51m Multimere, dem NTCp, dem E51p und T20.

Ob ein synergistischer Effekt des multimeren pE51m in Kombination mit T20 auftritt, wurde im nächsten Versuch behandelt (Abb. 4.25, rechtes Bild). Diese Fragestellung könnte nämlich im

Falle einer Therapiemöglichkeit mit multimeren CCR5-Peptiden aufgeworfen werden, falls schon eine Therapie mit T20 oder anderen Fusionsinhibitoren bestehen würde. Mit dem multimeren pE51m konnte eine bessere Hemmung als mit dem multimeren NTCm beobachtet werden. Die maximale Inhibition von 60% konnte mit 150 nM erreicht werden, während mit T20 die Hemmung in dieser Konzentration nahezu 100% betrug. Die Kombination von pE51m mit T20 konnte nur scheinbar eine Neutralisationsverbesserung hervorrufen (IC_{50} 25 nM). In den Konzentrationen zwischen 80 und 200 nM konnte zwar eine geringfügig verbesserte Hemmung der Kombination im Vergleich zu T20 erzielt werden. Da jedoch der Kurvenverlauf nahezu identisch mit dem von T20 alleine ist, kann der hemmende Effekt nicht auf eine synergistische Wirkung zurückgeführt werden.

In einem weiteren Versuch wurde das synthetische E51p im Vergleich zum multimeren pE51m getestet. Ein neutralisierender Effekt stellte sich schon ab 10 nM ein, dieser konnte jedoch mit steigender Konzentration nicht erhöht werden. Erst im höheren Mikromolaren Bereich, zwischen 10 und 25 μ M wurde eine Hemmung von bis zu 60% des 117.II Pseudovirusisolats verzeichnet (Abb. 4.25 untere Grafik). Das multimere E51m inhibierte schon ab 10 nM 50% des Viruseintritts, wobei die IC_{50} von T20 mit 5 nM noch niedriger war. Verglichen mit dem E51p Peptid war die hemmende Wirkung des E51-Multimers eindeutig effektiver.

4.7.4 Hemmung des Eintritts von X4-tropen HIV-1 HXB2-Pseudoviren

Es ist bekannt, dass R5-tropes gp120 zuerst an den N-Terminus und dann an die zweite ECL von CCR5 bindet {Liu, 2007 #267}. Das gp120 CXCR4-troper Viren bindet dagegen nur an die zweite extrazelluläre Schleife des CXCR4-Rezeptors (Carnec, 2005 #1939) (Labrosse, 2001 #641). Dennoch findet in beiden Rezeptoren eine Wechselwirkung mit den CD4i-Epitopen in gp120 statt und wird durch die AS-Sequenz in der V3-loop bestimmt. Es wurde daher untersucht, ob der Eintritt T-Zell-troper Pseudoviren in CXCR4 Targetzellen auch durch CD4i-bindende Multimere unterbunden werden kann, da mit diesen eine Bindung an die trimere ADA gp140 beobachtet wurde .

Wie in Abbildung 4.26 dargestellt ist, konnten auch T-trope HIV-1 Pseudoviren effektiv durch pE51-Multimere gehemmt werden. Die Neutralisationskurve des pE51-Multimers ähnelt sogar der von T20, die IC_{50} von T20 und dem pE51-Multimer ist identisch und liegt bei etwa 35 nM (Abb. 4.26 linkes Bild). Auch das synthetische NTCp konnte eine Hemmung von bis zu 55% erreichen (80 nM).

In einem weiteren Versuch wurde das synthetische E51p im Vergleich zu T20 auf seine hemmenden Eigenschaften untersucht (Abb. 4.26 rechtes Bild). Im Vergleich zum Multimer konnte man keinerlei antivirale Aktivität des Peptids erkennen. Es verstärkte sogar die Transduktionsraten der Zielzellen, da die Werte, bezogen auf die Positivkontrolle, im negativen Bereich lagen. Das multimere pE51m zeigte eine Konzentrationsabhängige Neutralisation von 1-50 nM, nahmen die Konzentrationen zu, wurde ein Plateau erreicht, in welchem nur eine geringe Zunahme der Hemmung beobachtet werden konnte. Eine erneute Zunahme der antiviralen Multi-pE51-Aktivität wurde mit 200 nM erreicht. T20 dagegen erreichte seine IC_{50} schon ab 25 nM, ab ca. 150 nM wurde der Eintritt der X4-tropen HXB2 Pseudoviren zu nahezu 100% inhibiert.

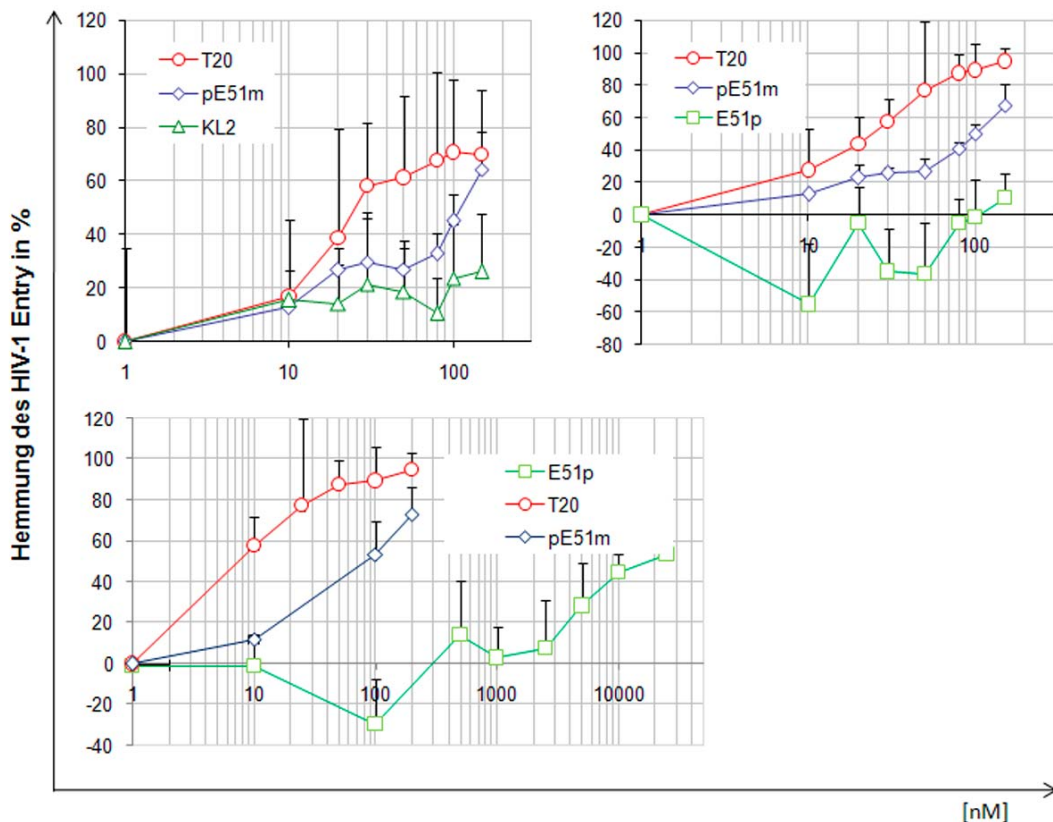


Abbildung 4.26: Hemmung des Eintritts von X4-tropen HXB2 Pseudoviren durch CCR5-Multimere. Single-round Infektionsassay von U87 CD4 CXCR4 Zellen in Anwesenheit der pE51m Multimere, dem NTCp, dem E51p und T20.

In höheren Konzentrationen (25 μ M) wurde mit dem E51p Peptid eine Hemmung von bis zu 55% erreicht. Dass niedrige Konzentrationen des Peptids zu einer Verstärkung der Virus-Transduktion führten, wurde erneut bestätigt (Abb. 4.26 unteres Bild).

4.7.5 Hemmung des Eintritts von dual-tropen HIV-1 89.6 Pseudoviren

Ob das multimere pE51 auch einen hemmenden Effekt auf den Eintritt von Viren hat, die sowohl CXCR4 als auch CCR5 als Corezeptor nutzen können, wurde anhand von dual-tropen 89.6 Pseudoviren in weiteren Inhibitionsassays getestet.

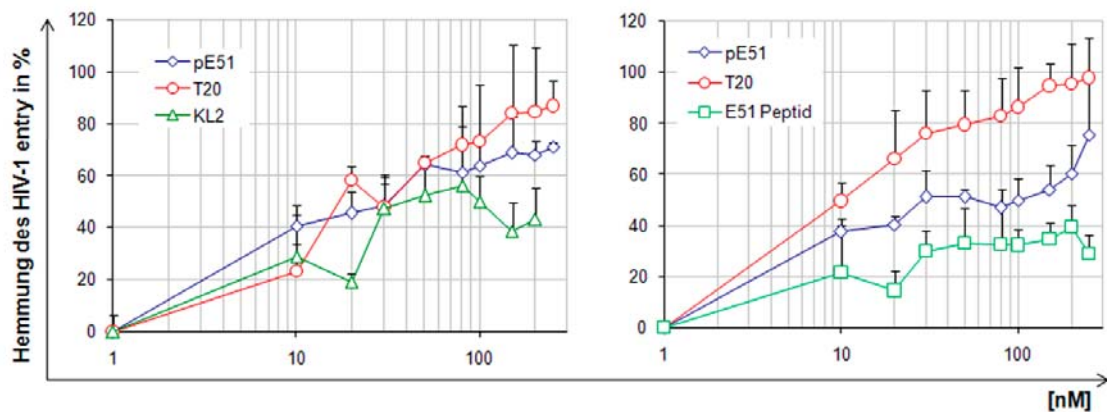


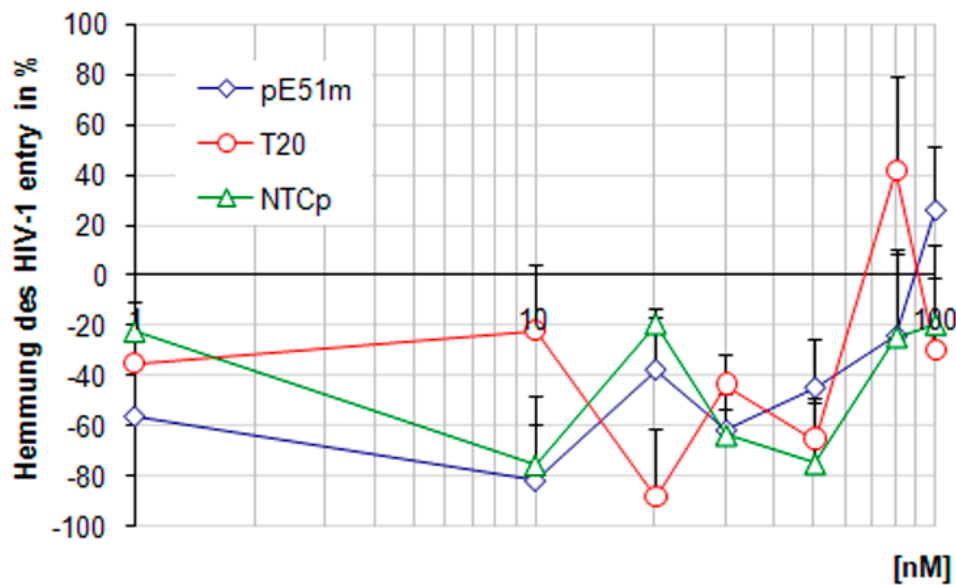
Abbildung 4.27: Hemmung von dual-tropen 89.6 Pseudoviren. Single-round Infektionsassay mit U87 CD4 CXCR4 Zellen in Anwesenheit von multimerem pE51m im Vergleich zu T20 und den synthetischen Peptiden E51p und NTCp.

Das multimeres pE51m zeigte eine ähnlich konzentrationsabhängige Neutralisation wie T20 (Abb. 4.27 linkes Bild), wobei im letzten Drittel der Neutralisationskurve die antivirale Aktivität des pE51-Multimers nicht an die von T20 heranreichte. Bis zu 50% konnte auch das NTCp-Peptid den Eintritt dual-troper Pseudoviren hemmen (80 nM), höhere Konzentrationen des Peptids hatten dagegen eine verminderte Inhibition zur Folge, wie man anhand des Kurvenverlaufs beobachten kann.

In einem weiteren Assay wurde auch das E51p untersucht, dessen antivirale Aktivität eine HIV-1 Entry-Hemmung zwischen 30 und 40% erreichte (Abb. 4.27, rechte Grafik). Dabei wurde ein Plateau beobachtet, so dass auch steigende Konzentrationen (30-200 nM) nur einen sehr moderaten Anstieg der Eintrittshemmung bewirkten. Wie auch schon in anderen Hemmversuchen beobachtet wurde, sank die Kurve bei der höchsten Konzentration erneut ab. Die IC_{50} von T20 dagegen lag bei 10 nM, ab ca. 150 nM wurde der Eintritt der dual-tropen Pseudoviren zu nahezu 100% inhibiert.

4.7.6 Hemmung des Eintritts von LCMV Pseudoviren

Eine Kontrolle zur Überprüfung der Virusspezifität wurde mit LCMV-Env pseudotypisierten Viren durchgeführt. LCMV kann ein sehr breites Spektrum von Zelllinien unterschiedlicher Spezies, unter anderem auch U87 CD4 CCR5 Zellen, über die Bindung des Hüllproteins gp1 an den Rezeptor α -Dystroglykan auf der Zelloberfläche infizieren (Cao et al. 1998).



4.28 Hemmung des Eintritts von LCMV-Pseudoviren. Single-round-Infektionsassay mit LCMV-pseudotypisierten Viren. Multimeres pE51m und die synthetischen NTCp und T20.

Sowohl mit T20 und NTCp als auch mit dem pE51 Multimer wurde eine Verstärkung der LCMV-Transduktion ausgelöst. Die Transduktionswerte waren im Vergleich zur Positivkontrolle wesentlich höher (Abb. 4.28). Nur in der höchsten getesteten Konzentration wurde eine Eintritts-Hemmung des pE51-Multimers von etwa 25% beobachtet. Dieses Phänomen konnte auch mit 80 nM T20 beobachtet werden und wäre somit zu vernachlässigen. Der Versuch zeigte jedoch, dass das multimeres pE51 keine hemmende Wirkung auf den Eintritt von LCMV hat und somit die in den HIV-1-Infektionsassays beobachtete Hemmung als spezifisch betrachtet werden kann.

Eine Zusammenfassung der Neutralisationsversuche wird in Tabelle 4.6 gezeigt.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Neutralisationsassays. Prozentuale Angaben bezeichnen die maximal erreichte Hemmung in %.

	IC ₅₀ [µM]				
	JRFL R5	Ba-L WT R5	117.II R5	HXB2 X4	89.6 R5/X4
ECL3m	20%				
NTCm	0,1-0,15		0,15		
pE51m	0,07-0,1	0,01-0,025	0,08	0,1-0,11	0,02-0,03
3A9-L-5C7m	40%				
Multi-myc		30%			
T20	0,4	0,05-0,035	0,2	0,25	0,01-0,015
Peptide	JRFL	Ba-L WT	117.III	HXB2	89.6
NTCp	20-25%	20%	40%	25%	70
E51p	25	2,5	15	25	40%

5 Diskussion

5.1.1 Therapeutische Peptide

Peptide erfüllen *in vivo* sehr vielfältige biologische Funktionen, z.B. wirkt das Insulin, der erste synthetisch hergestellte Peptidwirkstoff, als Hormon (Villa-Komaroff et al. 1978). Durch ihre Spezifität in regulatorischen Prozessen haben therapeutische Peptide ein enormes Potential, in Protein-Protein-Interaktionen einzugreifen und sind deshalb ideale Kandidaten zur Entwicklung von innovativen Medikamenten (Huther and Dietrich 2007). Mehr als 140 Peptide werden heutzutage klinisch genutzt, während sich weitere 400 in der präklinischen Phase befinden und im Durchschnitt einen jährlichen Zuwachs von etwa 15% aufweisen. Aus therapeutischer Sicht betrachtet, haben Peptide Vor- aber auch Nachteile, wenn man sie entweder mit größeren therapeutischen Antikörpern oder aber kleineren Wirkstoffmolekülen vergleicht. Der größte Vorteil der Peptide besteht in ihrer geringen Größe sowie ihrer hohen Aktivität und Spezifität. Im Gegensatz zu Antikörpern, sind unspezifische Nebenwirkungen selten und aufgrund ihres Aufbaus aus natürlichen Aminosäuren ist die Immunogenität minimiert. Außerdem akkumulieren Peptide nicht im Gewebe, sodass die Toxizität sehr gering ist. Die Nachteile der Peptide bestehen in ihrer schlechten oralen Bioverfügbarkeit, da sie durch das Gastrointestinale System sehr schnell abgebaut werden. Dies erfordert mehrfache Applikationen, welche mit Nebenwirkungen einhergehen und für den Patienten unangenehm sind. Deshalb werden neue Applikationsmethoden entwickelt, wie z.B. in Form von Depotmedikamenten, deren Wirkstoff langsam abgegeben wird aber auch in Form von Intranasalen- oder Pulmonalen Inhalationssprays (Dai et al. 2005).

Die in dieser Arbeit vorgestellte Multimerisierung kleiner Peptide wurde als Werkzeug, zur Erhöhung der Stabilität und des therapeutischen Potenzials genutzt. Multivalenz ist ein generelles Prinzip, das in biologischen Systemen zur Verstärkung molekularer Interaktionen führt. So können beispielsweise Antikörper und Komplementfaktoren C1q (Kishore and Reid 1999) bzw. C4bp (Blom 2002) strukturell multivalent sein, oder aber in Form von MHC-II (Lake et al. 1999) oder den T-Zell-Rezeptor/CD3/CD4-8-Komplex, funktionell multivalent sein.

Strukturelle Multivalenz hängt von der oligomeren Struktur des jeweiligen Moleküls ab. Die funktionelle Multivalenz bringt verschiedene Molekültypen in eine komplexe strukturelle Anordnung, die dadurch ein funktionelles Zusammenspiel ermöglichen (Alarcon et al. 2003). Die Protein-Oligomerisierung hat nicht nur funktionelle Vorteile, wozu eine höhere Bindungskraft und bessere Strukturstabilität gehören, sondern auch veränderte pharmakokinetische Eigenschaften *in vivo* (Willuda et al. 2001). Bisherige Systeme, die eine Multimerisierung ermöglichen, basierten auf Fc γ (Landolfi 1991), Leucin-Zipper (de Kruif and Logtenberg 1996), chemischen Polyethylen-Glykol-Verknüpfungen {Francis, 1998 #1976} und Diabodies (Holliger et al. 1993). Sie hatten allerdings den Nachteil, dass sie immunogen waren. Das Multimerisierungssystem sollte deshalb idealerweise aus humanem Plasma stammen, nicht immunogen sein und keinerlei biologische Funktionen haben, wie z.B. die Komplement-Aktivierung oder Rezeptor-Interaktionen. Diese Eigenschaften natürlich vorkommender Proteine können dazu verwendet werden, Oligomerisierungs-Domänen mit funktionellen Domänen miteinander zu kombinieren. Für diese Art von „*Protein-engineering*“ wurde der C-terminale Teil des humanen C4bp-Moleküls als Werkzeug verwendet, an welchen die relevanten Peptidsequenzen gentechnisch angeknüpft wurden (Libyh et al. 1997; Shinya et al. 1999; Christiansen et al. 2000; Oudin et al. 2000).

5.1.2 HAART und Entry-Inhibitorische Peptide

Nach Einführung der Reversen-Transkriptase- und Protease-Hemmer sanken die Todesfälle durch HIV-Infektionen signifikant ab (Hirschel and Opravil 1999), dennoch wird dieser antivirale Medikamentencocktail von etwa 25% der Patienten schlecht vertragen (Lucas et al. 1999). Mittlerweile treten auch Bedenken auf, was die Langzeit-Metabolischen Nebenwirkungen, z.B. im Fettstoffwechsel, bei der dauerhaften Einnahme von Protease-Inhibitoren betrifft. Ein weiteres Problem stellt das verstärkte Auftreten von Medikamenten-resistenten HIV-1 Stämmen dar (Yerly et al. 1999). Zusammengefasst bedeutet dies, dass neue Medikamente entwickelt werden müssen, um den klassischen HAART Medikamentencocktail zu ergänzen oder teilweise ganz zu ersetzen.

Entry-inhibitorische Peptide, die entweder mit dem Primärrezeptor CD4, dem Corezeptor CCR5 bzw. CXCR4 oder auch direkt mit dem viralen gp41 interagieren, sind die neuen Hoffnungsträger in der HIV-1 Therapie (zusammengefasst in (Huther and Dietrich 2007)). Sie wurden nach Identifizierung der Zelloberflächenrezeptoren, an die das Virus bindet, sowie durch neue Erkenntnisse über die viralen Protein-Strukturen, welche die Rezeptoren binden und den Viruseintritt vorantreiben, entwickelt. Die meisten Entry-Inhibitoren, die sich in klinischer Entwicklung befinden, sind entweder gegen die Hüllproteine der Viren gerichtet, oder gegen die Corezeptoren. So findet der erste Kontakt des viralen Hüllproteins gp120 durch die spezifische Interaktion mit dem CD4 Rezeptor auf der Targetzelle statt (Dalglish et al. 1984; Klatzmann et al. 1990). Die Interaktion führt zur Exposition der CD4-induzierten Epitope (Thali et al. 1993; Trkola et al. 1996; Wu et al. 1996). Diese können mit dem Corezeptor CCR5 oder CXCR4 der Zielzelle interagieren und führen zu einer weiteren Konformationsänderung in gp120 (Feng et al. 1996). Das Transmembranprotein gp41, wird dadurch aktiviert und inseriert in einem komplexen Ablauf, unter Ausbildung eines 6-Helix-Bündels, das Fusionspeptid in die Zielzellmembran (Lu et al. 1995; Chan et al. 1997; Tan et al. 1997; Caffrey et al. 1998). Es erfolgt die Fusion der viralen Membran mit der Membran der Rezeptorzelle. Neben T20, das schon in der Klinik zugelassen wurde, sind einige weitere vielversprechende fusionsinhibitorische Peptide, z.B. TRI-999, TRI-1144, Sifuvirtide und VIRIP sowie Chemokin-Analoga und kleine Wirkstoffmoleküle (z.B. TAK/Takeda) in der präklinischen Entwicklung (Dai et al. 2005; Dai et al. 2005; Dai et al. 2005; Dwyer et al. 2007; Munch et al. 2007) (Arenzana-Seisdedos et al. 1996; Dealwis et al. 1998) (Simmons et al. 1997; Loetscher et al. 1998; Ylisastigui et al. 1998; De Clercq 1999; Yang et al. 1999; Baba et al. 2000).

Gegenüber den klassischen HAART Medikamenten (Reverse Transkriptase- und Protease-Hemmer), können Entry Inhibitoren theoretisch den Viruseintritt vom ersten Schritt an, dem Andocken an die Zielzellen, verhindern, so daß diese erst gar nicht infiziert werden.

5.1.3 Intervention des HIV-1 Entry durch multimere CCR5-Peptide

Kritische Domänen bei der gp120-Interaktion mit den extrazellulären CCR5-Schleifen wurden durch Mutationsanalysen, chimäre Rezeptoren sowie durch Phage-Display Studien identifiziert (Doranz et al. 1997; Rabut et al. 1998; Konigs et al. 2007). Besonders die sauren und sulfatierten Tyrosinmotive im N-Terminus sind an der Bindung der CD4i-Epitope in der gp120 *bridging-sheet* beteiligt, sowie die ECL2, welche mit der V3-loop von R5-tropem gp120 interagiert (Trkola et al. 1996; Wu et al. 1996; Dragic et al. 1998; Farzan et al. 1998; Trkola et al. 1998). Basierend auf diesem Wissen, wurden CCR5-Peptide entwickelt, welche die Interaktion zwischen gp120 und CCR5 verhindern sollten (Olson et al. 1999; Cormier et al. 2000; Konigs et al. 2000). Einige Aminoterminus-modifizierte Chemokin-Analoga z.B. AOP-RANTES, NNY-RANTES und PSC-RANTES wurden bereits entwickelt, die effektiver als das native RANTES sind (Hartley and Offord 2005). Die antivirale Wirkung beruht auf der Rezeptor-Blockade und der Internalisierung des Rezeptors (Sequestrierung) von der Zelloberfläche (Pastore et al. 2003). Neben diesen agonistischen Molekülen existieren auch antagonistische Moleküle in Form von Antikörpern, z.B. gegen die ECL2 von CCR5 (HGS-Ab004, Abgenix), aber auch kleine Wirkstoffmoleküle, wie Maraviroc (Pfizer, (Dorr et al. 2005). Dennoch liegt die Affinität dieser vom CCR5-Rezeptor abgeleiteten Peptide zu gp120 im höheren Mikromolaren Bereich.

Das Ziel dieser Arbeit war es, therapeutische Peptide, wie das fusionsinhibitorische C46-Peptid oder CD4i-Epitop-bindende Peptide, mit Hilfe des C4bp-Systems so zu optimieren, daß diese nicht nur eine verbesserte Stabilität gegenüber den ursprünglichen Peptiden aufweisen, sondern auch deren antivirale Aktivität gesteigert wird. Das Multimerisierungssystem mit dem humanen C4bp basiert auf der Bildung von Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Monomeren, die durch *self-assembly* im Golgi-Apparat zu Multimeren verknüpft werden (Scharfstein et al. 1978; Hillarp and Dahlback 1990; Kask et al. 2002). Eine eukaryotische Expression dieser Fusionsmoleküle erlaubt posttranslationale Modifizierungen, die weitere Vorteile mit sich bringen. So sind für die CCR5-gp120-Interaktion O-sulfatierte Tyrosine im N-terminalen Bereich des Rezeptors ausschlaggebend für die Wechselwirkung mit den basischen

Seitenketten in gp120 und führen letztendlich zur Ausbildung des fusionsaktiven Zustands in gp41 (Farzan et al. 1999; Cormier et al. 2000). Die posttranslationalen Modifizierungen haben nicht nur den Vorteil bei der gp120-Interaktion, die rekombinanten Proteine werden dadurch auch als körpereigen erkannt und sind für das Immunsystem nicht mehr immunogen, was für therapeutische Proteine einen enormen Nutzen darstellt. Ein bivalentes α -CD4-RANTES-Fusionspeptid, wie in Mack et al beschrieben wurde, könnte auch das C4bp-System bieten (Mack et al. 1995). So könnten sich zwei verschiedene, bei der CD4/gp120/CCR5-Interaktion beteiligte Domänen in einem Multimer zu einem sogenannten Heteromultimer vereinigen, so dass eine simultane Bindung von CD4 und CCR5 erreicht werden könnte. Dies ist durch die Coexpression zweier bicystronischer Vektoren mit jeweils der C4bp α - und der β -Kette möglich (X. Dervillez) und wäre ein sehr vielversprechender Ansatz für die generelle Kombination verschiedener Funktionen in einem Molekül.

In dieser Arbeit wurde die Multimerisierung von Peptiden am Beispiel von CCR5-abgeleiteten Teilstrukturen bzw. von CD4i-Liganden durch die C-terminale C4bp-Domäne vorgestellt. Die wichtigsten Ergebnisse werden hier kurz zusammengefasst:

- Es konnten verschiedene C4bp α -Multimere rekombinant hergestellt werden, die entweder aus C46- oder aus CCR5-abgeleiteten extrazellulären Domänen bestanden
- Die CD4i-bindenden Multimere pE51 und NTC konnten sehr effizient in den Zellkulturüberstand sekretiert werden
- Eine Optimierung der Kulturbedingungen durch Subklonierung und verstärkten Selektionsdruck steigerte die Proteinexpression bei den Multimeren ECL1, NTC und ECL3
- Durch Protein-Protein-Interaktionsstudien konnte die Funktionalität der CD4i-Epitop-bindenden (pE51m) bzw. vom CCR5-abgeleitete Multimere (ECL2-SDM) bestätigt werden
- Die Multimerisierung der Peptide E51 und NTC führte zu einer Verbesserung der inhibitorischen Aktivität, die Multimere konnten im Vergleich zu den synthetischen Peptiden den Eintritt verschiedener HIV-1 Pseudoviren effizienter hemmen

5.1.4 Posttranslationale Modifizierungen der CCR5 Multimere

Bei den CCR5-Multimeren war die eukaryotische Expression aufgrund bestimmter posttranslationaler Modifizierungen, der Sulfatierung und Phosphorylierung, von Vorteil. Dies könnte auch der Grund sein, weshalb bei einigen Multimeren das anhand der AS-Sequenz theoretisch berechnete Molekulargewicht vom Proteinbandenmuster auf dem Western Blot abwich. Da es weder *N*- noch *O*-Glykosylierungsstellen in den CCR5-Multimeren gab, muss davon ausgegangen werden, dass die abweichenden Molekulargewichte von Multimeren herrühren, deren Valenz nicht ausschliesslich heptamer ist. So könnten neben Tetra- und Pentameren theoretisch auch Okta- Nona- und Dekamere entstanden sein. Die Phosphorylierung und Sulfatierung von Tyrosinen im NTCm und pE51m ist sehr wahrscheinlich. Ein Sulfat- bzw. Phosphatrest ist sehr klein (2 Da) und würde als solcher, auch wenn er mindestens 7-fach multipliziert werden würde, keinen sichtbaren Größenunterschied im SDS-Gel bewirken.

Deutliche Abweichungen vom theoretisch errechneten Molekulargewicht wurden bei den Multimeren ECL1 und ECL3 beobachtet. Das Molekulargewicht des ECL1 Multimers (88 kDa) hat mit den detektierten Banden aus dem Western Blot (58 kDa und 140 kDa) keine Übereinstimmung gezeigt. Da die beiden Multimere ECL1 und ECL3 in ihrer Sequenz ein Cystein aufwiesen, liegt die Vermutung nahe, daß dieses mit den Cysteinen aus der C4bp-Domäne des Multimers eine bzw. mehrere Disulfidbrückenbindungen eingegangen ist. Eine korrekte Faltung von Proteinen spielt eine entscheidende Rolle bei ihrer Sekretierung ins Cytoplasma und anschliessend aus der Zelle heraus. Die Bildung von Disulfidbrücken wird durch „Faltungshilfsproteine“, den Protein-Disulfid-Isomerasen, bewerkstelligt und außerdem nur bei sekretorischen Proteinen ausgebildet (Bardwell 1994; Raina and Missiakas 1997). Es muss jedoch berücksichtigt werden, daß die theoretischen Molekulargewichte aus dem 7-fachen eines Monomers (ECL1 12,5 kDa) berechnet wurden. Somit könnte es sich auch um 11-Mere (140 kDa) bzw. um Pentamere (58 kDa) handeln. Dies wäre eventuell auch der Grund, weshalb keine einheitlichen Heptamere entstanden, wie bei den C46-Multimeren beobachtet wurde, was sich auch in der inhomogenen Reduktion der Multimere mit β -ME widerspiegelte

(siehe Ergebnisse Abb. 3.17, 3.18). Auch die zweite ECL enthielt ein Cystein. Interessanterweise konnten die ECL2-SDM-Multimere auch nach der Mutation des Cysteins im Zellkulturüberstand kaum nachgewiesen werden. Die verstärkte Sekretion der pE51- und NTC-Multimere könnte eventuell auf die sulfatierten und/oder phosphorylierten Tyrosine zurückzuführen sein, die ihrerseits zu einer verbesserten Löslichkeit beigetragen haben könnten.

5.1.5 Funktionelle Charakterisierung der CD4i-bindenden Multimere

Studien mit chimären CCR5-Rezeptoren konnten zeigen, dass mehrere extrazelluläre Regionen des CCR5 an der HIV-1-Bindung und dem Entry-Prozess beteiligt sind (Atchison et al. 1996; Doranz et al. 1997). Von vielen Punktmutationen, die in der CCR5-Region durchgeführt wurden, konnten nur wenige die gp120-Bindung signifikant beeinträchtigen (Dragic et al. 1998; Farzan et al. 1998; Rabut et al. 1998). Elektrostatische Analysen deckten die Dipol-Charaktäre des CCR5 und des gp120-Kerns auf (Liu et al. 2003). So wurde in den extrazellulären Domänen von CCR5 ein negativer Pol gefunden, und in der Cytoplasmatischen Domäne ein stark positiver Pol. Auch innerhalb der extrazellulären Domänen gibt es elektrostatische Unterschiede: Während der N-Terminus ein dominierend negatives elektrostatisches Potenzial aufweist, ist das elektrostatische Potenzial der zweiten extrazellulären Schleife positiv. Dennoch liegen innerhalb des N-Terminus auch positiv geladene Aminosäuren, so wie es auch in der ECL2 negativ geladene gibt, welche somit zur Stabilisierung des Komplexes beitragen (Zhang et al. 2006). Obwohl die ECL2 hauptsächlich an der Bindung von Chemokinen beteiligt ist, konnten Navenot et al. zeigen, daß sie auch an der CCR5-Corezeptoraktivität mit M-tropen Hüllproteinen beteiligt ist (Navenot et al. 2001). Im Strukturmodell von CCR5 im Komplex mit gp120 und CD4 interagiert der ausgedehnte saure N-Terminus zuerst mit der *bridging sheet* in gp120. Die daraus resultierenden Konformationsänderungen im N-Terminus bringen die V3-loop nahe an die ECL2 Domäne. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bindungsstellen für Chemokine und gp120 auf CCR5 zwar unterschiedlich aber dennoch überlappend sind. So ist der N-Terminus wichtig für die gp120-Bindung, während ECL2 weitere

Konformationsänderungen im HIV-1 Hüllprotein induziert und im Tropismus der HIV-1 Hüllproteine eine wichtige Rolle spielt (Labrosse et al. 2001; Carnec et al. 2005; Liu et al. 2007).

Diverse Bindungsstudien mit gp120/CD4-Komplexen und Peptiden aus dem N-terminalen Bereich von CCR5 zeigten, dass besonders die sulfatierten Peptide die Bindung des gp120-CD4-Komplexes an CCR5 oder bzw. an gp120-Antikörper verhindern konnten (Cormier et al. 2000; Farzan et al. 2000). Die Tyrosinsulfate interagieren mit einer hochkonservierten Tasche innerhalb der gp120 V3-loop sowohl von R5- als auch von X4-Isolaten, wodurch diese Region als ein äußerst vielversprechendes therapeutisches Ziel angesehen wird (Cormier and Dragic 2002; Suphaphiphat et al. 2003; Dorfman et al. 2006). Deshalb wurde mit dem pE51-Multimer eine funktionelle Interaktionsstudie durchgeführt, da aus Literaturangaben bekannt war, dass die sulfatierte CDR3-Region des Antikörpers E51 an CD4i-Epitope bindet und damit antivirale Aktivität zeigen konnte (Dorfman et al. 2006). Die AS-Sequenz der CDR3-Region von pE51 ähnelt mit ihren sulfatierten Tyrosinen dem N-Terminus:

pE51: GDY...ADYDGGYYDMD

CCR5 NTC: MDYQVSSPIYDI N YVTSE

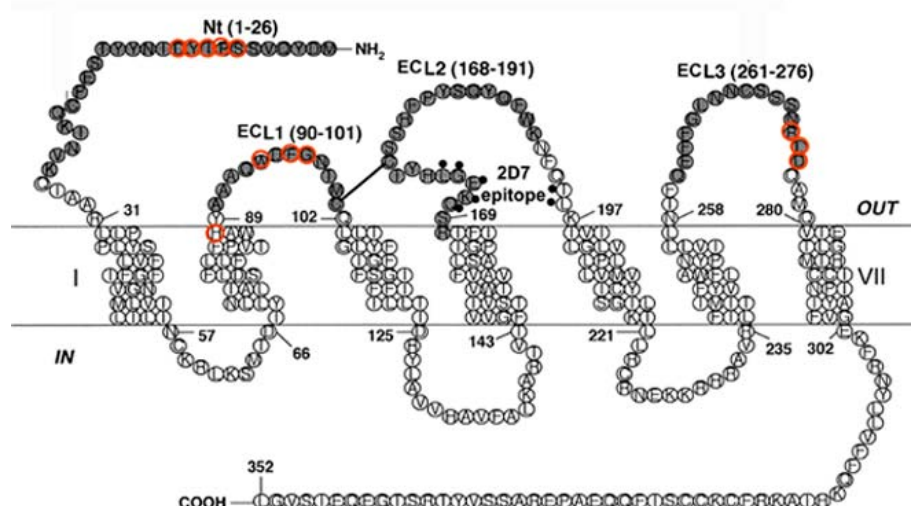
In Dorfman et al. wurde beobachtet, dass Fusionspeptide, die dem N-Terminus von CCR5 ähnlich sind (pΔE51), eine verbesserte antivirale Aktivität aufweisen als Peptide, die direkt vom N-Terminus abgeleitet wurden. Warum dies so ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass der Austausch hydrophober AS, die normalerweise zum CCR5-Zentrum weisen, durch Glycine, die Löslichkeit und Flexibilität des Peptids erhöht haben. So könnte die Entfernung der AS zwischen dem 3. und 10. Tyrosin (siehe oben) die Bindung eines zusätzlichen Tyrosinsulfats an gp120 erlauben, während die Faltung einer dazwischen liegenden Schleife vermieden wird, was wiederum zugunsten der Entropie wäre.

Eine *in vitro* Simulation des Bindungsschrittes von CD4-gebundenem gp120 an CCR5 kurz vor dem viralen Zelleintritt wurde mittels ELISA nachgestellt. Für diese Interaktionsstudie wurde die Kombination des multimeren pE51 mit trimerem HIV-1 Env im Beisein von löslichem CD4

gewählt. Es konnte beobachtet werden, daß die multimerisierte Version des pE51 mit HIV-1 ADA gp140 in CD4-abhängiger Weise wechselwirken konnte. Die Interaktion des trimeren HIV-1 Envs mit löslichem humanen CD4 würde in der gp120-Region CD4i-Epitope zum Vorschein bringen, welche dann wiederum mit den negativ geladenen AS-Resten des pE51-Multimers interagieren könnten. Auch wenn die lineare AS-Sequenz der pE51-Domäne im Multimer höchstwahrscheinlich kein konformationelles Epitop wie im N-Terminus von CCR5 darstellt, könnten die darin enthaltenen Tyrosinsulfate und die sauren Aspartatreste dennoch mit der konservierten Tyrosinsulfat-bindenden Tasche wechselwirken. Durch die hohe Anzahl saurer und hydrophober AS kann eine Ladungsabhängige Interaktion vermutet werden. Während die V3-Schleife M-troper Viren eine Nettoladung von +1 bis +5 aufweist, haben T-trope Viren eine kationische Nettoladung von +6 bis +10 (Chesebro et al. 1992; Kwong et al. 2000). Damit wäre eine Interaktion mit der negativen Gesamtladung der AS-Reste des pE51-Multimers erklärbar. Die beobachtete Wechselwirkung zwischen pE51 und dem trimeren HIV-1 Env im ELISA korreliert mit den in dieser Arbeit durchgeführten Inhibitionsassays. Demzufolge scheint es eine relativ stabile Affinität des pE51-Multimers zu HIV-1 Env zu geben, was sich auch in einer effizienten Entry-Blockierung bemerkbar gemacht hat.

Ob ähnliche Wechselwirkungen auch mit anderen CCR5-Multimeren stattfinden, wurde durch eine weitere Protein-Protein-Interaktionsstudie untersucht. Der monoklonale Maus-Antikörper 2D7 wurde zur Interaktion mit dem ECL2-Multimer getestet, da dieser an die ECL2 im nativen CCR5 bindet und R5-trope HI Viren sehr effizient neutralisieren kann (Khurana et al. 2005). Bedingt durch die lineare Struktur der ECL2-Sequenz war eine Interaktion mit einem Antikörper, der gegen ein konformationelles CCR5-Epitop gerichtet ist, eher unwahrscheinlich. Die zweite extrazelluläre Schleife ist die längste der 3 extrazellulären Domänen (30 AS) und bildet durch das darin enthaltene Cystein (C^{178}) eine Disulfidbrücke mit dem Cystein in ECL1 (C^{101}), wodurch die zweite Schleife eingeknickt wird (siehe Abb. 5.1). Durch das mutierte Cystein hat die ECL2-Sequenz im ECL2-SDM-Multimer vermutlich eine andere Konformation als im nativen Rezeptor. So könnte die AS-Kette entweder linear oder auch durch ihre Länge und die Linkerregion flexibel vorliegen. Es konnte eine deutlich nachweisbare Wechselwirkung des

ECL2-Multimers mit dem 2D7 Antikörper im ELISA beobachtet werden, während das NTC-Multimer und der Kontroll-Zellkulturüberstand, wie erwartet, nur schwach oder gar nicht an den Antikörper binden konnten (siehe Kapitel 4.3.6, Abb. 4.14). Der Antikörper 2D7 bindet an die Teil-Epitope $^{170}\text{QKEGL}^{174}$ und $^{195}\text{TL}^{196}$ in der ECL2 (siehe Abb. 5.1), kompetitiert dadurch mit den natürlichen Liganden RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β und verhindert folglich die Chemotaxis (Wu et al. 1997; Olson et al. 1999; Navenot et al. 2001). Diese Epitope sind auch im Multimer ECL2-SDM enthalten, das $^{195}\text{TL}^{196}$ Teil-Epitop ist jedoch 20 AS weit entfernt vom $^{170}\text{QKEGL}^{174}$ Teil-Epitop. In der Originalkonformation des CCR5 Rezeptors liegen diese Teil-Epitope dicht beieinander und bilden zusammen die Konformationsepitope, die von 2D7 erkannt werden. Die weitere Entfernung der beiden relevanten Bindungsstellen würde für eine geringere Affinität des Antikörpers sprechen, da die Epitope möglicherweise nicht in derselben konformellen Anordnung wie in der Original CCR5-ECL2 vorliegen. Theoretisch könnten die einzelnen Multimerarme durch ihre flexible Gelenkregion auch derart versetzt zueinander angeordnet sein, dass die beiden relevanten Erkennungs-Epitope wieder in unmittelbarer Nähe positioniert liegen und dadurch vom Antikörper erkannt werden.



5.1 Der CCR5-Rezeptor in seiner Aminosäuresequenz. Die Nummerierung beginnt am N-Terminus, die Aminosäuren der extrazellulären Domänen sind grau unterlegt, die Epitope des Antikörpers 2D7 sind als schwarze Punkte in der ECL2 eingezeichnet, die der Antikörper 3A9 und 5C7 wurden rot umrandet. Die Verbindung zwischen ECL1 und ECL2 entsteht durch eine Disulfidbrücke. Aus (Konigs et al. 2007).

Auch in einer Immunopräzipitation konnte die Interaktion des ECL2-SDM-Multimers mit 2D7 bestätigt werden, wogegen der Antikörper im Western Blot das denaturierte ECL2-Multimer nicht erkannte. Weil 2D7 bestimmte Epitope der ECL2 nur in nativer, konformationeller Struktur erkennt, war dies jedoch zu vermuten. Das Einfügen zweier Cysteine an die jeweiligen Enden der ECL2-Sequenz könnte eventuell zu einer cyclischen Struktur führen, die wiederum eine höhere Ähnlichkeit zur Original ECL2-Schleife aufweisen würde. Dabei wäre allerdings zu beachten, dass dann möglicherweise die korrekte Disulfidbrückenbildung in der C4bp-Domäne gefährdet ist.

5.1.6 HIV-1 Pseudoviren werden von CCR5-Multimeren im Nanomolaren Bereich gehemmt

Zur Messung der antiviralen Aktivität der verschiedenen CCR5-Multimere wurden Rezeptorzellen in *single-round* Infektionsassays mit pseudotypisierten HIV-1- und LCMV-Env Hüllproteinen transduziert. Unterschiedliche Tropismen der HIV-1 Pseudoviren könnten darüber Auskunft geben, ob ein Zusammenhang zwischen der hemmenden Eigenschaft von CD4i-bindenden Multimeren und der Corezeptor-Präferenz besteht, da Inhibitionsstudien mit Peptiden aus den ECLs aus CCR5 ein Env-abhängiges Inhibitionsmuster zeigten (Cormier et al. 2000; Farzan et al. 2000; Agrawal et al. 2004).

5.1.6.1 Dual-trope 89.6P Pseudoviren reagieren sehr empfindlich auf CCR5-Multimere

Das dual-trope 89.6 Isolat wurde sowohl von den Multimeren als auch von T20 am besten gehemmt, was die niedrigen IC_{50} -Werte (20-30 nM pE51-Multimer, 5-10 nM T20) widerspiegeln. Das Isolat konnte auch vom synthetischen NTC Peptid inhibiert werden, das alle anderen getesteten Pseudoviren nur schwer hemmen konnte (bis maximal 40%). Wahrscheinlich hängt die höhere antivirale Aktivität der Multimere mit der Fusionskinetik der 89.6 Hüllproteine zusammen. So könnte die Eintrittskinetik des 89.6 langsamer sein als bei X4- und R5-tropen Isolaten, wodurch das Zeitfenster, in dem konformationelle Änderungen stattfinden und zur Exposition der CD4i Epitope führen, größer wäre. Mit diesem Zeitvorsprung hätten die CD4i-bindenden Multimere an die Epitope andocken können, wodurch die folgenden Fusionschritte unterbrochen und gestoppt worden sind.

5.1.6.2 Unterschiedliche Ergebnisse bei der Hemmung R5-troper Pseudoviren

Unter den R5-tropen Isolaten (JRFL, Ba-L_wt und 117.III) liess sich JRFL durch CCR5-Multimere und T20 am schlechtesten hemmen, was mit der beschriebenen starken CCR5-Corezeptoraffinität des Virus korrelieren würde. Bei R5-tropen Viren ist die Fusionskinetik höher als bei X4-tropen Isolaten (Doranz et al. 1999; Derdeyn et al. 2000; Derdeyn et al. 2001; Reeves et al. 2002; Abrahamyan et al. 2005). Dies ist auch der Grund, weshalb die Empfindlichkeit gegenüber T20 geringer ist. Eine schnelle Fusionskinetik R5-troper Viren lässt einer Intervention durch CCR5-Multimere möglicherweise wenig Zeit, sodaß der Fusionsprozess nur noch mit hohen Wirkstoffkonzentrationen verhindert werden kann. Die Affinität zum CCR5-Rezeptor könnte stärker als nur zu einer Teilregion von CCR5 innerhalb eines Multimers sein, womit das Virus nicht schon vorher „abgefangen“ werden könnte. Dies traf für die Hemmung des JRFL zu, verglichen mit den beiden anderen R5-tropen Isolaten war die IC_{50} höher. Andererseits ist die bessere Hemmung R5-troper Pseudoviren im Vergleich zu X4-tropen Viren auch durch die Corezeptoraffinität selbst erklärbar. Von Peptiden bzw. Multimeren, die vom CCR5 abgeleitet wurden, erwartet man natürlich eine affinere Bindung mit dem R5-tropen Hüllprotein als mit dem X4-troper Viren.

5.1.6.3 X4-trope Pseudoviren sind gegenüber CCR5-Multimeren insensitive

Die Bindung des CXCR4-Rezeptors an X4-tropes gp120 verläuft im Vergleich zur Bindung R5-troper Viren an den CCR5-Rezeptor anders (Dragic 2001). So sind für die Interaktion R5-troper Viren der NTC und die ECL2 des CCR5-Rezeptors vorwiegend involviert (Cormier et al. 2001; Cormier and Dragic 2002), während für die CXCR4-Interaktion hauptsächlich die Bindung an die CXCR4 ECL2 vorrangig ist (Labrosse et al. 2001; Carnec et al. 2005). Die Inhibition des X4-tropen Isolats HXB2 durch CCR5-Multimere war deshalb vermutlich weniger effektiv im Vergleich zur Hemmung R5- und dual-troper Pseudoviren. In einer Studie, in der sulfatierte Peptide aus dem N-Terminus von CCR5 auf Entry-Inhibition getestet wurden, konnte man eine ähnliche Beobachtung machen. Die NTC-Peptide konnten den Eintritt des dual-tropen HXB2 nicht hemmen, wogegen der R5-trope JRFL bis zu 50% neutralisiert werden konnte (Cormier et al. 2000). Möglicherweise ist die schwächere Hemmung mit einer niedrigeren Affinität von X4-

tropem gp120 zu CCR5 und somit auch zu CCR5-abgeleiteten Peptiden begründet. Dennoch war es nicht abwegig, dass auch CXCR4-trope Viren von multimeren pE51 inhibiert werden, da beide Corezeptoren an die CD4i-Epitope binden.

5.1.7 An CD4i-Epitop-bindende Multimere zeigten gute HIV-1-neutralisierende Eigenschaften

Dass die CD4i-Epitop-bindenden Multimere den Eintritt verschiedener HIV-1 Pseudoviren bis zu 85% verhindern konnten, würde auch mit vielen Literaturangaben übereinstimmen, bei denen sulfatierte Peptide aus dem N-Terminus oder sulfatierte, dem N-Terminus-ähnliche Fusionspeptide HIV-1-hemmende Eigenschaften aufwiesen (Cormier et al. 2000; Farzan et al. 2000; Agrawal et al. 2004; Dorfman et al. 2006). Dennoch konnte bei den in dieser Arbeit durchgeführten Inhibitionsassays keine 100%ige Hemmung erreicht werden, was möglicherweise in der molekularen Natur der gp120-CCR5-Interaktion begründet ist: Interagiert gp120 mit Membran-gebundenem CD4 und exponiert daraufhin seine CCR5-Bindestellen, könnte gp120 die Interaktion mit dem Membrangebundenen CCR5-Rezeptor gegenüber den löslichen CD4i-bindenden-Multimeren vorziehen. Andererseits haben die mit CCR5 Rezeptorgen stabil transfizierten Zelllinien (U87 CD4CCR5/CXCR4) eine wesentlich höhere Dichte der Corezeptoren auf ihrer Zelloberfläche im Vergleich zu primären Makrophagen oder T-Zellen (Platt et al. 1998; Lee et al. 1999), was ein weiterer Grund dafür sein könnte, weshalb die Inhibition in manchen Fällen nur niedrig gewesen ist. Möglicherweise lässt sich eine bessere Hemmung auf primären Blutzellen (PBMCs) erzielen, welche weniger CCR5 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen.

Da der N-Terminus im Original CCR5 in seiner Konformation nicht ganz so eingeschränkt ist wie die relativ flexiblen ECLs, wäre eine lineare NTCm bzw. pE51m Multimer-Struktur von Vorteil. Ein wünschenswerter Effekt wäre die synergistische Wirkung von T20 in Kombination mit CD4i-bindenden-Multimeren. Weil T20 alleine jedoch eine sehr niedrige IC_{50} hat, konnte man einen synergistischen Effekt mit pE51m bei R5-tropen 117.III Pseudoviren nicht beobachten. Interessant wäre die Kombination vom pE51m mit einem schlechteren Inhibitor, beispielsweise mit einem Multimer aus einer der 3 extrazellulären Domänen, welches an ein

anderes Epitop in gp120 als das pE51m binden könnte. Auch die Kombination der zweiten ECL von CCR5 mit T20 könnte einen synergistischen Effekt mit sich bringen. Theoretisch könnte das multimerere ECL2 mit der V3-loop, die zuvor an CD4 gebunden hat, interagieren, wodurch das Transmembranprotein durch Konformationsänderungen in gp120 aktiviert werden würde. An dieses könnte wiederum T20 binden und den weiteren Ablauf im Fusionsprozess stoppen.

5.1.8 Hat die Größe der C4bp-Multimere einen Vorteil gegenüber kurzen Peptiden?

Die hervorragende HIV-1-neutralisierende Eigenschaft von T20 beruht hauptsächlich in seiner Größe und Spezifität. T20 kann direkt in die Furche der ersten Heptad Repeat in gp41 binden, wodurch die Zusammenfaltung mit der HR2 und somit die Ausbildung des 6-Helix-Bündels blockiert wird (Furuta et al. 1998; Kliger and Shai 2000). Ein Multimer ist weitaus sperriger als ein kurzes Peptid, wobei seine Arme durch die Gelenkregion durchaus flexibel sind. Mit einem Molekulargewicht zwischen 80 und 120 kDa erreicht es annähernd die Größe eines Antikörpers (150 kDa). Die für die gp120-CCR5-Interaktion kritischen Domänen liegen in der vierten konstanten (C4) und der V3-loop Region von gp120 (Cormier et al. 2000; Farzan et al. 2000; Cormier et al. 2001). Es ist unwahrscheinlich, dass jeweils ein Arm mit der jeweiligen CD4i-bindenden Sequenz mit je einem Viruspartikel interagieren kann und somit 7 Viruspartikel auf einmal neutralisiert, da zur erfolgreichen Bindung eines gp120-Trimers auch mehrere CR5-Corezeptoren erforderlich sind (Kuhmann et al. 2000). Denkbar wäre jedoch die Bindung mehrerer Multimerarme an ein gp120-Trimer in Anwesenheit von CD4. Für dieses Szenario müssten sich ein oder mehrere CCR5-Multimerarme genau in der Lücke zwischen Rezeptorzellen-Oberfläche und Viruspartikel, das gerade mit CD4 interagiert hat, befinden. Dann könnten die CCR5-Teilstrukturen der Multimere an die CD4i-Epitope binden und somit weitere gp120-Interaktionen mit dem zellulären CCR5 vermeiden.

Der Größenvorteil des kurzen T20 Peptids gegenüber den C46-Multimeren zeigte sich in einer effektiveren Hemmung der Pseudoviren, wogegen bei den synthetischen CCR5-Peptiden ein umgekehrter Effekt beobachtet wurde. Die multimerisierten CD4i-bindenden Peptide haben eine weitaus effektivere Hemmung gezeigt als die monomeren NTCp und E51p Peptide. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte die Affinität des NTCp- bzw. E51p Peptids

zum viralen Hüllprotein sehr niedrig gewesen sein, was möglicherweise auch der Grund war, weshalb eine Hemmung des viralen Eintritts erst in sehr hohen Konzentrationen zu verzeichnen war (siehe Ergebnisse, Abb. 4.23-26). Zum anderen kann auch ein schneller Abbau der synthetischen Peptide dazu geführt haben, dass nicht mehr genügend Wirkstoff vorhanden war um den Zelleintritt der Pseudoviren zu verhindern. Diese Theorie würde sich zwangsläufig auch bei T20 stellen, allerdings ist die Affinität von T20 zur HR1 wesentlich höher als vermutlich die der CCR5-abgeleiteten Peptide zu gp120, was eine Abnahme der T20-Konzentration durch proteolytischen Abbau wiederum ausgleichen würde. In vielen Studien, in welchen CCR5-Peptide zur Hemmung von HIV-1 Entry verwendet wurden, fand eine Eintrittshemmung erst in Konzentrationen im Mikromolaren Bereich statt (Cormier et al. 2000; Farzan et al. 2000; Agrawal et al. 2004) und korreliert somit auch mit den hier erhaltenen Ergebnissen.

5.1.9 Veränderung der pharmakokinetischen Eigenschaften durch Multimerisierung?

Ein weiterer Vorteil der Multimerisierung bezieht sich auf die Biodistribution von Monomeren und Multimeren *in vivo*. C46- Multi- und Monomere sowie das c-myc-Multimer wurden mit radioaktivem Jod¹²⁵ bzw. Jod¹³¹ markiert und in Mäusen pharmakokinetisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Verteilung im Körper zugunsten der Multimere ausfiel. Es konnte beobachtet werden, dass die C46-Multimere bevorzugt in der Leber akkumulierten, während die C46-Monomere nach kurzer Zeit im Nierenfiltrat detektiert wurden, was gleichzeitig deren schnelle Eliminierung bedeutet. Im Gegensatz zum hydrophoben C46-Multimer wurde das c-myc-Multimer überwiegend im Blutkreislauf wiedergefunden, die Akkumulation in der Leber war verzögert (Dervillez et al. 2006). Mit den CD4i-bindenden Multimeren wurden diese Studien noch nicht durchgeführt, würden aber vermutlich zu ähnlichen Ergebnissen wie dem c-myc-Multimer führen, da die Multimere keinen hydrophoben Charakter haben.

5.1.10 Vergleich von Multimeren in der Proteintherapie und C46 in der Gentherapie

Die CD4i-bindenden Multimere und das vom N-Terminus abgeleitete Multimer hatten gegenüber den synthetischen Peptiden wesentlich bessere hemmende Eigenschaften, wobei T20 noch potentere HIV-1 inhibitorische Aktivität aufwies.

In (Dervillez et al. 2006) konnte eine erfolgreiche Hemmung von HIV-1 Pseudoviren durch eukaryotisch sekretierte C46-Multimere verzeichnet werden. Diese waren an einer Stelle der C46-Sequenz *N*-glykosyliert und wiesen eine verbesserte Hemmung nach enzymatischer Deglykosylierung auf. Nicht-glykosylierte, bakteriell exprimierte C46-Multimere, die während einer Diplomarbeit parallel zu dieser Arbeit generiert wurden, zeigten eine effektivere HIV-1 Entry-Hemmung im Vergleich zu eukaryotisch-exprimierten („Prokaryotische Expression HIV-1 inhibitorischer Multimere“, Diplomarbeit Tim Krüger). So kann das C46-System auch im prokaryotischen System angewendet werden, indem ein spezieller *E.coli*-Stamm (*Origami B*, *Rosetta-gami*) genutzt wird, der im bakteriellen Periplasma Disulfidbrücken bildet. Die Tatsache, dass bei der bakteriellen Expression keine *N*-Glykosylierung stattfindet, hatte speziell im Fall von multimerem C46 deshalb einen Vorteil. Es bleibt jedoch zu bedenken, ob diese Multimere im Hinblick auf eine HIV-Therapie einsetzbar wären. Vermutlich sind die Multimere durch bakterielle, körperfremde posttranslationale Modifizierungen hochgradig immunogen und toxisch.

Angesichts ihrer mindestens 7 Valenzen (Heptamere) war die HIV-1 inhibitorische Wirkung der eukaryotisch exprimierten C46-Multimere im Vergleich zum Fusionsinhibitor T20 nicht besser. Dementsprechend hätten entweder nur 1/7 der Multimerkonzentration oder umgekehrt, die 7-fache Konzentration des T20 Peptids eingesetzt werden müssen. Die molare Konzentrationsberechnung, bezogen auf die Anzahl der Wirkstoff-Moleküle, wurde für die Versuche beibehalten, um einen direkten Bezug zum klinisch relevanten Versuchsmaßstab zu haben.

Die in der von Laer Gruppe am Georg-Speyer-Haus entwickelte HIV-1-Gentherapie, basierend auf einem retroviralen Vektor, welcher für ein membranständiges C46-Peptid codiert (maC46),

konnte ebenfalls eine gute HIV-inhibitorische Wirkung *in vitro* erzielen (Hildinger et al. 2001). Der Vektor wurde sogar für eine klinische Studie Phase I/II zugelassen, mit welchem die T-Lymphozyten 10 HIV-1-infizierter Patienten transduziert und reinfundiert wurden (Egelhofer et al. 2004). Man hoffte, dass sich die kleine, mit dem *maC46* Gen transduzierte Zellpopulation aufgrund des Selektionsvorteils gegenüber nicht-transduzierter, und somit ungeschützter Zellen, im Verlauf der Infektion anreichern würde, was zur Eliminierung des Virus geführt hätte. Ebenso wäre ein sogenannter „*bystander effect*“ wünschenswert, der sich auf die Abgabe löslicher C46-Proteine der Genmodifizierten Zellen bezieht und somit auch die Nachbarzellen schützen könnte. Durch die vermutlich zu geringe Anzahl genmodifizierter Zellen trat dieser Effekt leider nicht auf (van Lunzen et al. 2007). Dennoch ist eine Gentherapie mit schwer einzuschätzenden Risiken verbunden. Die Problematik liegt hauptsächlich in der Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Rekombination mit anderen, gleichzeitig präsenten viralen Genen, wodurch das Virus seine Pathogenität wiedererlangen kann und zu schweren biologischen und ökologischen Folgen führen würde.

Die Risiken sind bei einer Proteintherapie wesentlich geringer. So ist das C4bp-System zur Multimerisierung von Peptiden für therapeutische Zwecke durchaus geeignet, da es durch seinen natürlichen Aufbau weder immunogen noch toxisch für die Zellen ist. Durch die systemische Applikation von therapeutischen Peptiden oder Multimeren bei der Proteintherapie könnten im Gegensatz zur Gentherapie alle betroffenen Zellen geschützt werden. Auch wenn die HIV-inhibitorische Wirkung der Multimere nicht ganz so effektiv ist als die von T20, liegt ihr großer Vorteil in einer längeren Plasma-Halbwertszeit und Stabilität (Dervillez et al. 2006). Idealerweise könnten die Multimere nur alle 2 Tage oder sogar seltener appliziert werden, wodurch mehrfach tägliche Applikationen, wie mit T20, zugunsten des Patienten wegfallen würden.

Da CD4i-Epitop-bindende Multimere in Entry-Inhibitionsassays eine neutralisierende Wirkung erzielen konnten, wäre der nächste Schritt die Testung der Multimere bei der Infektion von primären humanen Blutzellen (PBMCs) mit Wildtyp HIV-1, was einer *in vivo*-Situation näher kommen würde. Die Corezeptor-Dichte auf primären T-Zellen und Makrophagen ist im

Vergleich zu stabil transfizierten U87 CD4 CCR5/CXCR4 Zielzellen niedriger (Platt et al. 1998; Lee et al. 1999), wodurch sogar eine Senkung der IC_{50} denkbar wäre. Außerdem wäre es interessant, die Biodistribution der CD4i-Epitop-bindenden Multimere *in vivo*, z.B. in Mäusen, zu beobachten.

Für diese Versuche werden höhere Mengen an Multimeren benötigt. Ein hoher Peptidverbrauch würde wiederum bedeuten, dass die Expression der Multimere verstärkt werden muss. Eine Optimierung der Expressionsrate könnte in Form von effizienteren Zelllinien, alternativen Expressionsvektoren und einer optimierten Aufreinigung erfolgen. Es wäre interessant zu erfahren, ob humane Leberzellen, welche das C4bp *in vivo* produzieren und in den extrazellulären Raum sezernieren (Marcovina et al. 1991), die Expression der C4bp-Fusionsproteine fördern würden. Ein alternatives Expressionsplasmid für CHO Zellen (pEE12.4 Lonza) könnte für eine zukünftige Multimerexpression und zur Weiterführung des Projektes eingesetzt werden. Die prokaryotische Expression der CCR5-Multimere wäre für CD4i-Liganden nicht von Vorteil, da posttranslationale Sulfatierungen und Phosphatierungen, die unabdingbar für die gp120-Interaktion sind, wegfallen würden.

6 Literatur

- Abrahamyan, L. G., S. R. Mkrtychyan, J. Binley, M. Lu, G. B. Melikyan and F. S. Cohen (2005). "The cytoplasmic tail slows the folding of human immunodeficiency virus type 1 Env from a late prebundle configuration into the six-helix bundle." *J Virol* **79**(1): 106-15.
- Agrawal, L., Z. VanHorn-Ali, E. A. Berger and G. Alkhatib (2004). "Specific inhibition of HIV-1 coreceptor activity by synthetic peptides corresponding to the predicted extracellular loops of CCR5." *Blood* **103**(4): 1211-7.
- Alarcon, B., D. Gil, P. Delgado and W. W. Schamel (2003). "Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers." *Immunol Rev* **191**: 38-46.
- Albert, J., B. Abrahamsson, K. Nagy, E. Aurelius, H. Gaines, G. Nystrom and E. M. Fenyo (1990). "Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera." *Aids* **4**(2): 107-12.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy and E. A. Berger (1996). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." *Science* **272**(5270): 1955-8.
- Allaway, G. P., K. L. Davis-Bruno, G. A. Beaudry, E. B. Garcia, E. L. Wong, A. M. Ryder, K. W. Hasel, M. C. Gauduin, R. A. Koup, J. S. McDougal, et al. (1995). "Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates." *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(5): 533-9.
- Antoni, S., N. Walz, M. Landersz, M. Humbert, C. Seidl, M. T. Dittmar and U. Dietrich (2007). "Genetic and Biological Characterization of Recombinant HIV Type 1 with Env Derived from Long-Term Nonprogressor (LTNP) Viruses." *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**(11): 1377-86.
- Aramori, I., S. S. Ferguson, P. D. Bieniasz, J. Zhang, B. Cullen and M. G. Cullen (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.
- Arenzana-Seisdedos, F., J. L. Virelizier, D. Rousset, I. Clark-Lewis, P. Loetscher, B. Moser and M. Baggiolini (1996). "HIV blocked by chemokine antagonist." *Nature* **383**(6599): 400.
- Arenzana, N. and S. Rodriguez de Cordoba (1996). "Promoter region of the human gene coding for beta-chain of C4b binding protein. Hepatocyte nuclear factor-3 and nuclear factor-1/CTF transcription factors are required for efficient expression of C4BPB in HepG2 cells." *J Immunol* **156**(1): 168-75.
- Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., R. C. Sowder, 2nd, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J. C. Chermann and L. E. Henderson (1992). "Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines." *Science* **258**(5090): 1935-8.
- Atchison, R. E., J. Gosling, F. S. Monteclaro, C. Franci, L. Digilio, I. F. Charo and M. A. Goldsmith (1996). "Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines." *Science* **274**(5294): 1924-6.

- Baba, M., H. Miyake, M. Okamoto, Y. Iizawa and K. Okonogi (2000). "Establishment of a CCR5-expressing T-lymphoblastoid cell line highly susceptible to R5 HIV type 1." *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(10): 935-41.
- Baeuerle, P. A. and W. B. Huttner (1987). "Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification." *J Cell Biol* **105**(6 Pt 1): 2655-64.
- Bannert, N., S. Craig, M. Farzan, D. Sogah, N. V. Santo, H. Choe and J. Sodroski (2001). "Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH₂-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines." *J Exp Med* **194**(11): 1661-73.
- Bardwell, J. C. (1994). "Building bridges: disulphide bond formation in the cell." *Mol Microbiol* **14**(2): 199-205.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-71.
- Berger, E. A. (1998). "Introduction: HIV co-receptors solve old questions and raise many new ones." *Semin Immunol* **10**(3): 165-8.
- Berger, E. A., P. M. Murphy and J. M. Farber (1999). "Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease." *Annu Rev Immunol* **17**: 657-700.
- Berson, J. F., D. Long, B. J. Doranz, J. Rucker, F. R. Jirik and R. W. Doms (1996). "A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains." *J Virol* **70**(9): 6288-95.
- Beyer, W. R., H. Miletic, W. Ostertag and D. von Laer (2001). "Recombinant expression of lymphocytic choriomeningitis virus strain WE glycoproteins: a single amino acid makes the difference." *J Virol* **75**(2): 1061-4.
- Bieniasz, P. D. and B. R. Cullen (1998). "Chemokine receptors and human immunodeficiency virus infection." *Front Biosci* **3**: d44-58.
- Blanpain, C., B. J. Doranz, J. Vakili, J. Rucker, C. Govaerts, S. S. Baik, O. Lorthioir, I. Migeotte, F. Libert, F. Baleux, et al. (1999). "Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein." *J Biol Chem* **274**(49): 34719-27.
- Blanpain, C., F. Libert, G. Vassart and M. Parmentier (2002). "CCR5 and HIV infection." *Receptors Channels* **8**(1): 19-31.
- Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski and T. A. Springer (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." *Nature* **382**(6594): 829-33.
- Blom, A. M. (2002). "Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein." *Biochem Soc Trans* **30**(Pt 6): 978-82.
- Blom, A. M., L. Kask and B. Dahlback (2003). "CCP1-4 of the C4b-binding protein alpha-chain are required for factor I mediated cleavage of complement factor C3b." *Mol Immunol* **39**(10): 547-56.

- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *Embo J* **18**(7): 1723-9.
- Burton, D. R. and D. C. Montefiori (1997). "The antibody response in HIV-1 infection." *Aids* **11 Suppl A**: S87-98.
- Bushman, F. D., T. Fujiwara and R. Craigie (1990). "Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro." *Science* **249**(4976): 1555-8.
- Caffrey, M., M. Cai, J. Kaufman, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, D. G. Covell, A. M. Gronenborn and G. M. Clore (1998). "Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41." *Embo J* **17**(16): 4572-84.
- Cao, W., M. D. Henry, P. Borrow, H. Yamada, J. H. Elder, E. V. Ravkov, S. T. Nichol, R. W. Compans, K. P. Campbell and M. B. Oldstone (1998). "Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus." *Science* **282**(5396): 2079-81.
- Carnec, X., L. Quan, W. C. Olson, U. Hazan and T. Dragic (2005). "Anti-CXCR4 monoclonal antibodies recognizing overlapping epitopes differ significantly in their ability to inhibit entry of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **79**(3): 1930-3.
- Cen, S., A. Khorchid, H. Javanbakht, J. Gabor, T. Stello, K. Shiba, K. Musier-Forsyth and L. Kleiman (2001). "Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **75**(11): 5043-8.
- Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger and P. S. Kim (1997). "Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein." *Cell* **89**(2): 263-73.
- Chen, B., E. M. Vogan, H. Gong, J. J. Skehel, D. C. Wiley and S. C. Harrison (2005). "Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core." *Nature* **433**(7028): 834-41.
- Chen, Z., L. Hong, Z. Li, D. Fan, Q. Huang, H. Wang, Z. Li and Z. Xu (2006). "Preparation and characterization of four novel monoclonal antibodies specific to N51(L6)C46 polypeptide simulating fusogenic core structure of GP41 subunit of HIV-1." *Hybridoma (Larchmt)* **25**(5): 278-82.
- Chesebro, B., K. Wehrly, J. Nishio and S. Perryman (1992). "Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism." *J Virol* **66**(11): 6547-54.
- Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, et al. (1996). "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates." *Cell* **85**(7): 1135-48.
- Christiansen, D., P. Devaux, B. Reveil, A. Evlashev, B. Horvat, J. Lamy, C. Roubourdin-Combe, J. H. Cohen and D. Gerlier (2000). "Octamerization enables soluble CD46 receptor to neutralize measles virus in vitro and in vivo." *J Virol* **74**(10): 4672-8.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo and P. Lusso (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.
- Coffin, C. M. (1986). "Current issues in transfusion therapy. 1. Risks of infection." *Postgrad Med* **80**(8): 219-24.

- Coffin, J. M. (1995). "HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy." Science **267**(5197): 483-9.
- Connor, R. I. and D. D. Ho (1994). "Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression." J Virol **68**(7): 4400-8.
- Cormier, E. G. and T. Dragic (2002). "The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor." J Virol **76**(17): 8953-7.
- Cormier, E. G., M. Persuh, D. A. Thompson, S. W. Lin, T. P. Sakmar, W. C. Olson and T. Dragic (2000). "Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5762-7.
- Cormier, E. G., D. N. Tran, L. Yukhayeva, W. C. Olson and T. Dragic (2001). "Mapping the determinants of the CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 complexes." J Virol **75**(12): 5541-9.
- Crabb, C. (2005). "UK patients risk treatment exhaustion." Aids **19**(11): N1.
- Daar, E. S., X. L. Li, T. Moudgil and D. D. Ho (1990). "High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6574-8.
- Daha, M. R. and L. A. van Es (1980). "Relative resistance of the F-42-stabilized classical pathway C3 convertase to inactivation by C4-binding protein." J Immunol **125**(5): 2051-4.
- Dahlback, B., C. A. Smith and H. J. Muller-Eberhard (1983). "Visualization of human C4b-binding protein and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(11): 3461-5.
- Dai, C., B. Wang and H. Zhao (2005). "Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system." Colloids Surf B Biointerfaces **41**(2-3): 117-20.
- Dai, S., H. Song, G. Dou, X. Qian, Y. Zhang, Y. Cai, X. Liu and Z. Tang (2005). "Quantification of sifuvirtide in monkey plasma by an on-line solid-phase extraction procedure combined with liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **19**(10): 1273-82.
- Dai, S. J., G. F. Dou, X. H. Qiang, H. F. Song, Z. M. Tang, D. S. Liu, X. W. Liu, L. M. Yang, Y. T. Zheng and Q. Liang (2005). "Pharmacokinetics of sifuvirtide, a novel anti-HIV-1 peptide, in monkeys and its inhibitory concentration in vitro." Acta Pharmacol Sin **26**(10): 1274-80.
- Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves and R. A. Weiss (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.
- De Clercq, E. (1999). "The emerging role of fusion inhibitors in HIV infection." Drugs R D **2**(5): 321-31.
- De Cock, K. M., G. Adjuorlolo, E. Ekpini, T. Sibailly, J. Kouadio, M. Maran, K. Brattegaard, K. M. Vetter, R. Doorly and H. D. Gayle (1993). "Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic." Jama **270**(17): 2083-6.

- de Kruijff, J. and T. Logtenberg (1996). "Leucine zipper dimerized bivalent and bispecific scFv antibodies from a semi-synthetic antibody phage display library." *J Biol Chem* **271**(13): 7630-4.
- Dealwis, C., E. J. Fernandez, D. A. Thompson, R. J. Simon, M. A. Siani and E. Lolis (1998). "Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 6941-6.
- Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, M. W. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedert, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, et al. (1996). "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study." *Science* **273**(5283): 1856-62.
- Demaison, C., K. Parsley, G. Brouns, M. Scherr, K. Battmer, C. Kinnon, M. Grez and A. J. Thrasher (2002). "High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter." *Hum Gene Ther* **13**(7): 803-13.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." *Nature* **381**(6584): 661-6.
- Deng, X., H. Ueda, S. B. Su, W. Gong, N. M. Dunlop, J. L. Gao, P. M. Murphy and J. M. Wang (1999). "A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors *CCR5* and *CXCR4* in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R." *Blood* **94**(4): 1165-73.
- Derdeyn, C. A., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, X. Wu, W. A. O'Brien, L. Ratner, J. C. Kappes, G. M. Shaw and E. Hunter (2000). "Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120." *J Virol* **74**(18): 8358-67.
- Derdeyn, C. A., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, Z. Zhang, W. A. O'Brien, L. Ratner, G. M. Shaw and E. Hunter (2001). "Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp120 interactions with the coreceptor." *J Virol* **75**(18): 8605-14.
- Dervillez, X., A. Huther, J. Schuhmacher, C. Griesinger, J. H. Cohen, D. von Laer and U. Dietrich (2006). "Stable expression of soluble therapeutic peptides in eukaryotic cells by multimerisation: application to the HIV-1 fusion inhibitory peptide C46." *ChemMedChem* **1**(3): 330-9.
- Doms, R. W. and J. P. Moore (2000). "HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity." *J Cell Biol* **151**(2): F9-14.
- Doranz, B. J., S. S. Baik and R. W. Doms (1999). "Use of a gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events." *J Virol* **73**(12): 10346-58.
- Doranz, B. J., J. F. Berson, J. Rucker and R. W. Doms (1997). "Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)." *Immunol Res* **16**(1): 15-28.

- Doranz, B. J., Z. H. Lu, J. Rucker, T. Y. Zhang, M. Sharron, Y. H. Cen, Z. X. Wang, H. H. Guo, J. G. Du, M. A. Accavitti, et al. (1997). "Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1." J Virol **71**(9): 6305-14.
- Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman and R. W. Doms (1996). "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors." Cell **85**(7): 1149-58.
- Dorfman, T., M. J. Moore, A. C. Guth, H. Choe and M. Farzan (2006). "A tyrosine-sulfated peptide derived from the heavy-chain CDR3 region of an HIV-1-neutralizing antibody binds gp120 and inhibits HIV-1 infection." J Biol Chem **281**(39): 28529-35.
- Dorr, P., M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, et al. (2005). "Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity." Antimicrob Agents Chemother **49**(11): 4721-32.
- Dragic, T. (2001). "An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function." J Gen Virol **82**(Pt 8): 1807-14.
- Dragic, T., A. Trkola, S. W. Lin, K. A. Nagashima, F. Kajumo, L. Zhao, W. C. Olson, L. Wu, C. R. Mackay, G. P. Allaway, et al. (1998). "Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry." J Virol **72**(1): 279-85.
- Dragic, T., A. Trkola, D. A. Thompson, E. G. Cormier, F. A. Kajumo, E. Maxwell, S. W. Lin, W. Ying, S. O. Smith, T. P. Sakmar, et al. (2000). "A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5639-44.
- Dwyer, J. J., K. L. Wilson, D. K. Davison, S. A. Freel, J. E. Seedorff, S. A. Wring, N. A. Tvermoes, T. J. Matthews, M. L. Greenberg and M. K. Delmedico (2007). "Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(31): 12772-7.
- Eckert, D. M. and P. S. Kim (2001). "Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition." Annu Rev Biochem **70**: 777-810.
- Egelhofer, M., G. Brandenburg, H. Martinius, P. Schult-Dietrich, G. Melikyan, R. Kunert, C. Baum, I. Choi, A. Alexandrov and D. von Laer (2004). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides." J Virol **78**(2): 568-75.
- Farzan, M., G. J. Babcock, N. Vasilieva, P. L. Wright, E. Kiprilov, T. Mirzabekov and H. Choe (2002). "The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 alpha association and HIV-1 entry." J Biol Chem **277**(33): 29484-9.
- Farzan, M., H. Choe, L. Vaca, K. Martin, Y. Sun, E. Desjardins, N. Ruffing, L. Wu, R. Wyatt, N. Gerard, et al. (1998). "A tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5." J Virol **72**(2): 1160-4.
- Farzan, M., S. Chung, W. Li, N. Vasilieva, P. L. Wright, C. E. Schnitzler, R. J. Marchione, C. Gerard, N. P. Gerard, J. Sodroski, et al. (2002). "Tyrosine-sulfated peptides functionally

- reconstitute a CCR5 variant lacking a critical amino-terminal region." J Biol Chem **277**(43): 40397-402.
- Farzan, M., T. Mirzabekov, P. Kolchinsky, R. Wyatt, M. Cayabyab, N. P. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski and H. Choe (1999). "Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry." Cell **96**(5): 667-76.
- Farzan, M., N. Vasilieva, C. E. Schnitzler, S. Chung, J. Robinson, N. P. Gerard, C. Gerard, H. Choe and J. Sodroski (2000). "A tyrosine-sulfated peptide based on the N terminus of CCR5 interacts with a CD4-enhanced epitope of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein and inhibits HIV-1 entry." J Biol Chem **275**(43): 33516-21.
- Faure, A., C. Calmels, C. Desjobert, M. Castroviejo, A. Caumont-Sarcos, L. Tarrago-Litvak, S. Litvak and V. Parissi (2005). "HIV-1 integrase crosslinked oligomers are active in vitro." Nucleic Acids Res **33**(3): 977-86.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy and E. A. Berger (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.
- Franke, E. K., H. E. Yuan and J. Luban (1994). "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions." Nature **372**(6504): 359-62.
- Furuta, R. A., C. T. Wild, Y. Weng and C. D. Weiss (1998). "Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41." Nat Struct Biol **5**(4): 276-9.
- Gallaher, W. R. (1987). "Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus." Cell **50**(3): 327-8.
- Gallay, P., V. Stitt, C. Mundy, M. Oettinger and D. Trono (1996). "Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import." J Virol **70**(2): 1027-32.
- Gallo, R. C. (1999). "Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Tat (correction of Pat) toxoid as an important component of a vaccine." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8324-6.
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, et al. (1984). "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS." Science **224**(4648): 500-3.
- Glass, W. G., D. H. McDermott, J. K. Lim, S. Lekhong, S. F. Yu, W. A. Frank, J. Pape, R. C. Cheshier and P. M. Murphy (2006). "CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection." J Exp Med **203**(1): 35-40.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf and A. Saxon (1981). "Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency." N Engl J Med **305**(24): 1425-31.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock and P. M. Sharp (2000). "AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications." Science **287**(5453): 607-14.
- Hart, T. K., R. Kirsh, H. Ellens, R. W. Sweet, D. M. Lambert, S. R. Petteway, Jr., J. Leary and P. J. Bugelski (1991). "Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus

- type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(6): 2189-93.
- Hartley, O. and R. E. Offord (2005). "Engineering chemokines to develop optimized HIV inhibitors." Curr Protein Pept Sci **6**(3): 207-19.
- Haynes, B. F. and D. C. Montefiori (2006). "Aiming to induce broadly reactive neutralizing antibody responses with HIV-1 vaccine candidates." Expert Rev Vaccines **5**(3): 347-63.
- Henderson, D. K. (1992). "The HIV- or HBV-infected healthcare provider and society's perception of risk: science, nonscience, and nonsense." Ann Allergy **68**(3): 197-9.
- Hildinger, M., M. T. Dittmar, P. Schult-Dietrich, B. Fehse, B. S. Schnierle, S. Thaler, G. Stiegler, R. Welker and D. von Laer (2001). "Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry." J Virol **75**(6): 3038-42.
- Hillarp, A. and B. Dahlback (1990). "Cloning of cDNA coding for the beta chain of human complement component C4b-binding protein: sequence homology with the alpha chain." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(3): 1183-7.
- Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell and P. R. Johnson (1989). "An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2." Nature **339**(6223): 389-92.
- Hirschel, B. and M. Opravil (1999). "The year in review: antiretroviral treatment." Aids **13 Suppl A**: S177-87.
- Ho, D. D. (1995). "HIV-1 dynamics in vivo." J Biol Regul Homeost Agents **9**(3): 76-7.
- Hobbs, S., S. Jitrapakdee and J. C. Wallace (1998). "Development of a bicistronic vector driven by the human polypeptide chain elongation factor 1alpha promoter for creation of stable mammalian cell lines that express very high levels of recombinant proteins." Biochem Biophys Res Commun **252**(2): 368-72.
- Holliger, P., T. Prospero and G. Winter (1993). "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6444-8.
- Huang, C. C., S. N. Lam, P. Acharya, M. Tang, S. H. Xiang, S. S. Hussan, R. L. Stanfield, J. Robinson, J. Sodroski, I. A. Wilson, et al. (2007). "Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4." Science **317**(5846): 1930-4.
- Huang, L. M., A. Joshi, R. Willey, J. Orenstein and K. T. Jeang (1994). "Human immunodeficiency viruses regulated by alternative trans-activators: genetic evidence for a novel non-transcriptional function of Tat in virion infectivity." Embo J **13**(12): 2886-96.
- Humbert, M., S. Antoni, B. Brill, M. Landersz, B. Rodes, V. Soriano, U. Wintergerst, H. Knechten, S. Staszewski, D. von Laer, et al. (2007). "Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma." Eur J Immunol **37**(2): 501-15.
- Huthner, A. and U. Dietrich (2007). "The emergence of peptides as therapeutic drugs for the inhibition of HIV-1." AIDS Rev **9**(4): 208-17.
- Huttner, W. B. (1982). "Sulphation of tyrosine residues-a widespread modification of proteins." Nature **299**(5880): 273-6.

- Imamichi, T. (2004). "Action of anti-HIV drugs and resistance: reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors." *Curr Pharm Des* **10**(32): 4039-53.
- Jacobson, J. M., I. Lowy, C. V. Fletcher, T. J. O'Neill, D. N. Tran, T. J. Ketas, A. Trkola, M. E. Klotman, P. J. Maddon, W. C. Olson, et al. (2000). "Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults." *J Infect Dis* **182**(1): 326-9.
- Javaherian, K., A. J. Langlois, C. McDanal, K. L. Ross, L. I. Eckler, C. L. Jellis, A. T. Profy, J. R. Rusche, D. P. Bolognesi, S. D. Putney, et al. (1989). "Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(17): 6768-72.
- Kahn, J. O., J. D. Allan, T. L. Hodges, L. D. Kaplan, C. J. Arri, H. F. Fitch, A. E. Izu, J. Mordenti, J. E. Sherwin, J. E. Groopman, et al. (1990). "The safety and pharmacokinetics of recombinant soluble CD4 (rCD4) in subjects with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase 1 study." *Ann Intern Med* **112**(4): 254-61.
- Kanki, P. J., J. Allan, F. Barin, R. Redfield, N. Clumeck, T. Quinn, F. Mowovondi, L. Thiry, A. Burny, D. Zagury, et al. (1987). "Absence of antibodies to HIV-2/HTLV-4 in six central African nations." *AIDS Res Hum Retroviruses* **3**(3): 317-22.
- Karlsson, G. B., F. Gao, J. Robinson, B. Hahn and J. Sodroski (1996). "Increased envelope spike density and stability are not required for the neutralization resistance of primary human immunodeficiency viruses." *J Virol* **70**(9): 6136-42.
- Kask, L., A. Hillarp, B. Ramesh, B. Dahlback and A. M. Blom (2002). "Structural requirements for the intracellular subunit polymerization of the complement inhibitor C4b-binding protein." *Biochemistry* **41**(30): 9349-57.
- Khurana, S., M. Kennedy, L. R. King and H. Golding (2005). "Identification of a linear peptide recognized by monoclonal antibody 2D7 capable of generating CCR5-specific antibodies with human immunodeficiency virus-neutralizing activity." *J Virol* **79**(11): 6791-800.
- Kilby, J. M. (1999). "Therapeutic potential of blocking HIV entry into cells: focus on membrane fusion inhibitors." *Expert Opin Investig Drugs* **8**(8): 1157-70.
- Kinoshita, T., A. Tsujimoto and K. Shimotohno (1991). "Sequence variations in LTR and env regions of HTLV-I do not discriminate between the virus from patients with HTLV-I-associated myelopathy and adult T-cell leukemia." *Int J Cancer* **47**(4): 491-5.
- Kiselyeva, Y., R. Nedellec, A. Ramos, C. Pastore, L. B. Margolis and D. E. Mosier (2007). "Evolution of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 SF162 is associated with two unique envelope mutations." *J Virol* **81**(7): 3657-61.
- Kishore, U. and K. B. Reid (1999). "Modular organization of proteins containing C1q-like globular domain." *Immunopharmacology* **42**(1-3): 15-21.
- Klatzmann, D., F. Barre-Sinoussi, M. T. Nugeyre, C. Danquet, E. Vilmer, C. Griscelli, F. Brun-Veziret, C. Rouzioux, J. C. Gluckman, J. C. Chermann, et al. (1984). "Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes." *Science* **225**(4657): 59-63.
- Klatzmann, D. R., J. S. McDougal and P. J. Maddon (1990). "The CD4 molecule and HIV infection." *Immunodeficiency Rev* **2**(1): 43-66.

- Kliger, Y. and Y. Shai (2000). "Inhibition of HIV-1 entry before gp41 folds into its fusion-active conformation." J Mol Biol **295**(2): 163-8.
- Kondru, R., J. Zhang, C. Ji, T. Mirzadegan, D. Rotstein, S. Sankuratri and M. Dioszegi (2007). "Molecular Interactions of Ccr5 with Major Classes of Small-Molecule Anti Hiv Ccr5 Antagonists." Mol Pharmacol.
- Konigs, C., A. Pustowka, J. Irving, C. Kessel, K. Klich, V. Wegner, M. J. Rowley, I. R. Mackay, W. Kreuz, C. Griesinger, et al. (2007). "Peptide mimotopes selected with HIV-1-blocking monoclonal antibodies against CCR5 represent motifs specific for HIV-1 entry." Immunol Cell Biol **85**(7): 511-7.
- Konigs, C., M. J. Rowley, P. Thompson, M. A. Myers, M. Scealy, J. M. Davies, L. Wu, U. Dietrich, C. R. Mackay and I. R. Mackay (2000). "Monoclonal antibody screening of a phage-displayed random peptide library reveals mimotopes of chemokine receptor CCR5: implications for the tertiary structure of the receptor and for an N-terminal binding site for HIV-1 gp120." Eur J Immunol **30**(4): 1162-71.
- Koot, M., I. P. Keet, A. H. Vos, R. E. de Goede, M. T. Roos, R. A. Coutinho, F. Miedema, P. T. Schellekens and M. Tersmette (1993). "Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS." Ann Intern Med **118**(9): 681-8.
- Korber, B., B. Gaschen, K. Yusim, R. Thakallapally, C. Kesmir and V. Detours (2001). "Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation." Br Med Bull **58**: 19-42.
- Kuhmann, S. E., E. J. Platt, S. L. Kozak and D. Kabat (2000). "Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1." J Virol **74**(15): 7005-15.
- Kwong, P. D. (2005). "Human immunodeficiency virus: refolding the envelope." Nature **433**(7028): 815-6.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski and W. A. Hendrickson (1998). "Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody." Nature **393**(6686): 648-59.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, Q. J. Sattentau, J. Sodroski and W. A. Hendrickson (2000). "Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus." J Virol **74**(4): 1961-72.
- Labrosse, B., C. Treboute, A. BreLOT and M. Alizon (2001). "Cooperation of the V1/V2 and V3 domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 for interaction with the CXCR4 receptor." J Virol **75**(12): 5457-64.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lake, R. A., B. W. Robinson and J. D. Hayball (1999). "MHC multimerization, antigen expression and the induction of APC amnesia in the developing immune response." Immunol Cell Biol **77**(1): 99-104.
- Landolfi, N. F. (1991). "A chimeric IL-2/Ig molecule possesses the functional activity of both proteins." J Immunol **146**(3): 915-9.

- Lapham, C. K., J. Ouyang, B. Chandrasekhar, N. Y. Nguyen, D. S. Dimitrov and H. Golding (1996). "Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines." *Science* **274**(5287): 602-5.
- Layne, S. P., M. J. Merges, M. Dembo, J. L. Spouge and P. L. Nara (1990). "HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection." *Nature* **346**(6281): 277-9.
- Lederman, M. M., A. Penn-Nicholson, M. Cho and D. Mosier (2006). "Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment." *Jama* **296**(7): 815-26.
- Lee, B., J. Ratajczak, R. W. Doms, A. M. Gewirtz and M. Z. Ratajczak (1999). "Coreceptor/chemokine receptor expression on human hematopoietic cells: biological implications for human immunodeficiency virus-type 1 infection." *Blood* **93**(4): 1145-56.
- Lee, B., M. Sharron, C. Blanpain, B. J. Doranz, J. Vakili, P. Setoh, E. Berg, G. Liu, H. R. Guy, S. R. Durell, et al. (1999). "Epitope mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and distinct but overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function." *J Biol Chem* **274**(14): 9617-26.
- Lee, B., M. Sharron, L. J. Montaner, D. Weissman and R. W. Doms (1999). "Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5215-20.
- Lee, R. W. and W. B. Huttner (1983). "Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 pheochromocytoma cells and their sulfation by a tyrosylprotein sulfotransferase." *J Biol Chem* **258**(18): 11326-34.
- Lee, R. W. and W. B. Huttner (1985). "(Glu62, Ala30, Tyr8)_n serves as high-affinity substrate for tyrosylprotein sulfotransferase: a Golgi enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(18): 6143-7.
- Lemey, P., O. G. Pybus, B. Wang, N. K. Saksena, M. Salemi and A. M. Vandamme (2003). "Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6588-92.
- Libyh, M. T., D. Goossens, S. Oudin, N. Gupta, X. Dervillez, G. Juszczak, P. Cornillet, F. Bougy, B. Reveil, F. Philbert, et al. (1997). "A recombinant human scFv anti-Rh(D) antibody with multiple valences using a C-terminal fragment of C4-binding protein." *Blood* **90**(10): 3978-83.
- Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup and N. R. Landau (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." *Cell* **86**(3): 367-77.
- Liu, S., S. Fan and Z. Sun (2003). "Structural and functional characterization of the human CCR5 receptor in complex with HIV gp120 envelope glycoprotein and CD4 receptor by molecular modeling studies." *J Mol Model* **9**(5): 329-36.
- Liu, S., S. Wu and S. Jiang (2007). "HIV entry inhibitors targeting gp41: from polypeptides to small-molecule compounds." *Curr Pharm Des* **13**(2): 143-62.
- Loetscher, P., J. H. Gong, B. Dewald, M. Baggiolini and I. Clark-Lewis (1998). "N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities." *J Biol Chem* **273**(35): 22279-83.

- Lohrengel, S., F. Hermann, I. Hagmann, H. Oberwinkler, L. Scrivano, C. Hoffmann, D. von Laer and M. T. Dittmar (2005). "Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to membrane-anchored gp41-derived peptides." *J Virol* **79**(16): 10237-46.
- Lu, D., R. L. Xie, A. Rydzewski and G. L. Long (1997). "The effect of N-linked glycosylation on molecular weight, thrombin cleavage, and functional activity of human protein S." *Thromb Haemost* **77**(6): 1156-63.
- Lu, J., P. Sista, F. Giguel, M. Greenberg and D. R. Kuritzkes (2004). "Relative replicative fitness of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide (T-20)." *J Virol* **78**(9): 4628-37.
- Lu, M., S. C. Blacklow and P. S. Kim (1995). "A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein." *Nat Struct Biol* **2**(12): 1075-82.
- Lucas, G. M., R. E. Chaisson and R. D. Moore (1999). "Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic: risk factors for virologic failure and adverse drug reactions." *Ann Intern Med* **131**(2): 81-7.
- Mack, M., G. Riethmuller and P. Kufer (1995). "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15): 7021-5.
- Marcovina, S. M., A. Zoppo, S. Vigano-D'Angelo, G. Di Cola and A. D'Angelo (1991). "Determination of serum levels of complement component C4b-binding protein: influence of age and inflammation." *Int J Clin Lab Res* **21**(2): 171-5.
- Marinissen, M. J. and J. S. Gutkind (2001). "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms." *Trends Pharmacol Sci* **22**(7): 368-76.
- Markovitz, D. M. (1993). "Infection with the human immunodeficiency virus type 2." *Ann Intern Med* **118**(3): 211-8.
- Matthews, T., M. Salgo, M. Greenberg, J. Chung, R. DeMasi and D. Bolognesi (2004). "Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes." *Nat Rev Drug Discov* **3**(3): 215-25.
- McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes and I. L. Weissman (1988). "Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus." *Cell* **53**(1): 55-67.
- McKeating, J. A., J. Gow, J. Goudsmit, L. H. Pearl, C. Mulder and R. A. Weiss (1989). "Characterization of HIV-1 neutralization escape mutants." *Aids* **3**(12): 777-84.
- Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert and F. S. Cohen (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.
- Miller, R. H. and N. Sarver (1997). "HIV accessory proteins as therapeutic targets." *Nat Med* **3**(4): 389-94.
- Mocroft, A., A. N. Phillips, V. Miller, J. Gatell, J. van Lunzen, J. M. Parkin, R. Weber, B. Roge, A. Lazzarin and J. D. Lundgren (2001). "The use of and response to second-line protease inhibitor regimens: results from the EuroSIDA study." *Aids* **15**(2): 201-9.
- Moore, J. P., J. A. McKeating, R. A. Weiss and Q. J. Sattentau (1990). "Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4." *Science* **250**(4984): 1139-42.

- Moore, J. P. and P. L. Nara (1991). "The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection." *Aids* **5 Suppl 2**: S21-33.
- Muesing, M. A., D. H. Smith, C. D. Cabradilla, C. V. Benton, L. A. Lasky and D. J. Capon (1985). "Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus." *Nature* **313**(6002): 450-8.
- Munch, J., L. Standker, K. Adermann, A. Schulz, M. Schindler, R. Chinnadurai, S. Pohlmann, C. Chaipan, T. Biet, T. Peters, et al. (2007). "Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide." *Cell* **129**(2): 263-75.
- Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." *Pharmacol Rev* **52**(1): 145-76.
- Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma and D. Trono (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." *Science* **272**(5259): 263-7.
- Nara, P. L., L. Smit, N. Dunlop, W. Hatch, M. Merges, D. Waters, J. Kelliher, R. C. Gallo, P. J. Fischinger and J. Goudsmit (1990). "Emergence of viruses resistant to neutralization by V3-specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type 1 IIB infection of chimpanzees." *J Virol* **64**(8): 3779-91.
- Navenot, J. M., Z. X. Wang, J. O. Trent, J. L. Murray, Q. X. Hu, L. DeLeeuw, P. S. Moore, Y. Chang and S. C. Peiper (2001). "Molecular anatomy of CCR5 engagement by physiologic and viral chemokines and HIV-1 envelope glycoproteins: differences in primary structural requirements for RANTES, MIP-1 alpha, and vMIP-II Binding." *J Mol Biol* **313**(5): 1181-93.
- Oberlin, E., A. Amara, F. Bachelier, C. Bessia, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J. M. Heard, I. Clark-Lewis, D. F. Legler, et al. (1996). "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." *Nature* **382**(6594): 833-5.
- Olson, W. C., G. E. Rabut, K. A. Nagashima, D. N. Tran, D. J. Anselma, S. P. Monard, J. P. Segal, D. A. Thompson, F. Kajumo, Y. Guo, et al. (1999). "Differential inhibition of human immunodeficiency virus type 1 fusion, gp120 binding, and CC-chemokine activity by monoclonal antibodies to CCR5." *J Virol* **73**(5): 4145-55.
- Oudin, S., M. T. Libyh, D. Goossens, X. Dervillez, F. Philbert, B. Reveil, F. Bougy, T. Tabary, P. Rouger, D. Klatzmann, et al. (2000). "A soluble recombinant multimeric anti-Rh(D) single-chain Fv/CR1 molecule restores the immune complex binding ability of CR1-deficient erythrocytes." *J Immunol* **164**(3): 1505-13.
- Pal, R., A. Garzino-Demo, P. D. Markham, J. Burns, M. Brown, R. C. Gallo and A. L. DeVico (1997). "Inhibition of HIV-1 infection by the beta-chemokine MDC." *Science* **278**(5338): 695-8.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, et al. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* **289**(5480): 739-45.
- Palker, T. J., M. E. Clark, A. J. Langlois, T. J. Matthews, K. J. Weinhold, R. R. Randall, D. P. Bolognesi and B. F. Haynes (1988). "Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(6): 1932-6.

- Panganiban, A. T. and H. M. Temin (1984). "Circles with two tandem LTRs are precursors to integrated retrovirus DNA." Cell **36**(3): 673-9.
- Pantophlet, R. and D. R. Burton (2006). "GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies." Annu Rev Immunol **24**: 739-69.
- Parada, C. A. and R. G. Roeder (1996). "Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain." Nature **384**(6607): 375-8.
- Pastore, C., R. Nedellec, A. Ramos, S. Pontow, L. Ratner and D. E. Mosier (2006). "Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations." J Virol **80**(2): 750-8.
- Pastore, C., G. R. Picchio, F. Galimi, R. Fish, O. Hartley, R. E. Offord and D. E. Mosier (2003). "Two mechanisms for human immunodeficiency virus type 1 inhibition by N-terminal modifications of RANTES." Antimicrob Agents Chemother **47**(2): 509-17.
- Pereira, C. F. and J. T. Paridaen (2004). "Anti-HIV drug development--an overview." Curr Pharm Des **10**(32): 4005-37.
- Pereira, D. B., M. H. Antoni, A. Danielson, T. Simon, J. Efantis-Potter and M. J. O'Sullivan (2004). "Inhibited interpersonal coping style predicts poorer adherence to scheduled clinic visits in human immunodeficiency virus infected women at risk for cervical cancer." Ann Behav Med **28**(3): 195-202.
- Platt, E. J., K. Wehrly, S. E. Kuhmann, B. Chesebro and D. Kabat (1998). "Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **72**(4): 2855-64.
- Poignard, P., E. O. Saphire, P. W. Parren and D. R. Burton (2001). "gp120: Biologic aspects of structural features." Annu Rev Immunol **19**: 253-74.
- Preobrazhensky, A. A., S. Dragan, T. Kawano, M. A. Gavrillin, I. V. Gulina, L. Chakravarty and P. E. Kolattukudy (2000). "Monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2B is a glycoprotein that has tyrosine sulfation in a conserved extracellular N-terminal region." J Immunol **165**(9): 5295-303.
- Preston, B. D., B. J. Poiesz and L. A. Loeb (1988). "Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase." Science **242**(4882): 1168-71.
- Rabut, G. E., J. A. Konner, F. Kajumo, J. P. Moore and T. Dragic (1998). "Alanine substitutions of polar and nonpolar residues in the amino-terminal domain of CCR5 differently impair entry of macrophage- and dualtropic isolates of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **72**(4): 3464-8.
- Raina, S. and D. Missiakas (1997). "Making and breaking disulfide bonds." Annu Rev Microbiol **51**: 179-202.
- Reeves, J. D., S. A. Gallo, N. Ahmad, J. L. Miamidian, P. E. Harvey, M. Sharron, S. Pohlmann, J. N. Sfakianos, C. A. Derdeyn, R. Blumenthal, et al. (2002). "Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16249-54.
- Reil, H., H. Kollmus, U. H. Weidle and H. Hauser (1993). "A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells." J Virol **67**(9): 5579-84.

- Reitz, M. S., Jr., C. Wilson, C. Naugle, R. C. Gallo and M. Robert-Guroff (1988). "Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene." Cell **54**(1): 57-63.
- Robert-Guroff, M., M. Brown and R. C. Gallo (1985). "HTLV-III-neutralizing antibodies in patients with AIDS and AIDS-related complex." Nature **316**(6023): 72-4.
- Roberts, J. D., K. Bebenek and T. A. Kunkel (1988). "The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1." Science **242**(4882): 1171-3.
- Rockstroh, J. K. and S. Mauss (2004). "Clinical perspective of fusion inhibitors for treatment of HIV." J Antimicrob Chemother **53**(5): 700-2.
- Rowland-Jones, S. L. (2003). "Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us?" Nat Rev Immunol **3**(4): 343-8.
- Rubsamen-Waigmann, H., W. R. Willems, U. Bertram and H. von Briesen (1989). "Reversal of HIV-phenotype to fulminant replication on macrophages in perinatal transmission." Lancet **2**(8672): 1155-6.
- Rusche, J. R., K. Javaherian, C. McDanal, J. Petro, D. L. Lynn, R. Grimaila, A. Langlois, R. C. Gallo, L. O. Arthur, P. J. Fischinger, et al. (1988). "Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp120." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(9): 3198-202.
- Russell, C. S. and L. A. Clarke (1999). "Recombinant proteins for genetic disease." Clin Genet **55**(6): 389-94.
- Samson, M., O. Labbe, C. Mollereau, G. Vassart and M. Parmentier (1996). "Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene." Biochemistry **35**(11): 3362-7.
- Sanger, F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocombe and M. Smith (1977). "Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA." Nature **265**(5596): 687-95.
- Sattentau, Q. J. and J. P. Moore (1991). "Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding." J Exp Med **174**(2): 407-15.
- Schambach, A., B. Schiedlmeier, K. Kuhlcke, M. Verstegen, G. P. Margison, Z. Li, K. Kamino, J. Bohne, A. Alexandrov, F. G. Hermann, et al. (2006). "Towards hematopoietic stem cell-mediated protection against infection with human immunodeficiency virus." Gene Ther **13**(13): 1037-47.
- Scharfstein, J., A. Ferreira, I. Gigli and V. Nussenzweig (1978). "Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization." J Exp Med **148**(1): 207-22.
- Seya, T., V. M. Holers and J. P. Atkinson (1985). "Purification and functional analysis of the polymorphic variants of the C3b/C4b receptor (CR1) and comparison with H, C4b-binding protein (C4bp), and decay accelerating factor (DAF)." J Immunol **135**(4): 2661-7.
- Sharp, P. M., E. Bailes, D. L. Robertson, F. Gao and B. H. Hahn (1999). "Origins and evolution of AIDS viruses." Biol Bull **196**(3): 338-42.

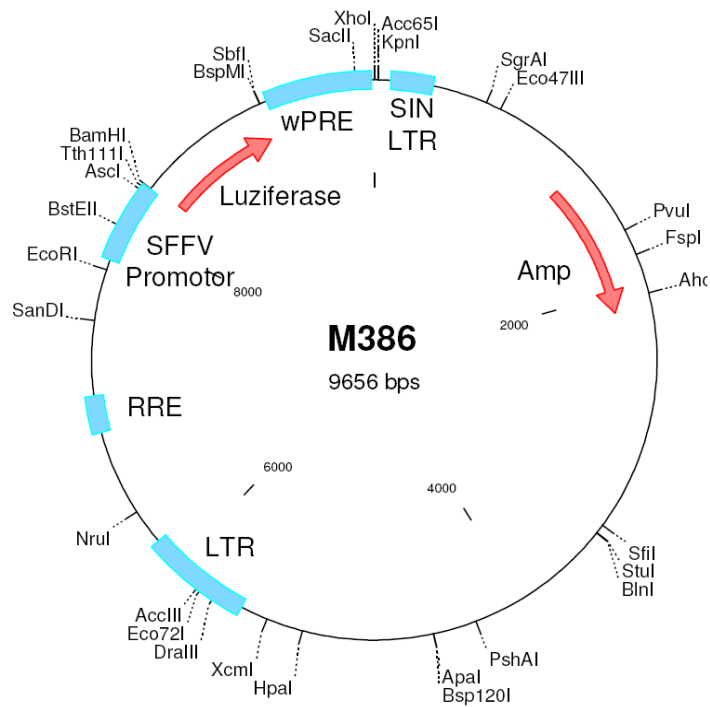
- Shinya, E., X. Dervillez, F. Edwards-Levy, V. Duret, E. Brisson, L. Ylisastigui, M. C. Levy, J. H. Cohen and D. Klatzmann (1999). "In-vivo delivery of therapeutic proteins by genetically-modified cells: comparison of organoids and human serum albumin alginate-coated beads." Biomed Pharmacother **53**(10): 471-83.
- Shioda, T., J. A. Levy and C. Cheng-Mayer (1991). "Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene." Nature **349**(6305): 167-9.
- Silvestri, G. (2005). "Naturally SIV-infected sooty mangabeys: are we closer to understanding why they do not develop AIDS?" J Med Primatol **34**(5-6): 243-52.
- Simmons, G., P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Offord, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. Wells and A. E. Proudfoot (1997). "Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist." Science **276**(5310): 276-9.
- Smith, D. H., R. A. Byrn, S. A. Marsters, T. Gregory, J. E. Groopman and D. J. Capon (1987). "Blocking of HIV-1 infectivity by a soluble, secreted form of the CD4 antigen." Science **238**(4834): 1704-7.
- Somers, W. S., J. Tang, G. D. Shaw and R. T. Camphausen (2000). "Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1." Cell **103**(3): 467-79.
- Sousa, A. E., J. Carneiro, M. Meier-Schellersheim, Z. Grossman and R. M. Victorino (2002). "CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load." J Immunol **169**(6): 3400-6.
- Stephens, J. C., D. E. Reich, D. B. Goldstein, H. D. Shin, M. W. Smith, M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, R. Allikmets, L. Schriml, et al. (1998). "Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes." Am J Hum Genet **62**(6): 1507-15.
- Suankratay, C., C. Mold, Y. Zhang, T. F. Lint and H. Gewurz (1999). "Mechanism of complement-dependent haemolysis via the lectin pathway: role of the complement regulatory proteins." Clin Exp Immunol **117**(3): 442-8.
- Sullivan, N., Y. Sun, J. Binley, J. Lee, C. F. Barbas, 3rd, P. W. Parren, D. R. Burton and J. Sodroski (1998). "Determinants of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein activation by soluble CD4 and monoclonal antibodies." J Virol **72**(8): 6332-8.
- Suphaphiphat, P., A. Thitithanyanont, S. Paca-Uccaralertkun, M. Essex and T. H. Lee (2003). "Effect of amino acid substitution of the V3 and bridging sheet residues in human immunodeficiency virus type 1 subtype C gp120 on CCR5 utilization." J Virol **77**(6): 3832-7.
- Tan, K., J. Liu, J. Wang, S. Shen and M. Lu (1997). "Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12303-8.
- Teller, D. C., T. Okada, C. A. Behnke, K. Palczewski and R. E. Stenkamp (2001). "Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs)." Biochemistry **40**(26): 7761-72.

- Thali, M., J. P. Moore, C. Furman, M. Charles, D. D. Ho, J. Robinson and J. Sodroski (1993). "Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding." *J Virol* **67**(7): 3978-88.
- Trauneker, A., W. Luke and K. Karjalainen (1988). "Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1." *Nature* **331**(6151): 84-6.
- Trkola, A., T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon and J. P. Moore (1996). "CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5." *Nature* **384**(6605): 184-7.
- Trkola, A., W. A. Paxton, S. P. Monard, J. A. Hoxie, M. A. Siani, D. A. Thompson, L. Wu, C. R. Mackay, R. Horuk and J. P. Moore (1998). "Genetic subtype-independent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by CC and CXC chemokines." *J Virol* **72**(1): 396-404.
- van Lunzen, J., T. Glaunsinger, I. Stahmer, V. von Baehr, C. Baum, A. Schilz, K. Kuehlcke, S. Naundorf, H. Martinius, F. Hermann, et al. (2007). "Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus." *Mol Ther* **15**(5): 1024-33.
- Veljkovic, V., N. Veljkovic, J. A. Este, A. Huther and U. Dietrich (2007). "Application of the EIP/ISM bioinformatics concept in development of new drugs." *Curr Med Chem* **14**(4): 441-53.
- Villa-Komaroff, L., A. Efstratiadis, S. Broome, P. Lomedico, R. Tizard, S. P. Naber, W. L. Chick and W. Gilbert (1978). "A bacterial clone synthesizing proinsulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(8): 3727-31.
- Villoutreix, B. O., Y. Hardig, A. Wallqvist, D. G. Covell, P. Garcia de Frutos and B. Dahlback (1998). "Structural investigation of C4b-binding protein by molecular modeling: localization of putative binding sites." *Proteins* **31**(4): 391-405.
- Vogel, T., R. Kurth and S. Norley (1994). "The majority of neutralizing Abs in HIV-1-infected patients recognize linear V3 loop sequences. Studies using HIV-1MN multiple antigenic peptides." *J Immunol* **153**(4): 1895-904.
- Wan, M., M. Takagi, B. N. Loh, X. Z. Xu and T. Imanaka (1996). "Autoprocessing: an essential step for the activation of HIV-1 protease." *Biochem J* **316** (Pt 2): 569-73.
- Watson, C., S. Jenkinson, W. Kazmierski and T. Kenakin (2005). "The CCR5 receptor-based mechanism of action of 873140, a potent allosteric noncompetitive HIV entry inhibitor." *Mol Pharmacol* **67**(4): 1268-82.
- Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw and J. C. Kappes (2002). "Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(6): 1896-905.
- Weiss, R. A. (2001). "Gulliver's travels in HIVland." *Nature* **410**(6831): 963-7.
- Weiss, R. A., P. R. Clapham, R. Cheingsong-Popov, A. G. Dalgleish, C. A. Carne, I. V. Weller and R. S. Tedder (1985). "Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients." *Nature* **316**(6023): 69-72.
- Wild, C. (2006). "Supporting basic research: discovering a new class of anti-HIV drug." *AIDS Patient Care STDS* **20**(7): 472-5.

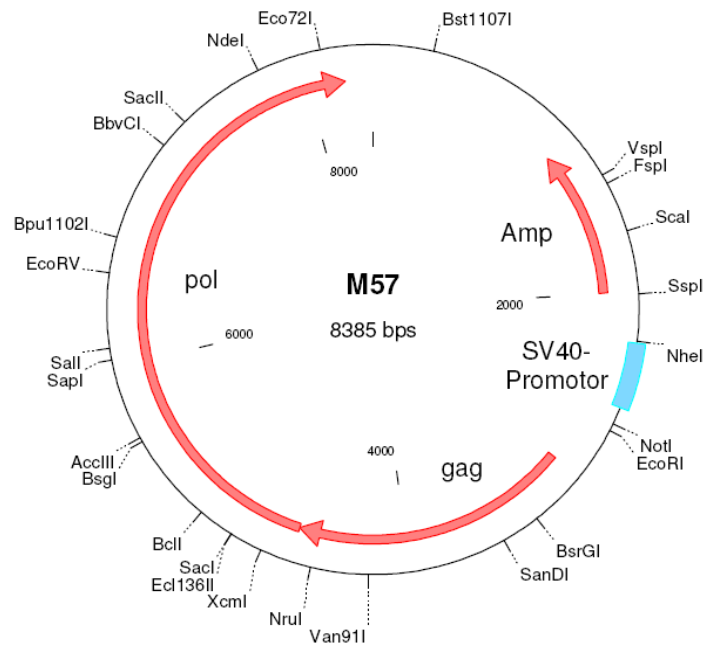
- Wild, C., T. Greenwell, D. Shugars, L. Rimsky-Clarke and T. Matthews (1995). "The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure." *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(3): 323-5.
- Willuda, J., S. Kubetzko, R. Waibel, P. A. Schubiger, U. Zangemeister-Wittke and A. Pluckthun (2001). "Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185(HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides." *J Biol Chem* **276**(17): 14385-92.
- Wong-Staal, F. (1991). "The AIDS virus. What we know and what we can do about it." *West J Med* **155**(5): 481-7.
- Wu, L., N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardins, W. Newman, et al. (1996). "CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5." *Nature* **384**(6605): 179-83.
- Wu, L., G. LaRosa, N. Kassam, C. J. Gordon, H. Heath, N. Ruffing, H. Chen, J. Humblias, M. Samson, M. Parmentier, et al. (1997). "Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding." *J Exp Med* **186**(8): 1373-81.
- Wyatt, R., P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson and J. G. Sodroski (1998). "The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein." *Nature* **393**(6686): 705-11.
- Wyatt, R. and J. Sodroski (1998). "The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens." *Science* **280**(5371): 1884-8.
- Xiang, S. H., L. Wang, M. Abreu, C. C. Huang, P. D. Kwong, E. Rosenberg, J. E. Robinson and J. Sodroski (2003). "Epitope mapping and characterization of a novel CD4-induced human monoclonal antibody capable of neutralizing primary HIV-1 strains." *Virology* **315**(1): 124-34.
- Yang, O. O., S. L. Swanberg, Z. Lu, M. Dziejman, J. McCoy, A. D. Luster, B. D. Walker and S. H. Herrmann (1999). "Enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Met-stromal-derived factor 1beta correlates with down-modulation of CXCR4." *J Virol* **73**(6): 4582-9.
- Yerly, S., L. Kaiser, E. Race, J. P. Bru, F. Clavel and L. Perrin (1999). "Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants." *Lancet* **354**(9180): 729-33.
- Ylisastigui, L., J. Vizzavona, E. Drakopoulou, P. Paindavoine, C. F. Calvo, M. Parmentier, J. C. Gluckman, C. Vita and A. Benjouad (1998). "Synthetic full-length and truncated RANTES inhibit HIV-1 infection of primary macrophages." *Aids* **12**(9): 977-84.
- Zhang, K., M. Hawken, F. Rana, F. J. Welte, S. Gartner, M. A. Goldsmith and C. Power (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 clade A and D neurotropism: molecular evolution, recombination, and coreceptor use." *Virology* **283**(1): 19-30.
- Zhang, M., K. Ardlie, S. Wacholder, R. Welch, S. Chanock and T. R. O'Brien (2006). "Genetic variations in CC chemokine receptors and hypertension." *Am J Hypertens* **19**(1): 67-72.
- Zhao, J., L. Ma, Y. L. Wu, P. Wang, W. Hu and G. Pei (1998). "Chemokine receptor CCR5 functionally couples to inhibitory G proteins and undergoes desensitization." *J Cell Biochem* **71**(1): 36-45.
- Zhou, Y., T. Kurihara, R. P. Ryseck, Y. Yang, C. Ryan, J. Loy, G. Warr and R. Bravo (1998). "Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in

mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor." J Immunol **160**(8): 4018-25.

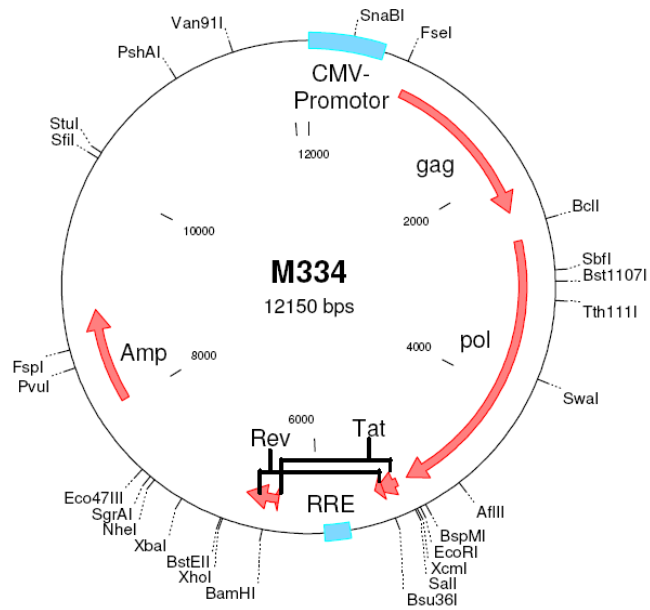
Zhu, P., E. Chertova, J. Bess, Jr., J. D. Lifson, L. O. Arthur, J. Liu, K. A. Taylor and K. H. Roux (2003). "Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15812-7.



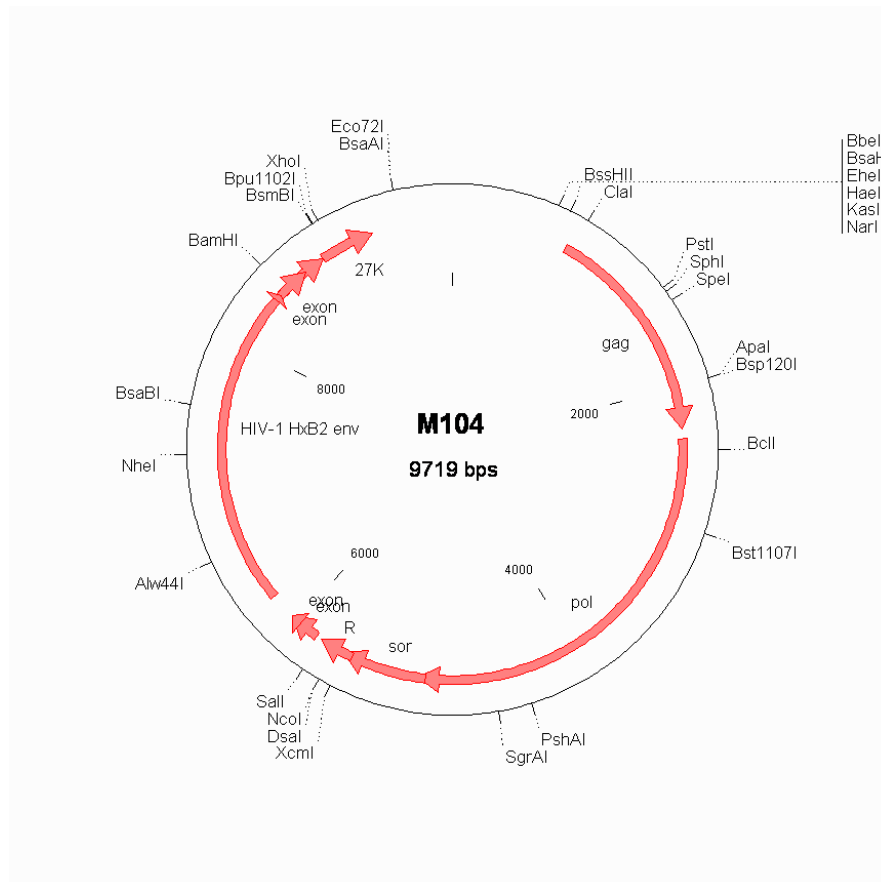
7.2. Expressionsplasmid M386. Lentiviraler Transfervektor mit Luziferase als Markergen, Vektor leitet sich von pHR^{SIN}-cPPT-SEW ab.



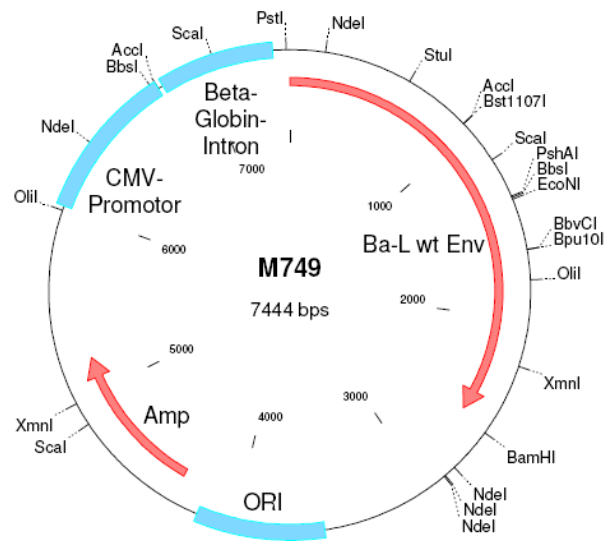
7.3. Expressionsplasmid M57. MLV Gagpol Expressionsplasmid mit SV40 Promotor. Das Plasmid wurde für die LCMV-Pseudotypisierung verwendet.



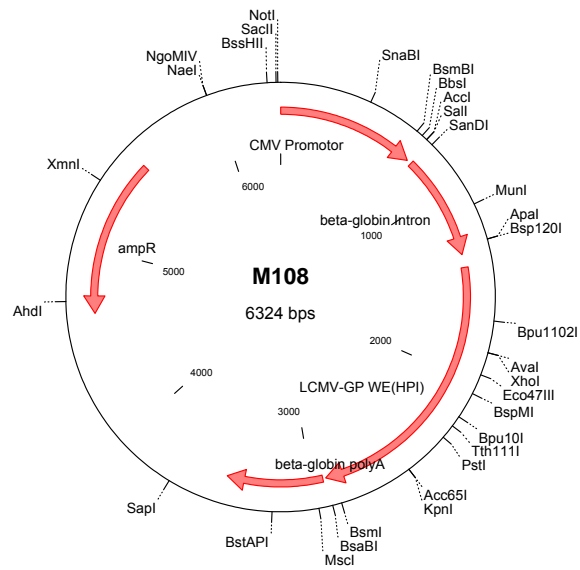
7.4 Das Expressionsplasmid M334. Expressionsplasmid für HIV Gagpol, Rev (publizierte Bezeichnung: pCMV-dR8.91)



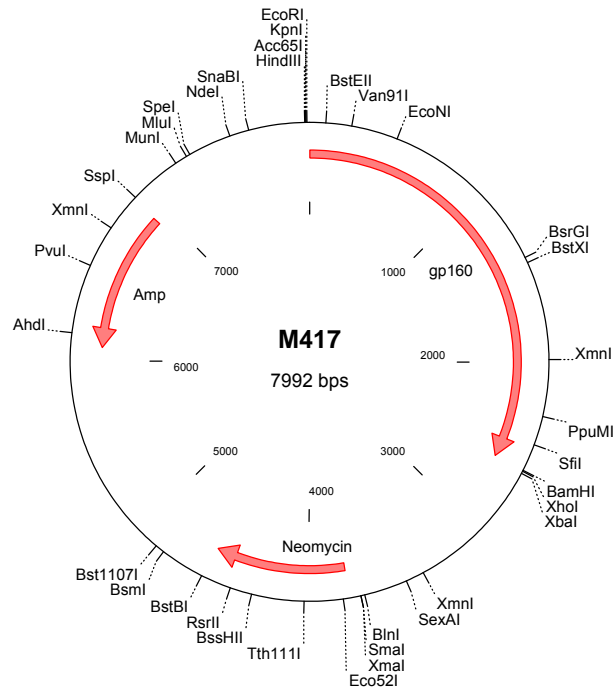
7.5 Das Expressionsplasmid M104. Expressionsplasmid für das dual-trope HXB2 env



7.6 Expressionsplasmid M749. Plasmid für das HIV-1 Hüllprotein Ba_L wt Env.



7.7 Expressionsplasmid M108. Expressionsplasmid für das LCMV-GP-WB Env mit CMV Promotor und β -Globin Intron



7.8 Expressionsplasmid M417. *Expressionsplasmid für das dual-trope HIV-1 Hüllprotein 89.6*

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 7.1 Einbuchstabencode für Aminosäuren

A Alanin	I Isoleucin	R Arginin
C Cstein	K Lysin	S Serin
D Aspartat	L Leucin	T Threonin
E Glutamat	M Methionin	V Valin
F Phenylalanin	N Asparagin	W Tryptophan
G Glycin	P Prolin	Y Tyrosin
H Histidin	Q Glutamin	

Abb.	Abbildung
AIDS	Erworbenes Immundefizienzsyndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American tissue culture collection
bp	Basenpaare
d	Tag
BSA	Bovines Serumalbumin
C4bp	C4-bindendes Protein
CCR5	CC-Chemokine Receptor 5 (CD195), HIV Corezeptor
cDNA	Komplementäre DNA
CD4	Cluster of Differentiation 4, HIV Primärrezeptor
CMV	Cytomegalusvirus
CXCR4	CXC-Chemokine Receptor 4 (CD184), HIV Corezeptor
ddH ₂ O	Autoklaviertes Reinstwasser
DDT	Dithiothreitol
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>extracellular loops</i> , extrazelluläre Schleifen
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Env	Hüllprotein (<i>Envelope</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FP	Fusionspeptid
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GP	Glykoprotein
gp120	120kDa großes Glykoprotein von HIV-1
gp160	Vorläuferprotein von gp120 und gp41
gp41	41kDa großes Transmembranglykoprotein von HIV-1
HAART	Hochwirksame antiretrovirale Therapie (<i>highly active anti-retroviral therapy</i>)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
6-HB	Sechs-Helixbündel
His-Tag	8-Histidine-Tag
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HR	heptad repeat
HRP	horseradish peroxidase
IC	Inhibitionskonzentration (<i>Inhibitory concentration</i>)
IN	Integrase
IRES	Internal ribosome entry site
kD	Kilodalton
L	Gelenkregion (<i>linker</i>)
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus

LNGFR	Low-affinity nerve growth factor receptor
LTR	Long terminal repeats
mAb	monoklonaler Antikörper
MCS	Multiple cloning site
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexes
Min	Minuten
MLV	Murines Leukämievirus
mRNA	<i>messenger</i> RNA
Multi	Multimer
Nef	Negative factor
neg.	negativ
NP	Nukleokapsid Protein
ORI	<i>Origin of replication</i> (Replikationsursprung)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pol	Polymerase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PR	Protease
Rev	Regulator of expression of virion proteins
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	Rev responsive element
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat

SIV	Simian immunodeficiency virus
SP	Signalpeptid
ssRNA	einzelsträngige (<i>single stranded</i>) RNA
SV40	Simian virus 40
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T _H	T-Helferzellen
TM	Transmembrandomäne
TYK	Tyrosine kinase
Vif	viral infectivity factor
wt	wild Typ

7.3 Wissenschaftliche Publikationen und Posterpräsentationen

7.3.1 Publikationen

„Stable Expression of soluble therapeutic peptides in eukaryotic cells by multimerization: Application to the HIV-1 fusion inhibitory peptide C46“ Xavier Dervillez, Alexandra Hüther, Jochen Schuhmacher, Christian Griesinger, Jacques H. Cohen, Dorothee von Laer und Ursula Dietrich ChemMedChem. 2006 Mar;1(3):330-9

„Application of the EIIP/ISM Bioinformatics concept in development of new drugs“ Veljko Veljkovic, Nevana Veljkovic, José A. Esté, Alexandra Hüther und Ursula Dietrich Curr Med Chem. 2007;14(4):441-53. Review

„The emergence of peptides as therapeutic drugs for the inhibition of HIV-1“ AIDS Reviews, Alexandra Hüther und Ursula Dietrich AIDS Rev. 2007 Oct-Dec;9(4):208-17. Review

„Peptide ligands for CD4-induced epitopes on native gp120 mimic domains of the HIV-1 coreceptor CCR5 involved in HIV-1 entry“ Xavier Dervillez, Volker Klaukien, Alexandra Hüther, Sascha Antoni, Thomas Haarmann, Christoph Königs, Barabara Schnierle und Ursula Dietrich (in Bearbeitung)

7.3.2 Posterpräsentationen

Xavier Dervillez, Alexandra Hüther, Dorothee von Laer, Ursula Dietrich: „An eukaryotic expression system for the generation of stable soluble therapeutic peptides: proof of principle for the HIV-1 fusion inhibitory peptide C46“ Gesellschaft für Virologie 17.-20.03. 2004 Tübingen

Alexandra Hüther, Xavier Dervillez, Christoph Königs, Ursula Dietrich: „Generation of soluble multimeric heterofunctional molecules for the inhibition of HIV-1 entry“ Gesellschaft für Virologie Hannover, 16.–19.03.2005

Alexandra Hüther, Xavier Dervillez, Christoph Königs, Ursula Dietrich: „Generation of soluble multimeric heterofunctional molecules for the inhibition of HIV-1 entry“ Gesellschaft für Virologie München 15.-18.03.2006

Alexandra Hüther, Xavier Dervillez, Christoph Königs, Barbara Schnierle, Miguel Moreno, José Villalain, Volker Klaukien, Christian Griesinger, Ursula Dietrich: „Generation of soluble recombinant homomultimeric peptides with therapeutic interest: Application for HIV-1 entry inhibition“ TRIoH Frankfurt am Main, 23.03. 2005

Alexandra Hüther, Tim Krüger, Christoph Königs, Xavier Dervillez, Ursula Dietrich: „Generation of soluble multimeric peptides for inhibition of HIV-1 entry“ TRIoH open symposium, Barcelona 11.-12.12. 2006

Alexandra Hüther, Felix Hermann, Xavier Dervillez, Christoph Königs, Volker Klaukien, Christoph Griesinger, Sabine Lohrengel, Matthias Dittmar, Dorothee von Laer, Ursula Dietrich: “Entry inhibitory peptides: derivation of soluble multimeric peptides and development of resistance” TRIoH Leuven 11.-12.06. 2007

Alexandra Hüther, Tim Krüger, Benjamin Daelken, Winfried Wels, Christoph Königs, Xavier Dervillez, Ursula Dietrich: „Generation of soluble multimeric peptides for inhibition of HIV-1 entry“ Deutsch-Österreichischer AIDS Kongress Frankfurt am Main 27.-30.06. 2007

Alexandra Hüther, Xavier Dervillez, Dorothee von Laer, Ursula Dietrich: „Generation of soluble multimeric peptides for inhibition of HIV-1 entry“ Deutsch-Österreichischer Virologenkongress, Nürnberg 01.-05.09. 2007

7.4 Lebenslauf

Alexandra Hüther

Adresse: Launhardtstr. 7

60314 Frankfurt am Main

Geburtsdaten: 15.11.1977 in Zweibrücken

Familienstand: ledig

Schulbildung

1983-1987	Thomas Mann-Grundschule Zweibrücken
1987-1993	Mannlich-Realschule Zweibrücken
1993-1994	Hofenfels-Gymnasium Zweibrücken
1994-1997	Rittersberg-Gymnasium Kaiserslautern, mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

Studium

1997-2000	Grundstudium der Biologie mit Vordiplom an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
2000-2003	Hauptstudium mit Diplomprüfung in den Prüfungsfächern Immunologie, Mikrobiologie, Botanik Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Dr. Ursula Kurzik-Dumke am Institut für Genetik/Hämatologie, Uniklinik Mainz, Thema: „Untersuchungen der murinen und humanen <i>Tid</i> -Splicevarianten in normalen, apoptotischen und neoplastischen T-Lymphozyten“

Promotion

2003-2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) in der Arbeitsgruppe Dr. Ursula Dietrich am Georg-Speyer-Haus, in Frankfurt am Main
-----------	---