

Molekular- und zellbiologische Charakterisierung unterschiedlicher HIV-1
Subtypen im Verlauf der Krankheitsprogression

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe -Universität
in Frankfurt am Main

von
Ina Raudonat
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2002

(D F 1)

vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. B. Streit

Gutachter: Frau Prof. Dr. H. Rübsamen-Waigmann, Herr Prof. Dr. H. Fasold

Datum der Disputation: 11.06.2003

Inhaltsverzeichnis

1

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Krankheitsbild AIDS.....	7
1.2	Definition von AIDS	7
1.3	Das Humane Immundefizienz Virus (HIV).....	9
1.3.1	Morphologie und Replikationsmechanismen des HI-Virus	9
1.4	HIV-1-Replikationszyklus.....	14
1.5	Genetische Varianz des Humanen Immundefizienz Virus 1	16
1.6	Phänotypische Unterschiede von HIV-1-Populationen.....	19
1.7	Chemokinrezeptoren als Cofaktoren bei der HIV-1-Infektion.....	20
1.8	Zellvermittelte Immunität (<i>cell mediated immunity / CMI</i>)	25
1.9	Aufgaben des mononukleären Phagozytensystems im Immunsystem.....	26
1.10	Humorale Aktivierung des Immunsystems durch das HI-Virus.....	28
1.11	Immunpathogenese der HIV-1 Infektion.....	33
1.12	Verlauf der untherapierten Krankheitsprogression <i>in vivo</i>	35
1.13	Pathogenese der HIV-Erkrankung.....	37
2	Fragestellung und Zielsetzung	39
3	Material (inkl. Herstellernachweis).....	41
3.1	Material zur angewandten Methodik.....	41
3.1.1	Isolierung und Kultivierung von mononukleären Zellen aus humanem Blut	41
3.1.2	Neutralisationsexperimente auf Lymphozyten.....	42
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl	42
3.1.4	Herstellung von Teflonbeuteln.....	42
3.1.5	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	42
3.1.6	RT-Test	43
3.1.7	Nukleinsäure-Extraktion	44
3.1.8	Polymerasekettenreaktion	44

3.1.9	Antikörperisolierung.....	44
3.1.10	Papainschnitt	44
3.1.11	Proteinbestimmung.....	45
3.1.12	SDS-PAGE.....	45
3.1.13	PAA-Gelfärbung	45
3.1.14	Immunhistochemie	45
3.1.15	Kultivierung von adherenten Zellen.....	45
3.1.16	Desinfektionsmittel	46
3.2	Kulturmedien	46
3.2.1	PBL-Medium.....	46
3.2.2	Monozyten / Makrophagen - Medium.....	46
3.2.3	U87-Medium (Endvolumen: 520 ml).....	46
3.2.4	MT2-Medium	47
3.2.5	Freeze-Medium.....	47
3.2.6	RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 ohne Glutamin (käuflich).....	47
3.2.7	DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium) käuflich	47
3.3	Polyacrylamidgele.....	48
3.3.1	SDS-PAGE.....	48
3.4	Puffer	48
3.4.1	Coulter® p24 Antigen ELISA (Herstellerangaben)	48
3.4.2	QIAamp® Blood Kit (Herstellerangaben zu den Inhaltsstoffen fehlen)	48
3.4.3	RT-Test.....	49
3.4.4	V3-Peptid-ELISA	49
3.4.5	Laufpuffer für Agarosegele:	49
3.4.6	SDS-PAGE.....	50
4	Methoden.....	46
4.1	Schwerpunkt Zellbiologie.....	46
4.1.1	Isolierung von mononukleären Zellen aus humanem Blut	46

4.1.2	Kultivierung und Aktivierung von humanen, peripheren Lymphozyten	47
4.1.3	Kultivierung und Ausdifferenzierung humaner Monozyten / Makrophagen.....	49
4.1.4	Bestimmung der Zellzahl	50
4.1.5	Aufarbeitung HIV-1 infizierter Blutproben	51
4.1.6	Herstellung von Teflonbeuteln.....	52
4.1.7	Zellinfektion mit HIV in einem <i>in vitro</i> -System.....	52
4.1.8	Virusnachweisverfahren.....	54
4.1.9	V3-Peptid-ELISA.....	61
4.1.10	TCID ₅₀ -Bestimmung (<i>tissue culture infectious dose</i>).....	62
4.1.11	Bestimmung der Neutralisationsaktivität auf Lymphozyten	65
4.1.12	Bestimmung der Neutralisationsaktivität auf Makrophagen	68
4.1.13	Neutralisationsaktivität von aufgereinigten IgG's und deren Spaltprodukten.....	69
4.2	Anzucht, Kultur und Infektion unterschiedlicher Zelllinien.....	69
4.2.1	Vorstellung unterschiedlicher Zelllinien	69
4.2.2	Infektion von U87 Zellen mit Virusüberständen	71
4.2.3	MT-2 Assay (Ursprung MT-2 Zellen: Dr. B. Larder).....	71
4.3	Schwerpunkt Molekularbiologie	72
4.3.1	DNA-Extraktion aus peripherem, humanem Blut.....	72
4.3.2	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction/PCR</i>)	73
4.4	Schwerpunkt Proteinbiochemie.....	76
4.4.1	Serumantikörperisolierung.....	76
4.4.2	Herstellung von IgG-Fab-Fragmenten	77
4.4.3	Proteinbestimmung	78
4.4.4	SDS-PAGE (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>).....	79
4.4.5	Silberfärbung.....	80
5	Ergebnisse	82
5.1	Vorstellung des Patientenkollektives	82
5.2	Virusstockherstellung.....	83

5.2.1	Ergebnisse der Virusanzuchten.....	83
5.2.2	Bestimmung der Virustiter	84
5.3	Virusabwehrmechanismen der humoralen Immunantwort	86
5.3.1	Antikörpergewinnung aus dem Virusisolat HR006 und einer Folgeprobe.....	86
5.3.2	Veränderungen der V3-AK-Menge im Verlauf der Krankheitsprogression.....	88
5.3.3	Rolle der V3-Antikörper bei der Neutralisation auf Makrophagen	89
5.3.4	Neutralisationseffekt von HR006 und einer späten Folgeprobe mit autologen Seren.....	92
5.3.5	Infektions- und Neutralisationsverhalten der Isolate HR006 und HR006-IV	93
5.3.6	Neutralisationsaktivität von autologen Seren der Isolate HR006 und HR006-IV	97
5.3.7	Funktionsklärung autologer Immunglobuline bei der Neutralisation.....	99
5.3.8	Neutralisationsmöglichkeiten autologer Fab-Fragmente.....	101
5.3.9	Bestimmung der Kreuzneutralisationsaktivität auf Makrophagen	103
5.4	Charakterisierung der Infektiosität zellulärer Komponenten	106
5.4.1	Darstellung des SI- und NSI-Phänotyps auf MT-2 Zellen	106
5.4.2	Bestimmung der Chemokinrezeptornutzung einzelner Isolate	107
5.4.3	Darstellung der $\Delta 32$ Deletion des CCR5 Chemokinrezeptorgens	110
6	Diskussion	112
6.1	Qualitätsmerkmale bei der Virusanzucht.....	112
6.2	<i>In vitro</i> Modelle zum Funktionsnachweis von Antikörpern	116
6.2.1	Wirkung von P1-Peptiden auf das Neutralisationsverhalten von Antikörpern.....	116
6.2.2	Neutralisationsvergleich autologer Serumantikörper	119
6.2.3	Neutralisationsaktivität von isolierten Immunglobulinen.....	119
6.2.4	Kreuzreaktive Patientenseren bei Neutralisationsreaktionen.....	123
6.3	Chemokinrezeptornutzung im Krankheitsverlauf.....	124
6.4	Funktion des $\Delta 32$ -Deletionspolymorphismus	126
7	Zusammenfassung	129
8	Literaturverzeichnis	131
	Lebenslauf	153

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild AIDS

Die ersten gesicherten Berichte über Infektionen mit dem Erreger *Pneumocystis carinii* bei homosexuellen Männern ohne bekannte Grunderkrankung stammen aus dem Jahre 1979. Auffällig war ferner, dass einige dieser Patienten ein *Kaposi-Sarkom*, das bisher nur bei älteren Männern mediterraner Herkunft aufgetreten war, entwickelten (Gottlieb et al., 1981; *Centers for Disease Control*, 1981a; *Centers for Disease Control*, 1981b). Hinzu kamen häufig Infektionen mit *Toxoplasma gondii* und *Cryptosporidium*. Das neue Krankheitsbild war also hauptsächlich durch opportunistische Infektionen und seltene Neoplasien gekennzeichnet. Allen Patienten gemeinsam war ein Immundefekt, der durch eine CD4-T-Zell-Verminderung charakterisiert war. Da sich die Erkrankung zunächst nur bei homosexuellen Männern manifestierte, wurde sie als GRID (*Gay-Related Immunodeficiency*) bezeichnet. Im Jahr 1982 wurde dann erstmals der Begriff AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) geprägt (*Centers for Disease Control*, 1982).

1.2 Definition von AIDS

Der Begriff AIDS steht für keine eigenständige Krankheit, sondern für das Endstadium einer HIV-Infektion. Nach der Definition des *Centers for Disease Control* (CDC) liegt eine AIDS-Erkrankung vor, wenn bei einem Menschen, bei dem andere Gründe für eine Abwehrschwäche ausgeschlossen werden können, schwere opportunistische Infektionen und/oder seltene Tumore diagnostiziert werden (Übersichtsliteratur: Klietmann 1990; Yarchoan and Broder, 1989; Hirsch and Curran, 1989; Koch, 1987). Zu den opportunistischen Infektionen gehören Erkrankungen wie: (1) Mykobakterien, (2) Herpes simplex-Virus-Infektionen, (3) Zytomegalie-Virus-Infektionen, (4) Candidiasis, (5) Toxoplasmose und (6) *Pneumocystis carinii*-Pneumonie.

Zuerst wurde ausschließlich anhand der klinischen Symptome klassifiziert. Dabei teilte das CDC (1986) die AIDS-Erkrankung in 4 Stadien ein:

- Stadium I akute Infektion (unspezifisches Krankheitsbild)
- Stadium II Phase der klinischen Latenz (asymptomatisch)
- Stadium III persistierende, generalisierte Lymphadenopathie (PGL oder LAS)
- Stadium IV *AIDS-related complex* (ARC) und AIDS.

Diese Einteilung wurde 1993 unter Mitwirkung des CDC überarbeitet, um auch immunologische Parameter (CD4⁺-Zellzahl) zu berücksichtigen (LÁge-Stehr J und Helm EB, 1995).

Klinische Kategorien

CD4 ⁺ Zellzahl-Bereiche	A Asymptomatische oder akute HIV-Infektion bzw. persistierende Lymphknotenschwellung	B ARC-Syndrome	C AIDS-Indikator Krankheit
1 $\geq 500 /\mu\text{l}$	A1	B1	C1
2 200-499 $/\mu\text{l}$	A2	B2	C2
3 $< 200 /\mu\text{l}$	A3	B3	C3

Tab. 1. 1

Die Zuordnung eines HIV-Infizierten zu einem dieser Stadien wurde lange Zeit als irreversibel angesehen, da man von einer progredienten, zum Tode führenden Erkrankung ausging. Diese prognostische Einschätzung der HIV-Erkrankung hat sich durch die fortschreitende Entwicklung antiretroviraler Kombinationstherapien geändert. Die HIV-Erkrankung verläuft somit nicht zwangsläufig in eine Richtung (Helm EB, 1999).

1.3 Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)

1983 identifizierten Barré-Sinoussi, Chermann und Montagnier am Pasteur-Institut in Paris aus Leukozytenkulturen von AIDS-Patienten ein neues Retrovirus, das sie als Lymphadenopathie-assoziiertes Virus 1 (LAV 1) bezeichneten (Barré-Sinoussi et al, 1983). Drei Jahre später wurde festgelegt, das Virus als HIV (*Human Immunodeficiency Virus 1*) zu bezeichnen (Coffin et al. 1986).

Das HI-Virus gehört zur Gruppe der Lentiviren aus der Familie der Retroviren. Lentiviren sind nichtonkogene Viren, die zu persistierenden Infektionen mit langen Inkubationszeiten führen (<http://www.pavlakislab.ncifcrf.gov>, 1999).

1.3.1 Morphologie und Replikationsmechanismen des HI-Virus

Retroviren, zu denen neben HIV auch einige Tumoviren gehören, sind Viren, die ein RNA-Genom besitzen und in der Lage sind, Eukaryontenzellen zu infizieren. Ihr Genom besteht aus zwei identischen RNA-Strängen, die am 5'Ende eine Cap haben und am 3'Ende polyadenyliert sind. Im Verlauf der viralen Replikation wird dann die virale RNA, durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in provirale DNA umgeschrieben.

Weiterhin besteht das HI-Virus aus einer äußeren Hülle (*envelope*) und einem konisch-kegelförmigen Innenkörper (Capsid), der das RNA-Genom und verschiedene core-Proteine umschließt. Zu den Hauptstrukturproteinen der Virushülle gehört das Glykoprotein gp160, dessen globulärer Anteil gp120 (*SU/soluble*) knopfartig über der Partikeloberfläche hinausragt und das Hauptantigen des Virus darstellt. Über das gp120 wird bei der Infektion die Bindung zur Zielzelle hergestellt.

Der kleinere Anteil, der über Disulfidbrücken an das gp120 gebunden ist, besteht aus dem Transmembranglykoprotein gp41 (TM/*transmembrane*) und ist in der Lage, die Membranfusion zu initiieren. Die Lipiddoppelschicht der Virushülle entsteht durch *budding* aus der zellulären Plasmamembran. Das Hauptstrukturprotein des Innenkörpers ist das Capsidprotein p24, welches für den Aufbau des konisch-kegelförmigen Capsids verantwortlich ist. Weiterhin enthält das Capsid neben einer viralen Protease, die Reverse Transkriptase und die virale Integrase (Übersichtsliteratur: Gelderblom et al., 1987, Gelderblom 1991, Rübsamen-Waigmann et al., 2000).

Das HIV-Genom besitzt drei für Strukturproteine codierende Abschnitte. Zu diesen gehören gag (gruppenspezifisches Antigen), pol (Polymerase) und env (*envelope*). Das gag-Gen codiert ein 55kD Gag-*Precursor*-Protein (p55), das von der ungespleißten viralen mRNA exprimiert wird. Während der Translation wird der N-Terminus des p55 myristyliert, worauf eine Assoziierung mit der Zellmembran erfolgt (Bryant et al., 1990). Während der viralen Ausreifung wird das p55 durch eine virale Protease, ein Produkt des pol-Gens, in vier kleinere Proteine gespalten (Gottlinger et al., 1989). Zu diesen p55 Spaltprodukten gehören das Matrixprotein (p17), das Capsidprotein (p24), das Nucleocapsidprotein (p9) und das p6-Protein.

Das Matrixprotein (MA) entsteht aus dem N-Terminale Ende des p55. Es ist an die innere Oberfläche der Virion-Lipiddoppelschicht gebunden und sorgt damit für die Stabilisierung des Virions. Ein kleiner Prozentsatz des MA kann an Integrase binden und damit den Nucleartransport des viralen Genoms in den Zellkern fördern (Gallay et al., 1995). Dadurch ist HIV in der Lage, nichtteilende Zellen zu infizieren (Lewis et al., 1992). Das Capsidprotein (CA) formt den konischen core des viralen Partikels.

Die NC-Region des Gag ist verantwortlich für die Erkennung des *packaging*-Signals (Harrison et al., 1992). Das *packaging* Signal ist in der Nähe des 5'-Endes der viralen RNA lokalisiert und vermittelt die Inkorporation der RNA in das HIV-Virion (Poznansky et al., 1991).

Das p6-Protein vermittelt die Interaktion zwischen p55-Gag und dem Vpr (*viral protein R*). Nur mit Hilfe des p6 kommt es zur Inkorporation des Vpr in das Virion (Paxton et al., 1993).

Die viralen Enzyme werden von pol codiert. Zu ihnen gehören (1) die Reverse Transkriptase, (2) die virale Protease, (3) die virale Integrase und (4) die Ribonuclease H. Die Reverse Transkriptase transkribiert mit ihrer DNA-Polymeraseaktivität die RNA in DNA. Zusätzlich besitzt sie eine RNase-H Aktivität, die die RNA des DNA/RNA-Hybrid-Doppelstranges abbaut. Da ihr die *proofreading* Aktivität fehlt, kommt es bei der Strangneusynthese zu einer gehäuften Anzahl an falsch eingebauten Basen (Richetti et al., 1988). Die DNA kann innerhalb von 6 Stunden nach dem Viruseintritt in die Zelle neusynthetisiert werden (Zack et al., 1990). Für die Generierung der viralen DNA sind *cis-acting* Elemente der viralen RNA verantwortlich. Zu diesen Elementen zählt das TAR-Element. Es ist der Teil der viralen RNA, der die Bindungsstelle für das Tat (*transactivator*) beinhaltet. Bindet Tat an TAR, kommt es zu einer Verstärkung der viralen Transkription (<http://pavlakislab.ncifcrf.gov>).

Die Integrase vermittelt die Insertion der proviralen HIV-DNA in die genomische DNA der infizierten Zelle. Der Prozess wird durch drei verschiedenen Funktionen der Integrase ermöglicht (Bushman et al., 1990). (1) Eine Exonucleaseaktivität schneidet zwei Nucleotide von jedem 3'-Ende der linearen DNA ab. (2) Eine Doppelstrangendonuclease spaltet die Wirts-DNA an der Integrierungsstelle. (3) Eine Ligaseaktivität erzeugt einzelne, kovalente Verknüpfungen an jedem Ende der proviralen DNA. Zelluläre Enzyme reparieren die Integrationsstelle. Wenn die provirale DNA nicht integriert wird, werden die viralen Gene nicht exprimiert (Wiskerchen et al., 1995).

Env codiert ein Vorläufermolekül von 160kDa (gp160), das im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert wird und durch den Golgi-Komplex wandert, wo es zur Glykolysierung kommt. Durch zelluläre Proteasen wird gp160 daraufhin in zwei *env*-Untereinheiten (gp120 und gp41) gespalten. Das gp120 besitzt 5 hypervariable Regionen (V1-V5), deren Aminosäuresequenzen zwischen den einzelnen HIV-Isolaten sehr stark variieren können. Der V3-loop des gp120 ist nicht nur eine wichtige Determinante für den HIV-1 Tropismus (Hwang et al., 1991), sondern auch Ziel einiger neutralisierender Antikörper (Goudsmit et al., 1988). Außerdem können die V3-loop-Sequenzen mit HIV-1 Corezeptoren interagieren (Feng et al., 1996; Deng et al., 1996).

Das gp41 beinhaltet eine N-Terminale, fusiogene Domäne, die die Fusion des Virus mit der Zellmembran vermittelt und die Freisetzung der Virionkomponenten in das Cytoplasma der neuinfizierten Zelle ermöglicht (Camerini et al., 1990).

Zu den weiteren Bestandteilen des HIV-Partikels gehören neben regulatorischen Proteinen (Tat, Rev), noch mehrere zusätzliche Proteine (Nef, Vpu, Vpr, Vif). Tat ist ein transkriptioneller Transaktivator, der essentiell für die HIV-Replikation ist (Ruben et al., 1989). Tat kann in zwei Formen vorkommen. Durch früh gespleißte mRNA oder durch späte, inkomplett gespleißte mRNA. Beide Formen sind Transkriptionsaktivatoren und befinden sich im Nucleus oder Nucleolus der infizierten Zelle. Tat kann an TAR (Tat-bindende Region) binden, wodurch die Transkription der HIV-LTR um das 1000 fache erhöht werden kann (Feng et al., 1988; Roy et al., 1990; Kao et al., 1987; Feinberg et al., 1991; Southgate et al., 1991). Eine weitere Möglichkeit des Tat ist die Aktivierung der Expression einiger zellulärer Gene. Zu ihnen zählt der Tumornekrosisfaktor beta (TNF- β) und der *transforming growth factor* beta (TGF- β) (Brother et al., 1996; Rasty et al., 1996). Andere Gene können herunter reguliert werden. Neben dem bcl-2 gehört zu dieser Gruppe auch das Chemokin MIP 1- α (Sastry et al., 1996; Sharma et al., 1996).

Rev (*regulator of virion protein*) ist ein 13kD sequenzspezifisches RNA-Bindeprotein, das den Übergang von früher zu später Phase der HIV-Genexpression induziert (Zapp ML and Green MR, 1989). Rev ist ein wichtiger Bestandteil der HIV-1 Replikation. Proviren ohne Rev-Funktion sind zwar transkriptionell aktiv, exprimieren aber keine späten viralen Gene und somit werden keine Virionen produziert.

Zu den zusätzlichen Proteinen gehört das Nef-Protein (*negative regulatory factor*). Ein 27kD Protein, das von einem einzigen Exon codiert wird, welches sich bis in die 3'LTR (*long terminal repeat*) ausdehnt. Dem nef-Gen kommen mehrere Funktionen zu. Es ist u.a. bei der herunter Regulierung der CD4 Expression (Garcia JV and Miller AD, 1992) und der Zelloberflächen Expression von MHC Klasse I Molekülen beteiligt (Schwartz et al., 1996). Weiterhin kann es die Infektiosität von HIV stimulieren (Miller et al., 1994) und die T-Zell Aktivierung stören (Luria et al., 1991). Virionen, die in Abwesenheit von Nef entstehen, sind weniger effizient für die provirale DNA-Synthese, obwohl Nef keinen direkten Einfluss auf die Reverse Transkription hat (Schwartz et al., 1995). Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang Studien, in denen nef-defektive Viren im Affen (SIVmac239) und im Menschen verminderte Pathogenität zeigen (Ringler et al., 1991, Desrosiers et al., 1998).

Vpr (*viral protein R*) spielt einerseits eine Rolle bei der Fähigkeit von HIV nichtteilende Zellen zu infizieren (Heinziger et al., 1994) und andererseits ist Vpr in der Lage, die Zellteilung während der chronischen Infektion zu blockieren (Rogel et al., 1995; Jowett et al., 1995).

Vpu (*viral protein U*) ist ein 16kD Polypeptid, das in der Zellmembran lokalisiert ist (Sato et al., 1990). Zu den Funktionen des Vpu gehört neben der Herunterregulierung von CD4, auch die Verstärkung der Virionfreilassung (Klimkait et al., 1990).

Vif (*virion infectivity factor*) ist ein 23kD Polypeptid, das für die HIV Replikation in PBL's, Makrophagen und einigen Zelllinien von Bedeutung ist (Strebel et al., 1987). Vif defektive HIV-Stämme können Zellen infizieren, aber provirale DNA nicht effektiv synthetisieren (von Schwedler et al., 1993).

Schematische Darstellung des HI-Virus:

HIV-Partikeldurchmesser: ca. 100nm

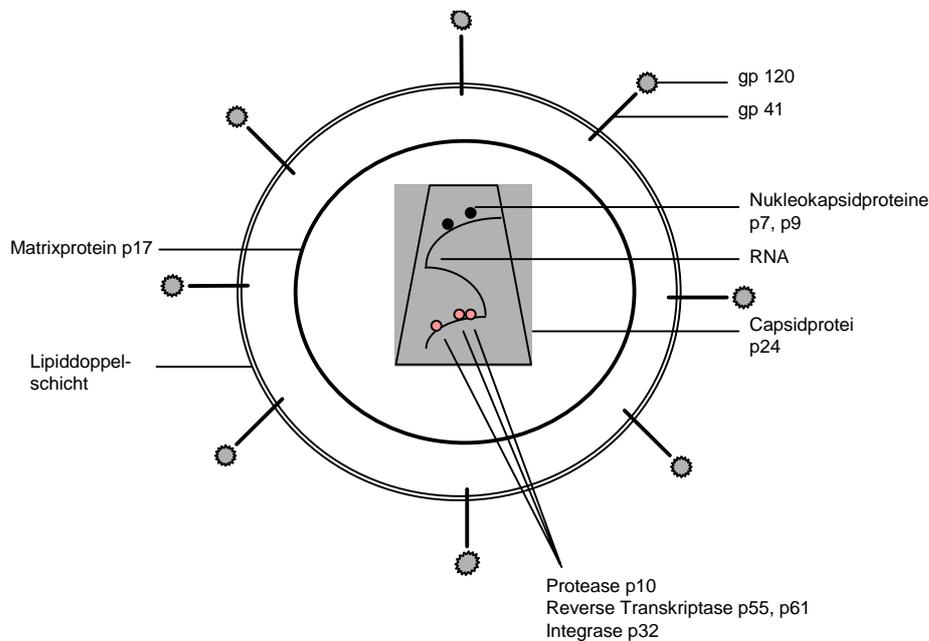


Abb. 1. 1

Die Regulation der Genexpression wird durch zelluläre und virale Faktoren beeinflusst. Zu den frühen Genen gehören *tat*, *rev* und *nef*. Sie werden in Rev-unabhängiger Weise exprimiert. Zu den späten Genen, die durch die mRNA codiert werden zählen *gag*, *pol*, *env*, *vpr*, *vpu* und *vif*. Die Transkription des proviralen Genoms wird durch einen einzigen Promotor in der 5'LTR vermittelt. Die Expression der 5'LTR führt zu einem 9kb-Primärtranskript, das alle 9 HIV-Gene codieren kann.

Die LTR (*long terminal repeat*) ist der Ort der Regulation der Transkription. Sie ist DNA-Bindungsstelle für viele zelluläre Transkriptionsfaktoren. Zu den wichtigsten Transkriptions-faktoren zählen die der NF- κ B Familie (Quelle: AIDS Knowledge Base <http://www.hivinsite.uesf>).

1.4 HIV-1-Replikationszyklus

Zuerst bindet das HI-Virus an zellspezifische Oberflächenrezeptoren der Zielzelle und penetriert die Zellmembran. Zu den potentiellen Zielzellen gehören neben CD4⁺-Zellen

- (1) T-Helfer-Lymphozyten (Klatzmann et al., 1984),
- (2) Monozyten / Makrophagen (Rübsamen-Waigmann et al., 1989; Kühnel et al., 1989)
- (3) Dendritische Zellen (Hughes et al., 1990),
- (4) Mikroglia (Meyenhofer et al., 1987; Pumarola-Suna et al., 1987),
- (5) Langerhans-Zellen (Rappersberger et al., 1988),
- (6) CD4⁺ Lungenfibroblasten (Plata et al., 1990),

weiterhin CD4⁻-Zellen wie z. B. CD8⁺-Lymphozyten (de Maria et al., 1991), Retinazellen (Cantrill et al., 1988), Nierenepithelzellen (Cohen et al., 1989) und Zellen des Gastrointestinal Traktes (Mathijs et al., 1988). Zusätzlich ist eine *in vitro*-Infizierbarkeit von Kupffer-Zellen (Schmitt et al., 1990) und humanen Hepatozyten der Leber (Cao et al., 1992) beobachtet worden (Übersichtsliteratur: Levy JA, 1993).

Eine große Rolle bei der Infektion der Zielzellen spielen die unterschiedlichsten Zelloberflächenrezeptoren. Zu ihnen gehören, neben dem CD4-Oberflächenrezeptor (Klatzmann et al., 1984), noch die Gruppe der Chemokinrezeptoren (Feng et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996 / siehe auch Abschnitt 1.7). Bei ihnen handelt es sich um Zelloberflächenrezeptoren, an die das Virus mit Hilfe des viralen gp120 andocken kann. Dieses erfährt daraufhin eine Strukturveränderung, worauf die Fusionsdomäne des Transmembranproteins (gp41) freigelegt wird (Wu et al., 1996; Trkola et al., 1996).

Sobald das Virus in die Zelle gelangt, wird das Ribonucleocapsid freigesetzt (*uncoating*), worauf im Folgenden durch Reverse Transkription die virale RNA in doppelsträngige DNA transkribiert wird. Diese DNA wandert daraufhin in den Nucleus und wird dort durch die virale Integrase in die Zell-DNA integriert (Lewis et al., 1992). Dabei kann die retrovirale DNA an vielen Stellen des Wirtsgenoms integriert werden, obwohl einige Zielstellen bevorzugt werden.

Die integrierte provirale DNA kann über einen längeren Zeitraum inaktiv bleiben (Latenz). Die Transkription neuer Virus-DNA erfolgt erst, wenn die Wirtszelle durch endogene oder exogene Faktoren funktionell aktiviert oder zur Proliferation stimuliert wird.

Nach der Integration nutzt das Provirus die zelluläre Transkriptionsmaschinerie (zelluläre RNA-Polymerase II), um die virale RNA zu exprimieren. Drei verschiedenen Formen viraler DNA sind in infizierten Zellen nachgewiesen worden: (1) lineare DNA, die von 2 LTR's flankiert wird und die sowohl im Cytoplasma, als auch im Nucleus infizierter Zellen vorliegen kann, (2) circuläre DNA, mit einer LTR und (3) circuläre DNA mit zwei LTR's. Nur lineare Moleküle können in die zelluläre DNA integrieren. Die circulären Formen liegen im Wirtszell Nucleus vor, sind aber nicht zur Integration fähig.

Zum Schluss bilden die viralen Strukturproteine und die genomische RNA neue Viruspartikel (*assembly*). Da das Nucleocapsid-gag-Protein spezifische RNA-Verpackungssignale (*packaging-signal*) erkennt, werden nur cytoplasmatische RNA's verpackt. Das Membran-*budding* (Virusaussetzung) wird durch das Matrixprotein, das mit der Zellmembran assoziiert ist induziert, d.h. es kommt zur Freisetzung der neu zusammengebauten Viren durch Knospung an der Plasmamembran. Während oder kurz nach dem Aussetzen, werden gag und gag-pol Polyproteine von der Protease gespalten. Die Spaltung ist ein wichtiger Schritt bei der Ausreifung der Viruspartikel, da aus Mutationen in der Protease, die Produktion nicht-infektiöser Viruspartikel resultiert.

1.5 Genetische Varianz des Humanen Immundefizienz Virus 1

Schon früheste Forschungsergebnisse zeigten, dass das HI-Virus eine hohe Variabilität besitzt (Rübsamen-Waigmann et al., 1986b; von Briesen et al., 1987; Srinivasan et al., 1987; Leigh Brown, A. J., 1991; Louwagie et al., 1992; Louwagie et al., 1993). Zur besseren Unterscheidung, werden HI-Viren in unterschiedliche Subtypen eingeteilt. Die Einteilung erfolgt anhand der Sequenzierung der viralen *env*- oder *gag*-Region (Meyers et al., 1998).

M (*major*) Gruppe Subtypen A-K

N Gruppe (*new, non-M oder non-O*)

O (*outlier*) Gruppe

U (*unclassified*) Gruppe

In jüngster Zeit wurde eine neue Gruppe (N) innerhalb HIV-1 positiver Individuen aus Kamerun eingegrenzt (Simon et al., 1998; Ayouba et al., 2000). Forschungsergebnisse von Corbet et al., 2000 zeigten, dass die *env*-Sequenz des HIV-1 N aus Kamerun eine hohe Ähnlichkeit zu den *env*-Sequenzen des Simian Immundefizienz Virus (SIV) *cpz-gab* der untersuchten Schimpansen aus Kamerun hatte. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass der Ursprung des HIV-1 bei Schimpansen zu suchen ist.

Die Subtypen A-K (Louwagie et al., 1993) der M-Gruppe unterscheiden sich zu ca. 30% in ihrer Aminosäuresequenz und grenzen sich genetisch zu ca. 50% von der O-Gruppe ab.

Die geographische Zuordnung eines Subtyps zu einem bestimmten Land, wird durch die Häufigkeit mit der ein Subtyp in einem Land auftritt ermöglicht. Als Trend kann man einerseits aufzeigen, dass in Afrika alle Subtypen vertreten sind und, dass andererseits manche Virusvarianten nur regional begrenzt vorkommen (z. B. Subtyp I in Zypern).

Subtyp	A	Zentralafrika, Westafrika (Peeters et al., 2000)
	B	Europa, Nord- und Südamerika (Vicente et al, 2000), Japan, Australien
	C	Süd-, Ostafrika (Novitsky et al., 1999), Brasilien, Indien (Lole et al., 1999)
	D	Zentralafrika, USA (Gao et al., 1994)
	E	Zentralafrika, Südostasien, Thailand (McCutchan et al., 1992; Weniger et al., 1991; Chaowanachan et al., 1998)
	F	Zentralafrika, Südamerika (Vicente et al., 2000; Laukkanen et al., 2000), Rumänien (Dumitrescu et al., 1994)
	G	Zentralafrika (Janssens et al., 1994), Russland, Taiwan
	H	Zentralafrika (Janssens et al., 1994), Rußland (Bobkov et al., 1994)
	I	Zypern (Leondios et al., 1995)
	K	Zentralafrika (Triques et al., 2000)
O Gruppe		Zentralafrika, Frankreich (Gürtler et al., 1994; Charneau et al., 1994)

Die Subtypen G-K spielen eine untergeordnete Rolle, da sie nur selten vorkommen. In jüngster Zeit, ließ sich ein gehäuftes Auftreten von non-B Subtypen in Deutschland aufzeigen (Dietrich et al., 1997). Dieser Trend konnte u.a. dadurch erklärt werden, dass sich viele Patienten, durch sexuelle Kontakte während eines Auslandsaufenthaltes mit dem HI-Virus infiziert hatten (Ruppach et al., 1996).

Des Weiteren lassen sich durch Sequenzierung einzelner Genomabschnitte Stammbäume und somit genetische Verwandtschaften zwischen Subtypen unterschiedlicher Regionen erstellen (Dietrich et al., 1992; M. Peeters, 2000). Bei einem Vergleich von Sequenzdaten der Subtypen B und D stellte sich ein sehr hoher Verwandtschaftsgrad heraus. Subtyp B und D sind sich so ähnlich, dass es besser gewesen wäre, sie zu einem einzigen Subtyp mit zwei "Unterklassen" zusammenzufassen (M. Peeters 2000). Dies ist bei dem Subtyp F geschehen, der in zwei Unterklassen (F1 und F2) eingeteilt wurde (Triques et al., 2000).

Weiterhin zeigte sich, dass das HI-Virus nicht nur innerhalb der Subtypenklassifizierung ein hohes Maß an genetischer Variabilität aufzeigt, sondern, dass auch innerhalb eines Patienten eine heterogene Viruspopulation vorliegt (von Briesen et al., 1987). Diesen Pool an genetischen Varianten bezeichnet man als Quasispezies (Wain-Hobson S., 1993; Delwart et al., 1993; Delwart et al., 1994).

Die höchste Varianz wurde innerhalb des *env*-Gens, in den variablen Domänen V1-V5 festgestellt. Der V3 loop (3. variable Domäne) ist die Haupt-Neutralisationsdomäne von HIV. Außerdem ist das HI-Virus in der Lage, mit Hilfe von Mutationen, Deletionen oder Insertionen einzelner Basen in das HIV-Genom, die humorale Immunantwort zu unterwandern (*escape* Mutanten) (McKeating et al., 1993a). Dabei wird die Sequenzdivergenz durch den Selektionsdruck des Immunsystems gefördert (Brown AJL, 1991).

Die hohe genetische Varianz beruht zum Teil auf der großen Fehlerrate der Reversen Transkriptase (RT) beim Umschreiben der viralen RNA in DNA. Die Fehlinkorporationsrate der HIV-RT liegt bei ca. 10^{-4} /Base. Vereinfacht bedeutet dies, dass es zu einer falsch eingebauten Base (*mismatch*) pro Genom pro Replikationszyklus kommt (Richetti et al., 1988).

Neben Punktmutationen durch die Reverse Transkriptase kann es auch zu Rekombinationen (*circulating recombinant forms* = CRF's) zwischen zwei oder mehreren Virusgenomen kommen (Carr et al., 1998). Cornelissen et al., untersuchten 1999 28 HIV-1 positive Serumproben von Immigranten in die Niederlande aus 12 verschiedenen afrikanischen Ländern. Die phylogenetische Analyse zeigte, dass die Proben unterschiedliche Mosaikstrukturen aufwiesen. 13 Proben waren als A (gag)/G (pol)/A (env) und 3 Proben als A (gag)/G (pol)/G (env) einzuteilen. Ein weiteres Beispiel für CRF's zeigten die Untersuchungen von 15 HIV-1 infizierten schwangeren Frauen aus Kamerun. Fünf der Proben wiesen einen Subtyp A/J (env/A und J/Protease-Gen) und sieben wurden als A/G-Rekombinanten eingestuft (Tscherning-Casper et al., 2000).

1.6 Phänotypische Unterschiede von HIV-1-Populationen

HIV-1-Isolate unterscheiden sich nicht nur im Genotyp, sondern zeigen auch Variationen im Phänotyp. Aus diesem Grund lassen sich HIV-1-Isolate nach ihrer Fähigkeit, nach erfolgter Infektion *in vitro* Syncytien zu induzieren (SI/*syncytium inducing*) oder nicht (NSI/*non-syncytium inducing*) einteilen (Rübsamen-Waigmann et al., 1986; Tersmette et al.; 1989).

Unter Syncytien versteht man die Bildung von multinukleären Riesenzellen, die aus Zellfusionen einzelner Zellen entstanden sind. Da das Virus durch *budding* freigesetzt wird, werden die Virushüllproteine in die Zellmembran integriert. Das gp120 des Virus kann nun als Zellwandbestandteil mit anderen CD4⁺-Zellen fusionieren. Es kommt daraufhin zur Syncytienbildung aus der terminal der Zelltod resultiert.

Genetische Untersuchungen des *envelope*- Bereichs von HIV-1 B-Subtypisolaten ließen erkennen, dass Aminosäure-Substitutionen im V3 loop an den Positionen 11 und 25 mit dem SI Phänotyp assoziiert sind. 83.3% der untersuchten SI-Isolate wiesen dort basische Mutationen auf.

Diese fehlten bei den NSI-Isolaten (Fouchier et al., 1992; De Jong et al., 1992). Daraus wurde gefolgert, dass die Aminosäuren an diesen Positionen des V3 loops für die Cytophathizität und den Zelltropismus verantwortlich sind (DeWolf et al., 1994).

Weiterhin werden die HI-Viren, bezogen auf ihren Wirtszelltropismus, eingeteilt. Virusisolate, die Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten infizieren können, werden als dualtrop oder amphotrop bezeichnet. Isolate, die vorwiegend Lymphozyten infizieren können, gelten als lymphozytotrop (T-trop). Entsprechend sind makrophagotrope (M-trope) Viren in der Lage, nur Monozyten oder Makrophagen zu infizieren.

Eine weitere Möglichkeit der Einordnung von Viren basiert auf ihrem unterschiedlichem Replikationsvermögen (Asjö et al., 1986; Fenyö et al., 1988). Die Einteilung erfolgt in diesem Fall nach Ausmaß und Geschwindigkeit der Replikation. Isolate mit schneller Kinetik und hoher Replikationsrate werden als *rapid/high*, langsam replizierende Isolate, mit verminderter Kinetik als *slow/low* bezeichnet.

Eine dritte Virusisolat-Einteilung berücksichtigt beide genannten Kriterien (von Briesen et al.; 1990b). Denn ein *rapid/high* Isolat zeigt häufig die Fähigkeit Syncytien zu induzieren (SI), während ein *slow/low* Isolat eher dem NSI-Typ zuzuschreiben ist. Diese Einteilung wird durch eine weitergehende Klassifizierung, die den Wirtszelltropismus berücksichtigt ergänzt. Von Briesen et al., stellten bereits 1990 fest, dass HIV-1 und HIV-2 Viren bestimmte Zielzellen bevorzugen. Einige Isolate wachsen besonders gut auf humanen T-Lymphozyten, während andere besonders gut Monozyten/Makrophagen infizieren können. Manche wuchsen weder auf Lymphozyten noch auf Makrophagen effektiv. Diese Beobachtungen zu Grunde legend wurde eine neue Klassifizierung des HIV-1 erstellt. Die Einteilung der HIV-Isolate erfolgt gemäss ihres Zelltropismus in die Subtypen α -d bei Lymphozyten und α - δ bei Makrophagen (von Briesen et al., 1990b).

In vivo bildet sich bei Infizierten, einige Monate nach Serokonversion, eine homogene Viruspopulation aus. Diese ist in der Regel *slow/low* replizierend, makrophagotrop und besitzt einen NSI Phänotyp (von Briesen et al., 1999; Tersmette et al., 1988; von Briesen et al., 1990; McNearney et al., 1992; Zhang et al., 1993; Zhu et al., 1993).

Diese Form des Phänotyps wird im Spätstadium der Erkrankung in der Regel durch hochreplizierende (*rapid/high*), lymphozytotrope Virusvariante mit syncytien-induzierendem Phänotyp (SI) abgelöst (von Briesen et al., 1987; Tersmette et al., 1989; Fenyö et al., 1988; Schuitemaker et al., 1992; Connor et al., 1993).

Die neuste Möglichkeit, Viren zu klassifizieren bzw. biologisch zu charakterisieren, erfolgt anhand der beim Viruseintritt in die Zelle benutzten Corezeptoren (Berger et al., 1998).

1.7 Chemokinrezeptoren als Cofaktoren bei der HIV-1-Infektion

Chemokine (*chemoattractant cytokines*) und ihre Rezeptoren spielen bei der Regulation von Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle. Chemokine, die zu der proinflammatorischen Superfamilie der Cytokine gehören, sind Proteine mit einer Länge von 70-90 Aminosäuren. Sie werden von CD4 und CD8 Zellen sekretiert und sind in der Lage, mit Hilfe ihrer chemotaktischen Eigenschaften Leukozyten zu aktivieren, um sie zum Ort der Entzündung zu leiten (Baggiolini et al., 1997).

Ihre Aktivität vermitteln Chemokine durch Bindung an Chemokinrezeptoren, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Bei Chemokinrezeptoren handelt es sich um 7-Transmembran-Domänen-Rezeptoren, die an ein G-Protein gekoppelt sind.

Die Einteilung der Chemokine erfolgt in vier Klassen, die sich durch ihre konservierten Cysteinreste definieren.

1. C-C-Chemokine (β -Chemokine)
2. C-X-C-Chemokine (α -Chemokine)
3. C-Chemokine (nur 1 Sorte im Menschen vorhanden)
4. CX₃C-Chemokine

Zu den natürlich vorkommenden Chemokinen zählen solche wie MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1*), MIP-1 β , RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*), MCP-3 (*macrophage chemoattractant protein*), MCP-4, SDF-1 (*stromal cell derived factor-1*), IL-8 (Interleukin 8), Eotaxin und Neurotactin.

Manchen, aber nicht allen zur Zeit bekannten Chemokinen ist es möglich, an verschiedene Chemokinrezeptoren zu binden. Beispielhaft stehen dafür MIP-1 α und RANTES, die an CCR1, CCR4 und CCR5 binden können. Gleichzeitig ist der Chemokinrezeptor CCR5 spezifisch für RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β (Samson et al., 1996; Combadiere et al., 1996; Raport et al., 1996).

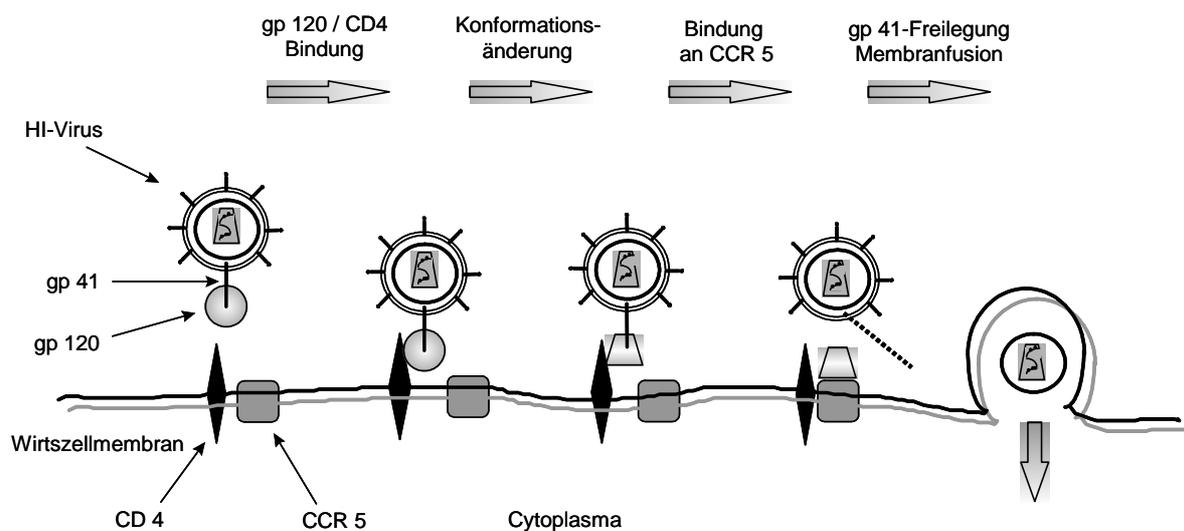
In jüngster Vergangenheit fand man heraus, dass nicht nur Chemokine in der Lage sind, an Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche zu binden, sondern auch HIV-1. (Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996; Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Doranz et al., 1996).

Das HI-Virus nutzt die Chemokinrezeptoren zusammen mit CD4 als Cofaktoren für den Viruseintritt in die Zielzelle. Genauer, geht das HIV-Env bei der Infektion zunächst eine Verbindung mit dem CD4 Oberflächenrezeptor der Zielzelle ein, um dann über die Interaktion mit Chemokinrezeptoren letztendlich die Fusion von viraler und zellulärer Membran zu erreichen (Wain-Hobson S., 1996).

Das HIV-Env besteht aus zwei nichtkovalent gebundenen Untereinheiten, die aus der Spaltung des Vorläuferglykoproteins gp160 entstanden sind (Abschnitt 1.3.1). Das gp120 enthält dabei die zur Infektion wichtige CD4-Bindestelle. Die andere transmembrane Untereinheit gp41, deren Ursprung das C-terminale Ende des gp160 ist, enthält hydrophobe Fusionspeptide, die direkt bei der Membranfusion beteiligt sind. Das natürliche Env ist ein Trimär aus 3 gp120/gp41-Komplexen.

Die folgende Abbildung erklärt den Sachverhalt des Infektionsmechanismus, berücksichtigt aber zur besseren Darstellung nur einen der drei gp120/gp41-Komplexe.

Abb. 1. 2 (Darstellung: modifiziert nach "One on one meets two" Simon Wain-Hobson, 1996).



Nachdem das HIV-gp120 Glykoprotein an den CD4 Oberflächenrezeptor der Zielzelle gebunden hat, induziert das CD4 eine Konformationsänderung des Hüllglykoproteins (Wyatt et al., 1998). Nun kann das gp120 mit der Transmembrandomäne des Corezeptors (in diesem Fall des CCR5) interagieren. Eine 2. Konformationsänderung, in der der Aminoterminus des gp41 aktiviert wird, folgt. Die daraufhin exponierten Fusionspeptide veranlassen die Integration der Virusmembran in die Wirtszellmembran. Zuletzt wandert der Capsidkomplex in das Cytoplasma, worauf die Reverse Transkription starten kann (Wu et al., 1996; Trkola et al., 1996).

Durch Klonierung und funktionelle Charakterisierung, wurde der Chemokinrezeptor Nr.5 (CCR5) als Cofaktor bei der HIV-Infektion identifiziert (Samson et al., 1996; Combadiere et al., 1996; Raport et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996; Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Doranz et al., 1996).

Relativ zeitgleich identifizierten Feng et al. (1996) einen weiteren Corezeptor, der in der Lage war, eine Env-vermittelte Fusion herbeizuführen. Sie nannten ihn Fusin (später CXCR4). Anschliessende Experimente zeigten, dass sowohl Primärisolate mit *rapid/high* (SI) Phänotyp wie auch T-Zelllinien adaptierte Stämme, α -Chemokinrezeptoren als Cofaktoren zur Zellinfektion verwenden können (Simmons et al., 1996; Zhang et al., 1996).

In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass Primärisolate vorwiegend CCR5, CXCR4 oder beide zum Eintritt in die Zelle nutzen (Zhang et al., 1996; Connor et al., 1997; Bjorndal et al., 1997; Scarlatti et al., 1997; Bazan et al., 1998). Seltener werden CCR3 und CCR-2b von primären HIV1-Isolaten zur Infektion genutzt (Choe et al., 1996; Doranz et al., 1996).

Mit dem *in vivo* beschriebenen *shift* von NSI- nach SI-Phänotyp und der damit verbundenen Bevorzugung unterschiedlicher Zielzellen zur Infektion, geht auch ein *shift* der genutzten Cofaktoren von CCR5 nach CXCR4 einher. Dadurch kommt es zum Verlust der Sensitivität auf Inhibierung durch β -Chemokine (Scarlatti et al., 1997).

HIV-1 Cofaktoren spielen nicht nur bei der Infektion der Wirtszelle eine Rolle, sondern eventuell auch bei der Transmission. Die Arbeitsgruppen um Dean et al. und Huang et al. fanden 1996 heraus, dass 1% einer untersuchten gesunden, kaukasischen Population einen Deletionspolymorphismus im CCR5 Chemokinrezeptorgen besitzen.

Diese 32bp umspannende Deletion am 2. extrazellulären *loop* des CCR5-Rezeptors führt zu einem *frameshift*, aus dem ein Stopcodon in der 5. Transmembrandomäne resultiert. Das Produkt kann dann nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Rana et al., 1997; Liu et al., 1996; Benkirane et al., 1997). Die Lage der $\Delta 32$ -Deletion wird in der folgenden Abbildung wiedergegeben.

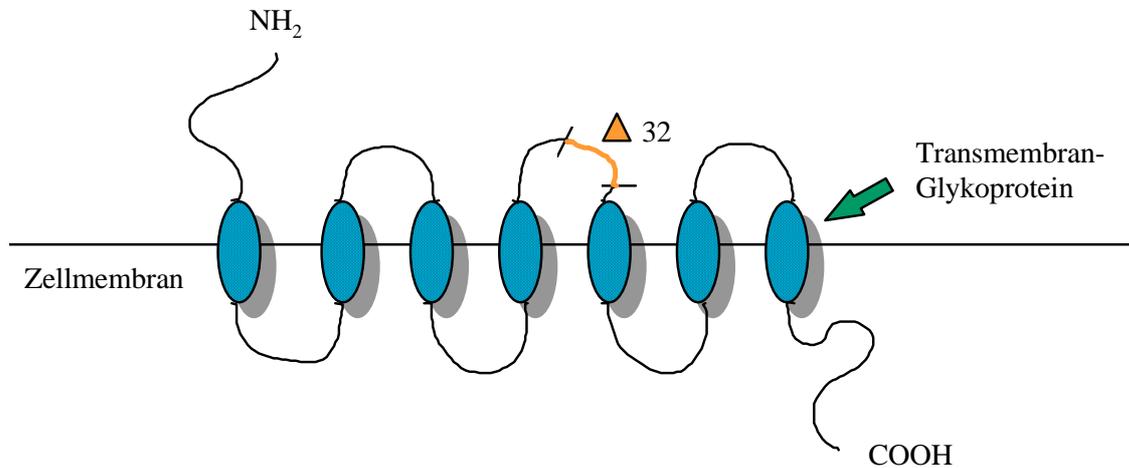


Abb. 1. 3

Liegt die $\Delta 32$ -Deletion homozygot ($\Delta 32/\Delta 32$) vor, so sind die betroffenen Personen resistent gegen eine Infektion mit einem HI-Virus, das ausschließlich CCR5 als Corezeptor benutzen kann. Es wurden jedoch homozygote Mutationen des CCR5 Rezeptors bei Personen, die mit einem SI Phänotyp infiziert worden waren, gefunden. Somit bietet eine $\Delta 32/\Delta 32$ Homozygotie keinen absoluten Schutz vor einer HIV Infektion (Balotta et al., 1997). *In vitro* Experimente unterstützen diese Beobachtungen, da periphere mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells* = Pbmc) und Periphere Lymphozyten (*peripheral blood lymphocytes* = PBL) aus diesem Personenkreis sich zwar mit CXCR4 Viren infizieren lassen, aber komplett resistent auf CCR5 Viren reagieren (Connor et al., 1996; Rana et al., 1997; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996; Paxton et al., 1996).

Das Vorkommen von $\Delta 32$ Deletionen im CCR5 Chemokinrezeptorgen, bei den in dieser Arbeit untersuchten Primärisolaten, ist in Kapitel 5.4.3 dargestellt.

1.8 Zellvermittelte Immunität (*cell mediated immunity* / CMI)

Immunantworten laufen niemals ausschließlich zell- oder antikörpervermittelt ab. Nur ein Zusammenspiel aus beiden Komponenten führt zu einer Immunantwort. Zu den Hauptkomponenten der T-Zellvermittelten Immunantwort gehören die T-Helferzellen.

T-Zellen reifen im Thymus, dem Ort der Proliferation und Lymphozytendifferenzierung. Während dieses Vorgangs werden die Antigenespezifität, die MHC-Restriktion und die Zugehörigkeit zu einer Lymphozyten-Subpopulation festgelegt. Dabei erfolgt die Festlegung der Antigenespezifität durch zufällige Kombination variabler Gensegmente. Als Resultat entstehen idiotypische Lymphozyten, die nur eine einzige Bindungsspezifität für ein Antigen besitzen. Für die Antigenerkennung sind weiterhin MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) essentiell.

MHC-Moleküle sind Zelloberflächenmoleküle, die wesentlich an der Steuerung der T-Lymphozyten beteiligt sind. Sie prägen das Repertoire der T-Zellen und ermöglichen ihnen, zwischen den verschiedenen Zelltypen des Organismus zu unterscheiden. Bei Kontakt mit einem Antigen werden Peptidfragmente des Antigens den T-Lymphozyten auf den MHC-Molekülen zur Erkennung dargeboten.

Man kann dabei zwei unterschiedliche Formen der Antigenpräsentation unterscheiden. Virale Antigene werden auf infizierten T-Lymphozyten, die das Virus replizieren, auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. Diese Form bezeichnet man als endogen, da die präsentierten Antigene (liegen als Peptid vor) von der Zelle selbst synthetisiert worden sind.

Wird eine Zielzelle durch eine Zytotoxische T-Zelle erkannt, lagern sich die beiden Zellen über Oberflächenmoleküle (z.B. CD4, CD8) aneinander. Erkennt anschließend der T-Zellrezeptor das auf einem MHC-I-Molekül präsentierte Antigen-Peptid, wird ein lytischer Mechanismus in Gang gesetzt, bei dem es zum Zelltod der Zielzelle kommt. Cytotoxische T-Zellen spielen bei der Virusabwehr eine große Rolle, denn aus der Lyse der infizierten Zellen resultiert eine Eindämmung der Virusvermehrung. Das Virus selbst kann von CTL's nicht angegriffen werden, sondern nur von Antikörpern.

Die exogene Form der Antigenpräsentation zeichnet sich durch die Aufnahme des Antigenes in eine Zelle (Makrophagen, B-Zellen, aktivierte T-Zellen, durch Interferon stimulierte Endothelien) aus. Die Aufnahme kann durch Phagozytose, Pinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose erfolgen. Zum Beispiel besitzen ausgereifte Makrophagen Fc-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche, mit deren Hilfe sie in der Lage sind, an Antikörper gebundene Pathogene (z.B. Viren) aufzunehmen (Kapitel 1.9). Danach wird das intakte Antigenmolekül in den Lysosomen der Zelle proteolytisch abgebaut und die daraus resultierenden Antigen-Peptidfragmente können dann, an MHC-II-Moleküle gebunden, an der Zelloberfläche präsentiert werden.

T-Helferzellen greifen regulierend in die Virusabwehr ein, indem sie durch die Produktion von Lymphokinen, mittels Chemotaxis, Abwehrzellen anlocken und aktivieren können (Übersichtsliteratur: W. Klietmann, 1990; Roitt et al., 1995).

1.9 Aufgaben des mononukleären Phagozytensystems im Immunsystem

Das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) wird durch Zellen repräsentiert, die in vielen Körpergeweben verbreitet sind und die eine große Rolle im Immunsystem spielen. Ihren Ursprung finden mononukleäre Phagozyten in pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks (Lasser, 1983). Aus den Stammzellen entwickeln sich über Zwischenstufen (Monoblasten, Promonozyten) Monozyten, die das Knochenmark innerhalb von 24h verlassen und in das periphere Blut wandern (Van Furth, 1981). Nach weiteren 12-32h wandern die Monozyten aus dem Blut in verschiedene Körpergewebe oder an Entzündungsorte, wo sie zu Makrophagen ausdifferenzieren (Van Furth et al., 1980). Der Vorgang der Ausreifung der Blutmonozyten zu Makrophagen des Gewebes wird als terminale Differenzierung bezeichnet und ist an funktionelle und phänotypische Veränderungen gekoppelt. So kommt es zu Veränderungen der Zellgröße, Morphologie und Cytochemie, sowie zu Änderungen der Zellfunktionen (Andreesen et al., 1986).

Ein weiteres Merkmal der Makrophagen ist, dass sie Oberflächenantigene exprimieren können, die bei Monozyten nicht gefunden werden (Brugger et al., 1991). Zu ihnen gehören neben CD71 (Transferrin-Rezeptor), CD51 (Vitronectin-Rezeptor), CD16 (niedrig affiner Fc-Rezeptor für IgG), noch die Expression der HLA-DR-Antigene und des hochaffinen Fc-Rezeptor für IgG.

Ausgereifte Makrophagen sind als mobile Zellen ubiquitär im Körper zu finden. So sind die Kupfferschen Sternzellen die Makrophagen der Leber. Sie sind in den Lebersinosoiden lokalisiert und stehen in Kontakt mit Endothelzellen. Zu ihren Aufgaben in der Leber gehört dabei die Phagozytose von Mikroorganismen und Antigen-Antikörper-Komplexen (Crofton et al., 1978). Weiterhin werden überalterte Erythrozyten durch Makrophagen der Leber und der Milz abgebaut. Die Makrophagen des Knochens (Osteoklasten) resorbieren mineralische und organische Komponenten des Knochens (Gothlin G and Ericsson JLE, 1976), die der Alveolaren der Lunge resorbieren hingegen Mikroorganismen (Lasser, 1983). Eine weitere Rolle der Makrophagen spielt die Antigenpräsentation bei immunologischen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (Hickey WF and Kimura H, 1988).

Weitere Lokalisationen von Makrophagen sind neben der Haut (Langerhanszellen), die Synovialflüssigkeit von Gelenken (Hooper et al., 1979), das Bindegewebe, die Nierenglomeroli (Schreiner et al., 1981), endokrine Organe (Hume et al., 1984) und der Gastrointestinaltrakt.

Lange Zeit glaubte man, dass während der symptomfreien chronischen Krankheitsphase nach einer Infektion mit dem HI-Virus, die HIV-Infektion in dieser Zeit ruht. Doch schon bald war klar, dass HIV während der chronischen Infektionsphase aktiv ist und die Virusbelastung ständig zunimmt. Bei einer HIV-Infektion wird das Virus durch ein Netzwerk von dendritischen Follikelzellen herausgefiltert und zurückgehalten. Das Virus verbleibt eine zeitlang in den Keimzentren der Lymphknoten (Pantaleo et al., 1993). Final kommt es zu einem starken Anstieg der Viruslast, die sich wahrscheinlich durch das Erschöpfen des Netzwerkes der dendritischen Follikelzellen, die in den Lymphknoten die Funktion haben, Krankheitserreger herauszufiltern und den T4-Lymphozyten Antigene zu präsentieren, erklären lässt. Durch den Verlust der dendritischen Zellen kommt es zur Rückbildung der Keimzentren in den Lymphknoten, die durch T8-Lymphozyten und Makrophagen ersetzt werden.

Das Resultat des Verlustes der Keimzentren ist das Auftreten von opportunistischen Infektionen (Pantaleo et al., 1993; Fauci 1993).

Im Falle entzündlicher Prozessen oder akuter Infektionen kommt es zur Aktivierung der Makrophagen und daraus resultierenden morphologischen und funktionellen Veränderungen ihrer Eigenschaften (North, 1987; Karnovsky and Lazdins, 1978). So können sie z.B. zu vielkernigen Riesenzellen mit multiplen Golgiregionen fusionieren (Postlethwaite et al., 1982). Die Riesenzellen stellen die letzte Stufe bei der Reifung des Mononukleären Phagozytensystems dar (Lasser, 1983).

Dieser Vorgang lässt sich mit der Bildung von Syncytien vergleichen. Auch hier entstehen multinukleäre Riesenzellen (CD4⁺-Zellen), die aus der Zellfusion einzelner Zellen resultieren. Der Unterschied besteht zum einen aus der Art der involvierten Zellen und zum anderen aus der Morphologie der Zellen. Die Zellmembran der aus Syncytien entstandenen CD4⁺-Zellen besteht aus Virushüllproteinen (gp120). Das gp120 des Virus kann als Zellwandbestandteil mit anderen CD4⁺-Zellen fusionieren. Eine solche Syncytienbildung führt zum Tod der Zelle. *In vivo* lassen sich CD4⁺ T-Zell Syncytien in peripherem Blut und in Lymphgewebe von HIV infizierten Patienten nachweisen (Stapleton et al., 1998).

1.10 Humorale Aktivierung des Immunsystems durch das HI-Virus

Die humorale Immunantwort ist bereits einige Wochen nach erfolgter akuter Infektion messbar. Bei der Infektion repliziert das HI-Virus mit einer Viruslast im Plasma von 10⁶ viralen RNA-Kopien/ml (Daar et al., 1991). Bereits 3 Wochen nach der Infektion erfolgt eine Vermehrung der HIV-spezifischen Cytotoxischen T-Zellen, der eine starke Senkung der Virämie folgt (Borrow et al., 1994; Koup et al., 1994).

Mori et al., haben 2000 in diesem Zusammenhang festgestellt, dass es auch im Falle einer geringen Virämie zu einer virusspezifischen Immunantwort der Cytotoxischen T-Zellen kommt. Genauer, in einem Experiment wurden sechs Rhesus Makakken mit einem SHIV (*chimeric simian immunodeficiency virus*) Erreger infiziert. Ein Teil der Affen (6 Affen) wurde daraufhin für 4 Wochen mit GW 420867, einer PEP (*postexposure prophylaxis*) behandelt. Der andere Teil (3 Affen) blieb unbehandelt.

Bei den PEP-Affen führte die Therapie zur Plasmavirämie unterhalb der Nachweisgrenze. Dieser Zustand blieb bis zu 90 Wochen nach der Infektion erhalten. Anhand der verzögerten Kinetik der anti-SIV-Antikörper Antwort konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur virusspezifischen CTL-Antwort, die virusspezifische humorale Antwort einen höheren Antigenspiegel benötigt. Eine Inhibierung der akuten, initialen viralen Replikation durch PEP hat die Entwicklung einer hoch-effektiven virusspezifischen zellvermittelten Antwort ermöglicht. Durch die antiretrovirale Behandlung werden vermutlich die virus-spezifischen T-Helfer Zellen, die mit Proliferation antworten vor der Zerstörung durch das HI-Virus geschützt (Oxenius et al., 2000; Malhotra et al., 2000). Wird unmittelbar nach der Infektion und vor der Serokonversion therapiert, so kann es zum *long-term non-progressor*-Stadium kommen (Altfeld et al., 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass das Auslösen der zellvermittelten Immunantwort keine massive Antigenproduktion *in vivo* benötigt. Die Virämie wird somit entscheidend von der CTL-Antwort beeinflusst.

Zu Beginn einer nicht-therapierten Infektion enthält das Serum große Mengen an HIV-spezifischen Immunglobulinen. In späten AIDS-Stadien fällt der Serumimmunglobulinspiegel stark ab, gleichzeitig verringern sich die Antikörpertiter gegen gp120 und p24 (Roitt et al., 1995). Die Aufgabe der aus B-Lymphozyten sezernierten Antikörper besteht darin, sich gegen strukturelle, regulatorische und enzymatische Elemente des Virus zu richten. Zusätzlich können sie mit Hilfe des Fc-Teils an Komplementfaktoren und zelluläre Rezeptoren binden. Neutralisierende Antikörper gegen frühe Virusisolate sind erst ein Jahr nach der Infektion messbar (Mackewicz et al., 1994; Moog et al., 1997a). Deshalb wird die Rolle der humoralen Immunantwort bei der Kontrolle der frühen Infektion kontrovers angesehen (Sattentau et al., 1996).

Die beim Menschen vorkommenden Immunglobuline werden in 5 Klassen unterteilt (IgM, IgG, IgA, IgD und IgE), die wiederum unterschiedliche Subklassen besitzen (IgG₁-IgG₄ und IgA₁, IgA₂). Den unterschiedlichen Antikörpern kommen dabei auch unterschiedliche Spezifitäten zu.

So aktivieren IgM und IgG₃ am besten das Komplementsystem, während IgG₂ und IgG₄ sehr gut placentalgängig sind. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass IgG₁ und IgG₃ via Fc-Rezeptor auf der Zelloberfläche an Monozyten und Makrophagen binden können.

Um eine Immunantwort zu verstärken, kann es zu einem Isotypen-*switch* kommen. Sekretiert zum Beispiel eine B-Zelle IgM, das nur schlecht an das jeweilige Antigen binden kann, kommt es zu einem *switch* in Richtung IgG oder IgA. Aus diesem *switch* resultiert dann eine stärkere Bindungsfähigkeit der Fab-Fragmente (Janeway, 1996). Genauer, ein Isotypen-*switch* bewirkt immer eine stärkere Antigen-Antikörper-Bindung.

Schon 1988 fanden Khalife et al. mit Hilfe von Western Blot Analysen heraus, dass verschiedene Immunglobulin-Isotypen unterschiedliche Spezifitäten zu HIV-Struktur-proteinen aufweisen. Es zeigte sich, dass die Immunantwort auf *gag*-Produkte polyisotypisch war (fast alle Immunglobulinklassen reagierten gleichermaßen; nur IgE reagierte vermindert). Die Antwort auf *pol*- und *env*-Produkte dagegen verlief monoisotypisch. Auf beide HIV-1-Produkte reagierten fast ausschließlich nur die IgG₁ Antikörper.

Es kommt dabei zur antikörperabhängigen zellulären Cytotoxizität (ADCC) (Ahmad et al, 1995). Im Einzelnen werden die infizierten Zellen, die Anigen-Antikörper-Komplexe an der Oberfläche tragen, von natürlichen Killerzellen oder Monozyten erkannt. Daraufhin kommt es zu einer cytokinvermittelten Aktivierung von Perforinen, die Poren in der Plasmamembran erzeugen können. Es folgt die Zerstörung der infizierten Zelle.

Neutralisierende Antikörper spielen bei der humoralen Immunantwort eine große Rolle. Unter Neutralisation versteht man die Reduktion der Infektion von Zielzellen, die aus der Antikörperbindung an Viruspartikel oder lösliche Rezeptorformen des Virus resultiert.

Diese Definition beinhaltet dabei nicht die Verminderung der Infektiosität durch Bindung von Antikörpern an Zellrezeptoren (Berger et al., 1999). Genauer, die Neutralisation, die durch HIV-positives Serum hervorgerufen wird, wird mit der verglichen, die aus der Reaktion mit HIV-negativem Serum resultiert. Dabei gilt folgende Formel:

$$\% \text{ Neutralisation} = (1 - p / n) \times 100$$

p = Virus-Medium-Menge, die in Kulturen produziert worden ist, die mit HIV-positivem Serum inkubiert worden sind.

n = Virus-Medium-Menge, die in Kulturen produziert worden ist, die mit HIV-negativem Serum inkubiert worden sind.

Es zeigte sich, dass nicht alle Virusstämme gleichermaßen durch V3 spezifische Antikörper neutralisiert werden können. So ist die Hauptneutralisationsdomäne (PND = *principal neutralizing determinant*) von TCLA (T cell line adapted) Viren Bestandteil des V3-loops (Javaherian et al., 1989; LaRosa et al., 1990; Freed et al., 1991). Dagegen spielen V3 spezifische Antikörper bei der Neutralisation von Primärisolaten nur eine untergeordnete Rolle (Spenlehauer et al., 1998; Beddows et al., 1998; Fortin et al., 2000).

Pinter et al. fanden 1998 heraus, dass die V1/V2 Domäne des HIV gp120 Epitope enthält, die Neutralisationsziele spezifischer Antikörper sind. Deletionsversuche von Stamatatos et al. 1998 mit dem Primärisolat SF162 (NSI, Sub B, magrophagotrop, neutralisationsresistent) zeigten dann, dass eine V1 loop Deletion (SF 162 Delta V1) keinen Unterschied zum Neutralisationsverhalten des Wildtyp-Virus aufwies. Die V2 loop Mutante (SF 162 Delta V2) erwies sich dagegen bei einer Reaktion mit Subtyp B Patientenserum, als um das 170 fache neutralisationssensibler als der Wildtyp. Gleiche Ergebnisse wurden mit Patientenserum anderer Subtypen (A, C, D, E und F) erzielt.

Daraus konnte man schließen, dass der V2 loop Regionen beinhaltet, die reich an Neutralisationsepitopen und bei unterschiedlichen Subtypen konserviert ist. Weiterhin zeigte sich, dass das Neutralisationsverhalten auch von der Art der Zielzellen abhängig ist.

Die Forschungsergebnisse von Stamatatos et al., 1997 verdeutlichten, dass mit dem HI-Virus infizierte Makrophagen neutralisationssensitiver in Bezug auf gp120 Antikörper sind, als infizierte Pbmcs. Durch Experimente von Ruppach et al. 2000, konnte in diesem Zusammenhang auf Lymphozyten in einem Zeitraum von 2-8 Monaten nach der Infektion, keine Neutralisationsaktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, wurde bereits 2 Monate nach der Infektion bei identischen Primärisolaten, auf Makrophagen eine Neutralisation (mit autologen Serumantikörpern) gemessen.

Durch neue Erkenntnisse konnte dargestellt werden, dass neben dem viralen Hüllprotein (gp120) auch Zelloberflächenrezeptoren, wie z.B. Chemokinrezeptoren und DC-SIGN die humorale Immunantwort beeinflussen können.

Dendritische Zellen (DC) sind hauptsächlich in peripherem, Mucosagewebe (Rectum, Uterus, Zervix), lokalisiert. Sie exprimieren, neben CD4 und CCR5 (Granelli-Piperno et al., 1996; Rubbert et al., 1998) noch LFA-1 (*leukocyte-function associated antigen-1*), LFA-3 und DC-SIGN als weitere Rezeptoren auf der Zelloberfläche. DC-SIGN ist ein Lectin des C-typs, das mit hoher Affinität an ICAM-3, einen Rezeptor der von ruhenden T-Zellen exprimiert wird, binden kann (Geijtenbeek et al., 2000). Der Oberflächenrezeptor DC-SIGN der Dendritischen Zellen hat eine hohe Affinität zu dem gp120 des HI-Virus (Curtis et al. 1992). Bei einer HIV-1 Infektion bindet das Virus mit Hilfe des DC-SIGN an die Dendritischen Zellen in der Mukosa, welche zu den potentesten Antigen präsentierenden Zellen *in vivo* gehören (Valitutti et al. 1995; Banchereau and Steinman 1998).

Daraufhin wandern die Dendritischen Zellen in die sekundären Lymphatischen Organe, präsentieren ihre Ag-Ladung worauf es zur T-Zell Aktivierung kommt (Shaw et al., 1986; Adema et al., 1997; Banchereau and Steinman 1998).

Genauer, DC-SIGN "fängt" HIV-1 in der Päriferie ein und transportiert das Virus auf den Dendritischen Zellen in die sekundären Lymphatischen Organe, um dort die Infektion zu verstärken (Geijtenbeek et al., 2000). Die Migration der Dendritischen Zellen von der Päriferie zu den Lymphknoten kann einen Zeitraum von 2 Tagen nach erfolgte HIV Infektion einnehmen (Barratt-Boyes et al., 1997; Stahl-Hennig et al., 1999).

DC-SIGN ist dabei in der Lage, HIV-1 über einen Zeitraum von 4 Tagen zu binden. Das Virus ist danach immer noch zur Infektion von CD4⁺-Zellen fähig (Steinman et al., 1997).

Bei der Infektabwehr spielt neben der Ag-AK-Antwort, der Infektionsmodus des Virus eine große Rolle. Ein Beispiel dafür ist das Influenza Virus. Ein RNA Virus, das zu einer akuten Infektion führt. Bei einer Influenza Infektion werden Antikörper gegen Komponenten auf der Virusoberfläche (Hämagglutinin, Neuraminidase = *critical sites*) gebildet. Eine Antikörper-antwort erfolgt schnell und effektiv, bis es zu Mutationen oder Antigen drift kommt und das Virus die Antikörperantwort unterwandert. Es kommt somit zu keiner chronischen Infektion.

Im Gegensatz dazu kommt es bei der HIV-1 Infektion zu einer Latenzphase, in der das Virus inaktiv in den Zellen vorhanden ist. Das Virus bleibt in diesem Fall, als chronische Infektion bestehen, während es bei der akuten Influenzainfektion wirksam aus den Wirtszellen eliminiert werden kann (zusammengefasst in Roitt et al., 1995).

1.11 Immunpathogenese der HIV-1 Infektion

Eine Infektion mit dem HI-Virus führt untherapiert zu einer Immundysfunktion mit Verlust von CD4⁺ Zellen, u.a. einer durch Env vermittelten Synzytienbildung und letztendlicher Apoptose (programmierter Zelltod) der Immunzellen (Planelles et al., 1995). Dabei kommt es zu einer direkten Schädigung infizierter Zellen und zu Autoimmunreaktionen des Immunsystems (Keay et al., 1995). Eine Studie über Autoantikörper auf der Oberfläche CD4⁺ Lymphozyten bei Haemophiliepatienten belegte, dass Autoantikörper gegen zirkulierende CD4⁺ Lymphozyten die Funktion der Zellen inhibieren können. Dabei wird speziell die Freisetzung von Cytokinen beeinflusst. Aus der Dysfunktion der CD4⁺ Lymphozyten resultiert wahrscheinlich die Erschöpfung der CD8⁺ Zellen bei AIDS-Patienten (Daniel et al., 1996).

Durch immunsuppressive virale Proteine, durch opportunistische Sekundärinfektionen und Tumore wird das Immunsystem weiterhin negativ beeinflusst. Zusätzliche Abnormalitäten sind eingeschränkte Aktivitäten von antigenpräsentierenden Zellen, abnormale Monozyten/Makrophagen-Funktionen, verminderte Funktion von natürlichen Killerzellen (NK) und Anti-Lymphozyten-Antikörpern (Stricker et al., 1987).

Neueste Forschungsergebnisse zeigten in diesem Zusammenhang, dass durch eine kurze Gabe antiretroviraler Substanzen (z.B. RT-Inhibitor GW 420867) es zu einem "Schutz" der Mechanismen kommen kann, die Bestandteil der antiviralen Wirtsabwehr, wie z.B. CTL's und CD4⁺ T Helferzellen sind (Mori et al., 2000). Die Funktion der zellulären Immunantwort bleibt somit über einen langen Zeitraum erhalten.

Andere Arbeitsgruppen hatten ähnliche Ergebnisse beobachten können. Van Rompay et al., (1999) infizierten acht neugeborenen Makakken mit dem SIV_{mac055}-Erreger. Drei von ihnen dienten als Kontrolle und entwickelten binnen 3 Monaten eine fatale Immundefizienz. Die anderen Affen wurden mit PMPA (Tenofovir) für 4 Wochen behandelt. Mit dem Resultat, dass ein Teil der Affen eine stark verzögerte Virämie aufzeigte, während der andere Teil keine Zeichen einer Infektion aufwies. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die prophylaktische Einleitung einer antiretroviralen Therapie kurz nach der Infektion das Immunsystem soweit unterstützt, dass es für einen langen Zeitraum funktionsfähig bleibt und die Viruslast im Körper gering gehalten werden kann.

Unterbleibt eine Therapie mit antiretroviralen Substanzen kommt es zu Störungen des Immunsystems die sich u.a. in einem Defekt der CD4⁺ Zellen äußern. Individuen mit einem frühen, steilen CD4⁺ Zellverlust entwickeln ein höheres Risiko AIDS zu bekommen, als solche mit einem geringeren CD4⁺ Zellverlust (Cozzi Lepri et al., 1998). Vergleicht man dabei HIV1 und HIV2, so stellt sich heraus, dass bei einer HIV1 Infektion der Verlust von CD4⁺ Zellen schneller verläuft, als bei einer Infektion mit dem HIV2 Erreger (Jaffar et al., 1997). Eine große Rolle bei der Progression zu AIDS spielt die anfängliche "Struktur" der Viruspopulation. Zeigt die Viruspopulation zum Zeitpunkt der Serokonversion (Auftreten erster Anti-HIV-Antikörper im Serum) eine hohe Variabilität auf, so nimmt man an, dass es zu einer weniger schnellen Progression zu AIDS kommt. Bei einer homogenen Viruspopulation könnte es folglich zu einer schnelleren Progression zum Krankheitsbild AIDS kommen (Shankarappa et al., 1995).

Da das Immunsystem hauptsächlich aus T-, B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen besteht, die durch direkten Kontakt oder durch sekundäre Botenstoffe (z.B. Interleukine, Interferone) gesteuert werden, ist eine Schädigung dieser Kontrollorgane besonders schwerwiegend. Zum Beispiel beobachteten Esser et al. 1991 eine fehlerhafte Cytokinsekretion bei infizierten Makrophagen. Da Makrophagen nicht in der Lage sind, sich zu teilen, halten sie die HIV-Produktion über einen langen Zeitraum hinaus aufrecht (von Briesen et al., 1990a). Eine aberrante Cytokinsekretion könnte ihre Aufgabe als antigen-präsentierende Zelle derart beeinflussen, dass es zu starken Beeinträchtigungen des Organismus (Kachexie, Erkrankungen des ZNS) kommen kann.

1.12 Verlauf der untherapierten Krankheitsprogression *in vivo*

Nach erfolgter Infektion mit dem HI-Virus kommt es sofort zur aktiven, viralen Replikation, die durch die Viruslast (*viral load*) im Serum dargestellt wird. Dabei repliziert das Virus mit hohen Titern, deren Plasma Viruslast $> 10^6$ Virus-RNA Kopien/ml betragen kann (Daar et al., 1991).

Die virale Replikation kann im Folgenden zu einer transienten Verringerung der CD4⁺ Zellzahl führen (Abschnitt 1.10), woraufhin es bereits in diesem Stadium zur Ausbildung von opportunistischen Infektionen kommen kann (Cochran et al., 1999; Gross et al., 2000; Kaplan et al., 2000). Zu diesem Zeitpunkt ist meistens das Immunsystem noch in der Lage, mit Hilfe spezifischer Anti-HIV-Antikörper und Cytotoxischen T-Lymphozyten, die virale Replikation zu kontrollieren.

Die ersten spezifischen Antikörper entstehen innerhalb von 6-12 Wochen nach Exposition (Zeitpunkt der Serokonversion). Die Serokonversion ist mit einem starken Abfall der Virämie gekoppelt. Genauer, vergrößert sich während der HIV-Primärinfektion die Viruslast im Plasma, erreicht einen Peak und verringert sich dann. Es gibt unterschiedliche Hypothesen für die Veränderungen der Viruslast im Verlauf der Krankheitsprogression. So geht Klenerman et al., 1996 davon aus, dass ein Grund für die Verringerung der Viruslast in der Zielzellverminderung zu sehen ist (*target-cell-limited-model*). De Boer et al, 1998 entwickelten mathematisch zwei unterschiedliche "Räuber-Beute Modelle".

Das erste Modell, auch ein "*target-cell-limited-model*" versucht das klinische Latenzstadium bei einer HIV-Infektion durch die Verfügbarkeit von Zielzellen zu erklären. Dabei ist das Virus der "Räuber" und die Zielzelle die "Beute". Doch ist dieses Modell nicht ausreichend, da die Immunantwort außer acht gelassen wird. So wurde ein zweites, mathematisches Modell entwickelt, indem das Virus als "Beute" zu sehen ist, die durch die Immunantwort, als "Räuber" kontrolliert wird. Beide Modelle von De Boer können zur Erklärung der Krankheitsprogression, in deren Verlauf die CD4⁺ Zellzahl langsam abnimmt und die Viruslast langsam zunimmt herangezogen werden.

Die Ergebnisse Staffords et al., 2000 zeigen in diesem Zusammenhang, dass die Verringerung der Viruslast zum einen, aus der Zerstörung der infizierten Zielzellen durch Cytotoxische T-Lymphozyten und zum anderen aus der Unterdrückung der viralen Replikation durch Cytokine resultiert.

Die Viruslast hat im Krankheitsverlauf einen großen prognostischen Wert und wird von zwei Komponenten beeinflusst. Neben der virusspezifischen Wirtsantwort, sind die biologischen Eigenschaften des Virus selbst von Bedeutung (Mellors et al., 1996). Liegt als Folge beider Faktoren der HIV-1 Plasma RNA-Spiegel unter 4^{10} Kopien/ml so besteht ein geringes Risiko an AIDS zu erkranken. Liegt er darüber, so ist die Wahrscheinlichkeit AIDS zu entwickeln stark vergrößert (Sabin et al., 2000).

Bei seinen Untersuchungen von HIV infizierten Kindern in Südost-Afrika beobachteten Taha et al., 2000, dass Kinder mit geringer $CD4^+$ Zellzahl ($< 15\%$) und hoher Viruslast (≥ 250.000 Kopien/ml) eine geringere Überlebenschance hatten, als solche mit hoher $CD4^+$ Zellzahl und geringer Viruslast.

Obwohl nur 1 von 3 Millionen Viren infektiös sind (Layne et al., 1992) und kurz nach der Serokonversion nur ca. 10^4 bis 5×10^4 Lymphozyten das HIV-Genom tragen, treten Anzeichen einer chronischen Infektion auf. Als Anzeichen für eine chronische Infektion wird das Erscheinen eines persistierenden Lymphadenopathie-Syndroms (PGL) gewertet. Es kommt zur Schwellung der Lymphknoten in Nacken, Achselhöhlen und Leisten. Die letzte Phase der Erkrankung und damit die Progression zu AIDS ist durch eine Regression der Lymphknoten bei gleichzeitigem Rückgang der $CD4^+$ -Zellzahl gekennzeichnet. Durch den Aktivitätsverlust des Immunsystems kommt es zu einer verstärkten Virämie im Blut, die mit der Entwicklung HIV-assoziiierter Erkrankungen einhergeht.

1.13 Pathogenese der HIV-Erkrankung

Vom Zeitpunkt der Infektion bis zur Manifestation des AIDS-Vollbildes liegt ein nicht definierter Zeitraum, der eine von Patient zu Patient variable Zeitspanne umschließt, vor. Der Zeitraum von der Infektion bis zur AIDS-Erkrankung ist dabei in Abhängigkeit von der Viruslast zu sehen (Mellors et al, 1996) und kann mathematisch durch unterschiedliche Modelle erklärt werden (Abschnitt 1.12).

Diese Beobachtungen zu Grunde legend werden Infizierte, basierend auf ihre Krankheitsprogression, in mehrere Gruppen eingeteilt. Infizierte, die sehr langsam an AIDS erkranken, werden als *slow progressors* (SP), solche, die schnell die ersten Krankheitssymptome zeigen, als *fast progressors* (FP) und solche, die erst nach vielen Jahren das Vollbild AIDS entwickeln, als *late progressors* (LP) bezeichnet.

Eine weitere Gruppe von Infizierten, die etwa 10% umfasst, zeigt sich nach einem Zeitraum von 10-12 Jahren oder länger asymptomatisch (ohne Therapie, ohne immunologische Progression). Sie trägt den Namen *long-term nonprogressors* (LTNP) (Buchbinder et al., 1994). Die Bezeichnungen SP und LP werden dabei in der Literatur zum Teil auch synonym benutzt.

Bei einer Infektion mit HIV kommt es, neben einer schnellen Virusreplikation, auch zu einer Immundefizienz und einer chronischen Aktivierung des Immunsystems. Polyspezifische Cytotoxische T-Zellen (CTL's), die gegen multiple HIV-Epitope gerichtet sind und die Zahl der infizierten Zellen reduzieren können, ohne diese jedoch ganz zu eliminieren, spielen hierbei eine große Rolle (Haas et al., 1997; Goulder et al., 1996). In der akuten, primären Phase der Infektion werden vor allem CD4⁺-Zellen mit dem HI-Virus infiziert, worauf das Virus in den Zellen repliziert und über das Blut in andere Organe (Lymphknoten, Gehirn) transferriert wird.

Diesen viralen Angriff schlägt das Immunsystem mit CD8⁺-T-Zellen (Killerzellen) und Antikörpern (aus B-Zellen) zurück. Dabei zeigen Patienten, die ein großes Reservoir an CD8⁺-T-Zellen mobilisieren können, eine langsamere Progression zu AIDS (Pantaleo et al., 1997). Weiterhin spielen Makrophagen bei der Virusabwehr eine große Rolle. Als Teil des mononukleären Phagozytensystems sind sie nachdrücklich durch Phagozytose an der Viruszerstörung beteiligt (Abschnitt 1.9).

Phänotypische Forschungsergebnisse zeigten, dass es 6-8 Monate vor der klinischen Progression zu einem *switch* in Richtung SI-Phänotyp kommt (Bruisten et al., 1997). Weiterhin wurden von Zhang et al. 1997 eine erhöhte Neutralisationsaktivität von *long-term nonprogressors* (LNTP's) im Vergleich zu *fast progressors* nachgewiesen. Ein Vergleich von *late progressors* vs *long-term nonprogressors* zeigte allerdings keine Unterschiede der Serumneutralisationsaktivität, in diesem Fall gegen heterologe HIV-Primärisolate, auf (Pontesilli et al., 1999).

Mit der Entdeckung der HIV-Corezeptoren wurden neue Forschungsergebnisse veröffentlicht, die diese in Zusammenhang mit der Krankheitsprogression brachten. So stellten Xiao et al. 1998 fest, dass die Progression zu AIDS nicht nur mit dem Absinken der CD4⁺-Zellzahl auf $\leq 200/\text{mm}^3$, sondern auch mit der multiplen Benutzung von Corezeptoren korreliert. Am Anfang der Infektion wird häufig CCR5 als Corezeptor für den Viruseintritt in die Zelle benutzt. Später setzen sich dann Virusvarianten durch, die zusätzlich noch CXCR 4 und/oder CCR3 zur Infektion benutzen können. Bei der Manifestierung von AIDS hat sich das Variantenspektrum der zur Infektion verwendeten Corezeptoren, dann um CCR1, CCR2b, CCR4 und BOB erweitert. Weitere Forschungsergebnisse zeigten, dass die Anfälligkeit für eine HIV-1 Infektion und die folgende Krankheitsprogressionsrate mit dem Polymorphismus der Wirtszellgene für CCR5 und CCR2 assoziiert ist (Dean et al., 1996; Michael et al., 1997; Smith et al., 1997).

2 Fragestellung und Zielsetzung

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Untersuchungen von Ruppach et al., 2000, die zeigten, dass bereits kurz nach der Serokonversion humane Seren von HIV-1 infizierten Patienten, in der Lage waren, autologe Virusisolate auf Makrophagen, nicht aber auf Lymphozyten zu neutralisieren. In diesem Zusammenhang bestätigen die Ergebnisse weiterer Autoren, dass kurz nach der Serokonversion, HIV1-spezifische Antikörper, autologe Virusisolate auf Lymphozytenkulturen, nicht neutralisieren können (Binley et al., 1997; Moore et al., 1994).

Da Makrophagen, neben Lymphozyten zu den wichtigsten Zielzellen bei einer HIV-Infektion *in vivo* gehören (von Briesen et al., 1990; Gartner et al., 1986; Gendelman et al., 1989; Kühnel et al., 1989; Rübsamen-Waigman et al., 1989; von Briesen et al., 1990; Smith et al., 1997) und mit ihrer Hilfe das Virus in das Lymphsystem und andere Organsysteme gelangen kann (Housset et al., 1990; Koenig et al., 1986; Smith et al., 1997; Toossi et al., 1997), sollen sie besondere Aufmerksamkeit erhalten.

Im Rahmen dieser Promotion sollen Veränderungen des HI-Virus und der humoralen Immunantwort im Laufe der Krankheitsprogression untersucht werden. Dabei sollen Ursprungsproben (untherapiert) mit den Folgeproben (z.T. therapiert) desselben Spenders verglichen werden. Im Vordergrund stehen Neutralisationsversuche der HIV1-Proben kurz nach Serokonversion, im Vergleich mit Proben desselben Spenders, die zu einem späteren Zeitpunkt entnommen worden sind, auf einem Makrophagensystem.

Ein wichtiger Punkt ist in diesem Zusammenhang die Eingrenzung des möglichen Mechanismus der Neutralisation auf Makrophagen. Welche Antikörper spielen eine Rolle bei Neutralisationsreaktionen? Sind es die V3-Antikörper?

Zur Untersuchung des individuellen Krankheitsverlaufs eines Patientenkollektives von 16 Patienten standen Blut-, Plasma- und Serumproben der infizierten Personen zur Verfügung. Diese wurden in Intervallen von 3-6 Monaten mehrmals abgenommen, um eine Charakterisierung des Probenmaterials in Hinblick auf die Veränderungen des Neutralisationsverhaltens während des Krankheitsverlaufes zu ermöglichen. Zu den Grundvoraussetzungen zur Aufnahme in die Promotionsstudie gehörte u.a. ein bekannter Infektionszeitpunkt, der durch das erste positive HIV-1-Testergebnis belegt werden konnte.

Das positive Erstergebnis lag in allen Fällen kurz nach der Serokonversion, d.h. kurz nach dem Auftreten erster Serumantikörper. Der Zeitpunkt der Infektion lag bei allen Patienten nicht länger als 8 Monate zurück.

Der Vorteil eines solchen Patientenkollektives ist in den klar umrissenen Patientendaten von ärztlicher Seite zu sehen. So sind in der Regel neben dem Infektionszeitpunkt auch der

Infektionsweg (homo- oder heterosexuell), sowie medizinische Parameter wie Viruslast, CD4⁺-Zellzahl und Art der Therapie, bekannt. Nur dieser umfassende Patientenstatus wird eine letztendliche Beurteilung der molekular- und zellbiologisch erhaltenen Ergebnisse erlauben.

Alle Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Erstprobennahme in untherapiertem Zustand. Bei den folgenden Probennahmen kam es bei einigen, nicht bei allen, Patienten zum Therapiestart.

Ein wichtiger Zielparameter ist die Klärung der Frage, ob isolierte Antikörper (IgG's) oder deren Spaltprodukte (Fab-Fragmente) in der Lage sind, Neutralisationsreaktionen auf Makrophagen hervorzurufen. Auch soll in diesem Rahmen aufgezeigt werden, ob das Neutralisationsverhalten im Verlauf der Krankheitsprogression Veränderungen unterworfen ist. Dazu gehören Untersuchungen zur Neutralisierbarkeit von Virusisolaten durch autologe Serumproben auf unterschiedlichen Kultursystemen, wie Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten.

Nach Beantwortung der Frage nach dem autologen Neutralisationsverhalten werden weitere Versuche in Richtung Kreuzneutralisation gehen. Dies geschieht vor allem in Hinblick auf die heterologen Neutralisationsfähigkeit unterschiedlicher Subtypen auf Makrophagen. In diesem Zusammenhang soll weiterhin die Kreuzneutralisationsfähigkeit isolierter Antikörper (IgG's) auf Makrophagen dargestellt werden.

Ein weiterer Schritt zum Aufzeigen von Veränderungen, denen ein HIV-infizierter Organismus im Verlauf der Krankheitsprogression unterworfen ist, ist die Untersuchung hinsichtlich des Tropismus der Viren. Der aufgezeigte Zelltropismus der Virusisolate steht in enger Verbindung mit den virusspezifischen Möglichkeiten der Zellinfektion. Mittels humaner Gliomazelllinien, die Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche exprimieren, soll der Weg der Corezeptor induzierten Zellinfektion der einzelnen Patientenisolate aufgezeigt werden. Dabei stehen Veränderungen in Bezug auf das Spektrum der zur Infektion benutzten Zellrezeptoren von Ursprungs- und Folgeisolat im Vordergrund.

3 Material (inkl. Herstellernachweis)

Alle Reagenzien und Materialien, deren Herkunft keinerlei Einfluss auf den Ausgang der Experimente hatten, werden hier nicht gesondert aufgeführt. Weiterhin kommen Reagenzien und Geräte, die Teil mehrerer Experimente waren, nur einmal zur Erwähnung.

3.1 Material zur angewandten Methodik

3.1.1 Isolierung und Kultivierung von mononukleären Zellen aus humanem Blut

Name	Spezifizierung	Hersteller
PBS (1x)	PBS-Dulbecco ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Seromed [®] , Biochrom KG, Berlin
Ficoll	Milieu de Separation, Dichte 1.077 g/ml	Seromed [®] , Biochrom KG, Berlin
RPMI 1640	2.0 g / L NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin	Seromed [®] , Biochrom KG, Berlin
RPMI 1640	ohne L-Glutamin	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
L-Glutamin	200 mM in 0.85% NaCl Lösung	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Pen / Strep	10.000 U Penicillin / ml, 10.000 mikrogr. Streptomycin / ml	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
FCS	Fetales Kälberserum, sterilfiltriert	Boehringer Mannheim GmbH, jetzt F.Hoffmann-LaRoche Ltd., Basel, CH
AB-Serum	Human, sterilfiltriert	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
PHA	Phytohämagglutinin, Lectin 1mg / ml	Sigma Biosciences, St.Louis, MO, USA
IL2	Interleukin-2, human 10.000 U / ml	Boehringer Mannheim GmbH, jetzt F.Hoffmann-LaRoche Ltd., Basel, CH
MEM (100x)	Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco Life Technologies, Eggenstein
DMSO	Dimethylsulfoxid	Boehringer Ingelheim Bioprod., Heidelb.
Millex-GV	0.22µm Einweg-Filtereinheit	Millipore, Molsheim, France
Falcon 2070	Falcon-Blue Max TM , 50ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falcon 2096	Falcon-Blue Max TM , 15ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Geräte:

Minifuge RF	Zentrifuge (15ml / 50ml)	Heraeus Holding GmbH, Frankfurt/M.
Megafuge1.0R	Zentrifuge (15ml / 50ml)	Heraeus Holding GmbH, Frankfurt/M.
Cytoperm	Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Frankfurt/M.
BB6220 CU	Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Frankfurt/M.
Micro Flow	Biological Safety Cabinet (Sterilbank)	Nalgene Nunc International, Wiesbaden

3.1.2 Neutralisationsexperimente auf Lymphozyten

Gerät:

Compact Line OV4	Rotor	Biometra GmbH, Göttingen
------------------	-------	--------------------------

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

KOVA [®]	Zählkammer	Hycor Biomedical Inc., CA, USA
Trypan Blue	0.4% Lösung in 0.85% Kochsalzlg	Flow Laboratories Inc., VA, USA

Gerät:

Leica DMIL	Mikroskop mit Fotoaufsatz Leica MPS30	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar
------------	--	--

3.1.4 Herstellung von Teflonbeuteln

Teflon FEP	Teflonbeschichteter FEP-Film	Du Pont, Wilmington, DE, USA
Indox [™]	Ethylene Oxide Indicator Tape	Medical-Surgical Divis., MN, USA

Gerät:

Polystar 350 DSM	Schweißgerät	Rische + Herfurth GmbH, Hamburg
------------------	--------------	---------------------------------

3.1.5 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

p24-ELISA:

p24-ELISA	Coulter [®] HIV-1 p24 Antigen Assay	Immunotech S.A., Marseille Cedex, France
-----------	--	--

V3-Peptid-ELISA:

Magermilchpulver	für die Mikrobiologie	Merck KGaA, Darmstadt
PBS (10x)	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	PAA Laboratories GmbH, Linz, Aust.
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
PCB	Phosphat-Citrat gepufferte Tabletten	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Antikörper	Ziegen Antihuman IgG (H+L) Konjug.	BioRad Laboratories GmbH, München
OPD	o-Phenylenediamin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid 30 % (w/v) Lsg.	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Immulon-Plates	96well Mikrotiterplatten	Dynatech Laboratories Inc., Virginia
Phosphate-citrate-l tablets		Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Geräte:

LP35	Mikrotiterplatten Washer	Pasteur Diagnostics, Freiburg
B 6030	Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Frankfurt/M.
IKAMAG RCT	Rührer	Janke & Kunkel GmbH, Staufen i.Br.
Waage	Sartorius excellence	Waagen-Kissling GmbH, Rimbach
Feinwaage	Sartorius research R160P	Waagen-Kissling GmbH, Rimbach
761 Calimatic	pH-Meter	Knick Meßgeräte GmbH, Berlin
Reader	Mikroplatten Spektrophotometer Syst.	MWG AG Biotech, Ebersberg
Analyse-Progr.	SOFTmax [®] PRO	MWG AG Biotech, Ebersberg
Reax 2000	Vortex	Heidolph Elektro GmbH, Kelheim

3.1.6 RT-Test

Reaktionsgefäße, 1ml	Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Instruments Inc., USA
[³ H]-TTP-Lösung	[³ H-Methyl]-Thymidin-5'-triphosphat	Amersham, Braunschweig
rAdTprimerTemplate	(Poly A (dT) ₁₂) Natriumsalz	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Whatmanpapier	Ionenaustauschpapier DE 81	Herolab, St.Leon-Roth
Mini Poly-Q Vial	6 ml Szintillationsgefäße	Beckman Instruments Inc., USA
Rotiszint eco plus	Gebrauchsfertiger Szintillationscockt.	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt

Geräte:

Ultrazentrifuge	TL 100	Beckman Instruments Inc., USA
TLA 100.2 SN	Festwinkelrotor für UZ	Beckman Instruments Inc., USA
β-Counter LS 1800	β-Counter	Beckman Instruments Inc., USA

3.1.7 Nukleinsäure-Extraktion

QIAamp[®] Blood Kit

Qiagen GmbH, Hilden

Gerät:

Gene Quant[®] II RNA / DNA Kalkulator

Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.8 Polymerasekettenreaktion

Reaktionsgefäße MicroAmp[®] Reaktionsgefäße mit Kappe

Perkin Elmer Applied Biosystems, CA, USA

Pipettenspitzen ART 200, ART 20P, steril

M&P, San Diego, CA, USA

H₂O Aqua ad iniecatabilia

B.Braun Melsungen AG, Melsungen

AmpliTa[®] Taq DNA Polymerase

Perkin Elmer Applied Biosystems, CA, USA

GeneAmp[®] 10x PCR Puffer

Perkin Elmer Applied Biosystems, CA, USA

dNTP's Ultrareines dNTP Set, je 100 mM

Pharmacia Biotech, Freiburg

Geräte:

Gene Amp[®] PCR System 2400 Thermocycler
Quick Screening Horizontal Gel Elektrophorese
Transformator für die Elektrophorese
Microcomputer Electrophoresis power supply
Transilluminator UVP
Mitsubishi Video Copy Processor

Perkin Elmer Applied Biosystems, CA, USA
Internat. Biotech. Inc., New Haven, USA
Renner GmbH, Darmstadt
Fröbel Laborgeräte, Lindau
Herolab Molekulare Trenntechnik, Wiesloch
Herolab Molekulare Trenntechnik, Wiesloch

3.1.9 Antikörperisolierung

Mab Trap[®] GII-Kit IgG-Gewinnung aus hum. Serum

Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.10 Papainschnitt

Papain aus Papaya Latex, 10 mg/ml

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

L-Cystein Cystein Hydrochlorid

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Iodoacetamid

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

EDTA Ethylendiamintetraacetat

Merck KGaA, Darmstadt

3.1.11 Proteinbestimmung

BioRad® Protein Assay

BioRad Laboratories GmbH, München

3.1.12 SDS-PAGE

PAA (37.5:1)	30% Acrylamid / 0.8% Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Merck KGaA, Darmstadt
APS	Ammoniumpersulfat	Merck KGaA, Darmstadt
SDS	Sodiumdodecylsulfat	Merck KGaA, Darmstadt

Gerät:

Gelsystem	Casting Clamps, Glasplatten 8 x 10cm	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
-----------	--------------------------------------	-------------------------------

3.1.13 PAA-Gelfärbung

Coomassie-Blue

Merck KGaA, Darmstadt

BioRad® Silver-Stain-Assay

BioRad Laboratories GmbH, München

3.1.14 Immunhistochemie

ABC®-Kit (PK-6100)	Vectastain Elite ABC-Peroxidase-Kit	Linaris GmbH, Bettingen
AEC® (SK-4200)	Substrat Kit für Peroxidase	Linaris GmbH, Bettingen
4% Paraformaldehyd		Fluka, Buchs, CH
Kaisers	für Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt
Glyceringelatine		
Primär-AK	Monoklon. Maus Anti HIV-1 p24-Ak	ScheBo-Tech GmbH, Giessen
Positiv Kontrolle	Beta-2-Mikroglobulin	Dianova-Immunotech GmbH, Hamburg
Negativ Kontrolle	Monoklonaler IgG-Ak	Dianova-Immunotech GmbH, Hamburg

3.1.15 Kultivierung von adherenten Zellen

slideflask 9 CM Plastikobjektträger

Nalgene Nunc International, Wiesbaden

3.1.16 Desinfektionsmittel

Helipur®H plus N
Biguanid Fläche
Mikrocid liquid

B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Dr.Schumacher GmbH, Melsungen
Schülke + Mayr GmbH, Norderstedt

3.2 Kulturmedien

3.2.1 PBL-Medium

RPMI 1640 (Biowhittaker)	500ml	+	10 ml	L-Glutamin (Konz. 200mM)
			5 ml	Penicillin / Streptomycin (Konz.10.000U/ml)
			75 ml	FCS (Endkonz. ca. 15%)

PHA-Stimulation: PHA in 5 ml PBS lösen (Konz. 1mg/ml)
Einsatzkonzentration: 7.5µg/ml

3.2.2 Monozyten / Makrophagen - Medium

RPMI 1640 (Seromed)	500ml	+	10ml	L-Glutamin (Konz. 200mM)
			5ml	Penicillin / Streptomycin (Konz. 10.000U/ml)
			20ml	AB-Serum (sterilfiltriert)
			12ml	Vitaminmix

Inhaltsangaben für Vitaminmix des Makrophagenmediums (Angaben als Endkonzentrationen)

1mM Na-Pyruvat (stock: 10mM / Life Technologies)
1 x MEM Nicht-essentielle Aminosäuren (stock: 100 x / Life Technologies)
0.4 x MEM Vitamine (stock: 100 x / Life Technologies)

3.2.3 U87-Medium (Endvolumen: 520 ml)

DMEM	450ml	+	10ml	L-Glutamin (Konz. 200mM)
			5ml	Penicillin / Streptomycin (Konz. 10.000U/ml)
			50ml	FCS (Endkonz. ca. 10%)
			5ml	MEM (100x) Nicht-essentielle Aminosäuren

Selektion: Gentamycin (G418) Selektionskonzentration: 300µg/ml
Puromycin Selektionskonzentration: 0.5µg/ml

3.2.4 MT2-Medium

RPMI 1640 450ml + 50ml FCS (Endkonz. 10%)
(Biowhittaker)

3.2.5 Freeze-Medium

DMSO 5%
FCS 50%
PBL-Medium 45%

3.2.6 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 ohne Glutamin (käuflich)

<i>Inhaltsstoff</i>	<i>Molekulargewicht</i>	<i>Konzentration (mg/L)</i>	<i>Molarität (mM)</i>
Kaliumchlorid	75	400.0	5.30
Magnesiumsulfat	120	48.84	0.407
Natriumchlorid	58	5300.0	91.38
Natriumbicarbonat	84	2000.0	23.800
Natriumphosphat	268	1512.0	5.63

Weiterhin: Glucose, HEPES, Aminosäuren und Vitamine.

Die genaue Zusammensetzung ist nachzulesen bei: Moore et al. 1967; Mossinger J., 1991

3.2.7 DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium) käuflich

<i>Inhaltsstoff</i>	<i>Molekulargewicht</i>	<i>Konzentration (mg/L)</i>	<i>Molarität (mM)</i>
Kalziumchlorid	111	200.0	1.80
Eisennitrat	404	0.10	0.000248
Kaliumchlorid	75	400.0	5.30
Magnesiumsulfat	120	97.67	0.813
Natriumchlorid	58	6400.0	110.34
Natriumbicarbonat	84	3700.0	44.10
Natriumphosphat	138	125.0	0.906

Weiterhin: Glucose, Aminosäuren und Vitamine.

Die genaue Zusammensetzung ist nachzulesen bei: Dulbecco R. and Freeman G., 1959

3.3 Polyacrylamidgele

3.3.1 SDS-PAGE

<u>Trenngel (12%)</u>		448µl	H ₂ O
	+	2.5ml	Tris-HCl (0.75M/pH 8.3)
	+	25µl	SDS (20%)
	+	2ml	PAA (30%; 1 : 37.5)
	+	25µl	APS (10%)
	+	4µl	TEMED
		1050µl	H ₂ O

<u>Sammelgel (4%)</u>			
	+	1.1ml	Tris-HCl (0.625M/pH 6.8)
	+	15µl	SDS (20%)
	+	800µl	PAA (30%; 1 : 37.5)
	+	30µl	APS (10%)
	+	6µl	TEMED

3.4 Puffer

3.4.1 Coulter[®] p24 Antigen ELISA (Herstellerangaben)

Lyse-Puffer	Triton 100 x, EDTA, TWEEN 20
TMB	Citrat-Phosphat-Puffer, 0.0045%; H ₂ O ₂ , 0.1%; 2-Chloroacetamid, 0.1%
SA-HRPO	an Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Streptavidin; Gentamicin, 0.01%; Thimerosal, 0.1%
SA-Puffer	Tris-Puffer
CSR-1	Schwefelsäure 4 N

3.4.2 QIAamp[®] Blood Kit (Herstellerangaben zu den Inhaltsstoffen fehlen)

AL-Puffer	Lyse-Puffer
AW-Puffer	Wasch-Puffer
AE-Puffer	Elutionspuffer

3.4.3 RT-Test

TSAM-Puffer	Tris-HCl, 10mM, pH 7.3; Magnesiumchlorid, 5mM; Saccharose, 250mM
Lysis-Puffer	Tris-HCl, 10mM, pH 7.3; Triton-X-100, 2%; EDTA, 1mM; DTT, 5mM; Kaliumchlorid, 60mM
Stopp-Puffer	Lauroylsarkosin-Lösung, 10%
Na ₂ HPO ₄ -Puffer	Natriumhydrogenphosphat, 0.35M
BM II-Puffer	Tris-HCl, 0.5M; Kaliumchlorid 0.8M

<u>rAdt / ³H-TTP-Mix:</u>	6.6µl rAdT	+	6.6µl	BM II-Puffer
(für 1 RT-Ansatz):		+	3.3µl	1.4-Dithiothreitol, 0.02M
		+	3.3µl	Magnesiumchlorid, 0.1M
		+	11µl	ddH ₂ O
		+	2.2µl	³ H-TTP (siehe 3.1.6)

3.4.4 V3-Peptid-ELISA

10 x PBS-Puffer (pH 7.4):	0.1M Na ₂ HPO ₄ , 0.018M KH ₂ PO ₄ , 0.027M KCl, 1.4M NaCl, aqua bidest
Wasch-Puffer:	0.01M 1 x PBS, 0.1% Tween 20
Coat-Puffer (Natriumcarb.-Puffer / pH 9.8):	0.015M Na ₂ CO ₃ , 0.035M NaHCO ₃
Block-Verdünnungspuffer:	1 x PBS (pH 7.4), 0.1% Tween 20, 3% Milchpulver (siehe 3.1.5)
→ Puffer mindestens 2 h vor Gebrauch herstellen, um eine vollständige Lösung des Milchpulvers zu gewährleisten.	
Phosphat-Citrat-Puffer:	0.05M Phosphate-citrate-buffer tablets (siehe 3.1.5)
Substratlösung:	30 - 40ml Phosphat-Citrat-Puffer + 30µl H ₂ O ₂ + 1 Tablette OPD
→ Im Dunkeln auflösen.	
Stoplösung:	1 N H ₂ SO ₄

3.4.5 Laufpuffer für Agarosegele:

<u>50 x TAE:</u>	242g	Tris-HCl	
	+	57.1ml	Eisessig
	+	100ml	EDTA (0.5M/pH8.0)

- auf 1 Liter mit dH₂O auffüllen [Laufpufferkonzentration ist 1x (Verdünnung mit dH₂O)]

3.4.6 SDS-PAGE

<u>Laufpuffer (10x):</u>		30.3g	Tris-HCl
	+	188g	Glycin
	+	10g	SDS

- auf 1 Liter mit dH₂O auffüllen
- pH mit HCl auf 8.3 einstellen

SDS Gel loading buffer (2x) Tris-HCl (100mM / pH6.8), DTT(200mM), SDS (4%),
Bromphenolblau (0.2 %), Glycerol (20 %)

4 Methoden

4.1 Schwerpunkt Zellbiologie

4.1.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus humanem Blut

Die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) aus peripherem, humanem Blut wurden mit Hilfe einer Dichtezentrifugation (Ficoll Hypaque-Methode, Boyum, 1986) isoliert. Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von mononukleären Zellen dienten hierbei Leukozytenpräparationen (*buffy coat*) einer beliebigen Blutspende.

Zentrifugiert man Vollblut 10min bei 3300rpm, so erhält man drei verschiedene Fraktionen.

Die obere klare Fraktion stellt das Plasma dar, die mittlere Schicht ist der *buffy coat* und am Boden befinden sich die konzentrierten Erythrozyten. Es wird somit ein großer Teil der Erythrozyten abgetrennt, während die Leukozyten angereichert werden.

Zur Gewinnung der peripheren, mononukleären Blutzellen (*Pbmc*) wurden 25ml des *buffy coat*'s 1:2 mit PBS auf ein Volumen von 50ml verdünnt. Von dieser Leukozyten-PBS-Verdünnung wurden daraufhin jeweils 25ml vorsichtig auf vorbereitete sterile, mit 25ml Lymphozyten-Trennmedium (Ficoll) gefüllte Falconröhrchen überführt. Ficoll ist ein Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Dabei war zu beachten, daß die beiden Phasen getrennt blieben. Der Ficoll-Gradient wurde nun bei 2000rpm, 30min in einem Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert. Nach erfolgter Dichtegradienten-Zentrifugation sind vier Phasen erkennbar. Die oberste gelbliche Phase stellt eine Plasma- und Thrombozytenschicht dar. Sie wird gefolgt von einer schmalen, weißlichen Bande mit mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten). Im unteren Bereich befindet sich eine farblose visköse Bande aus Ficoll-Trennmedium. Die letzte Phase wird von einer roten Schicht aus sedimentierten Erythrozyten und Granulozyten gebildet. Die Bande mit den mononukleären Zellen wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und in ein neues, steriles Röhrchen überführt.

Die so isolierten Zellen wurden daraufhin mit PBS auf ein Volumen von 50ml verdünnt und bei 1500rpm, 10min zentrifugiert. Das daraus resultierende Zellpellet wurde erneut in PBS resuspendiert und bei gleicher Umdrehungszahl abzentrifugiert. Das so gewaschene Pellet wurde daraufhin in genau 50ml PBS gelöst, um die Zellzahl bestimmen zu können (Abschnitt 4.1.4).

Sie variierte stark von Spender zu Spender, lag aber in der Regel zwischen 1×10^8 und 7×10^8 Zellen pro Leukozyten-Präparation. Zum Schluss wurden die Zellen je nach Verwendung in entsprechendes Medium aufgenommen (Materialteil 3.2).

Die Ficoll Hypaque-Methode erlaubt es, mononukleäre Zellen (MNC) aus peripherem Blut zu isolieren. Das Übergewicht tragen dabei mit 90% die Lymphozyten (T- und B-Lymphozyten). Den Rest bilden die Monozyten (10%). Welche der Zellen letztendlich aktiviert werden bzw. wessen Wachstum und Differenzierung gefördert wird, wird durch die Wahl des Mediums bestimmt. Die Stimulierung mit Phytohämagglutinin (PHA) und Interleukin 2 (IL-2) im Lymphozyten-Medium wirkt selektiv auf die T-Lymphozyten, d.h. vor allem diese werden zur Teilung angeregt. Bei dem Makrophagen-Medium hingegen ist die Zugabe von humanem Serum (AB-Serum) von entscheidender Bedeutung für die terminale Differenzierung der Blutmonozyten zu Makrophagen.

4.1.2 Kultivierung und Aktivierung von humanen, peripheren Lymphozyten

Die Proliferation und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten erfolgt nur nach Stimulation durch ein Antigen. Die Lymphozyten gehen dann aus der Ruhephase (G_0) in die Wachstumsphase (G_1) über. Daraufhin wird die DNA-Synthese eingeleitet, worauf es zur Zellteilung kommt (Alberts, B. 1986).

Unstimulierte Lymphozyten sterben *in vitro* innerhalb weniger Tage ab. Möchte man Lymphozyten über einen kurzen Zeitraum in Kultur halten, müssen sie mit Mitogenen zur Proliferation angeregt werden. Dies geschieht mit Phytohämagglutinin (PHA, Lectin), einem spezifischen T-Zell-Mitogen, das für 2-3 Tage der Lymphozytenkultur zugegeben wird.

Die mit PHA stimulierten T-Zellen setzen einen Wachstumsfaktor frei, den Morgan und Ruscetti 1976 als *T cell growth factor* (TCGF) bezeichneten. Er ist heute unter dem Namen IL-2 bekannt.

Werden T-Lymphozyten *in vitro* in Kultur gehalten, so werden sie durch Zugabe von PHA zum Medium aktiviert, woraufhin sie IL-2 abgeben und den IL-2-Rezeptor exprimieren. Nach Bindung des IL-2 an seinen Rezeptor werden die Zellen selektiv zur Teilung angeregt (Morgan et al., 1976 / Gallo RC, 1987).

Die gesamten Pbmcs eines *buffy coats* (Abschnitt 4.1.1) wurden in 100ml Lymphozyten-Medium (Materialteil 3. 2. 1) aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Zur Stimulierung der Zellen wurde dem Lymphozyten-Medium PHA in einer Konzentration von 7.5µg pro Milliliter Medium zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 80-90% Luftfeuchtigkeit und 7% CO₂. Nach 2-3 Tagen zeigt sich eine zunehmende Koloniebildung, während die Zahl der Einzelzellen abnimmt. Am 3. Tag wurden die gesamten Zellen einer Kulturflasche bei 1200rpm, 10min zentrifugiert und das Zellpellet in 50ml PBS resuspendiert.

Zum Schluss wurden die Zellen gezählt und die Zelldichte für die anschließenden Versuche eingestellt, indem die erforderliche Zellzahl in entsprechender Menge an Lymphozyten-Medium aufgenommen wurde. Um die Lymphozyten weiterhin zu stimulieren, wurde dem Medium zusätzlich IL-2 (20 U/ml Medium) zugegeben.

Werden *in vitro* periphere Lymphozyten von gesunden Spendern mit HIV infiziert, so zeigen diese eine erhöhte Virusproduktion nach Aktivierung der Lymphozyten mit PHA (Zagury et. al., 1986). Die Tatsache, dass die Virusproduktion in engem Zusammenhang mit der Teilungsrate der Zielzellen steht, spielt eine entscheidende Rolle bei der Interpretation der Neutralisationsversuche.

4.1.3 Kultivierung und Ausdifferenzierung humaner Monozyten / Makrophagen

Nach Isolierung der mononukleären Zellen aus humanem Blut (*buffy coat* / Abschnitt 4.1.1) wurden diese auf eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen / ml Medium (Materialteil 3.2.2) eingestellt und jeweils 200µl davon in eine Vertiefung (*well*) einer Mikrotiterplatte gegeben (Zellkonzentration: 1×10^6 Zellen/*well*). Monozyten sind, im Gegensatz zu Lymphozyten, in der Lage, an Plastikoberflächen zu adherieren. Die Mikrotiterplatten mit den mononukleären Zellen wurden 45min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um den Makrophagen die Möglichkeit zu geben, an der Plastikoberfläche der Mikrotiterplatte zu adherieren. Anschließend wurden die nicht-adherenten Zellen durch mehrmaliges Waschen mit Monozyten/Makrophagen-Medium (Materialteil 3.2.2) entfernt. Die so erhaltenen Kulturen bestehen zu ca. 95% aus Monozyten, den Rest bilden einige Lymphozyten, die sich durch Waschen nicht entfernen lassen (von Briesen et. al., 1990a). Abschließend wurden die Vertiefungen mit jeweils 200µl Mo/Mak-Medium befüllt. Die Platten kamen zur Ausreifung der Monozyten zu Makrophagen für 6-7 Tage in einen Inkubator (37°C, 80-90% Luftfeuchtigkeit, 7% CO₂). Mit einer Zunahme der Zellzahl durch Proliferation war nicht zu rechnen, da Blutmonozyten ihre Teilungsfähigkeit verlieren.

In vivo bedeutet Adhärenz, für Monozyten/Makrophagen ein wichtiges regulatorisches Signal zur Induktion der Transkription unterschiedlicher Gene. Dazu zählen die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β sowie die Protoonkogene *c-fms* (M-CSF Rezeptor) und *c-fos*. Ein zweites Signal (LPS) ist jedoch notwendig, um die Sekretion dieser Mediatoren einzuleiten. Adhärenz ist somit die Basis der Mo/Mak, auf die ihre proinflammatorische Antwort aufbaut und deren Stärke mit der Art des zweiten Signals eng in Zusammenhang steht (Haskill et al., 1988).

4.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl in Suspensionskulturen (*pbmc*) wurde mit Hilfe einer KOVA-Kammer (Hycor Biomedical inc.) bestimmt. Dazu wurde eine Probe der Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt und ein Aliquot davon durch Kapillarkräfte in die Kova-Kammer transferiert. Trypanblau ist ein Lebendfarbstoff, der von lebenden Zellen aktiv aus der Zelle ausgeschleust wird. Diese Zellen erscheinen lichtmikroskopisch farblos. Tote Zellen hingegen sind zu diesem aktiven Transport nicht mehr in der Lage. Sie zeigen eine blaue Färbung unter dem Mikroskop. Mit dieser Methode wird somit der Gehalt an lebenden Zellen in einer Suspension ermittelt.

Die Kova-Kammer besteht aus 9 Gruppenquadraten mit jeweils 9 Kleinstquadraten. Es wurden zwei mal die Zellen in 10 Kleinstquadraten gezählt (2 x 10 Kästchen) und ihr Wert gemittelt. Dies war von Bedeutung, da die Verteilung der Zellen im Gesamtfeld nicht immer homogen war.

Der Multiplikationsfaktor von 90 (von der Firma Hycor vorgegeben) bezieht sich dabei auf das Gesamtkammervolumen von 0,9 μ l (Volumen von 81 Kleinstquadraten). Die Zellzahl (N) berechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{Zellzahl (N)}}{10 \text{ Kleinstquadrate}} \times 90 \text{ (Multiplikationsfaktor)} \times 10 \text{ (Verdünnung)} = \text{Zellzahl /}\mu\text{l}$$

Wird die ermittelte Zellzahl mit 1000 multipliziert, so erhält man den Lebendzellzahl-titer bezogen auf einen Milliliter.

4.1.5 Aufarbeitung HIV-1 infizierter Blutproben

Da es sich bei HIV um ein infektiöses Agens handelt, wurden alle Arbeiten mit virushaltigem Material bzw. infizierten Zellen entsprechend den Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit humanpathogenen Viren in einem speziellen Hochsicherheitslabor (Sicherheitsstufe L3) durchgeführt.

Zuerst wurde das EDTA-Blut aus den unterschiedlichen Röhrchen mit einer Pipette in ein 50ml Falconröhrchen überführt. Das Blut wurde daraufhin bei 1400rpm, 10min zentrifugiert. Das Plasma (Überstand) wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut bei 1400rpm, 10min zentrifugiert, um verbleibende Zellreste zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde das, weitgehend zellfreie, Plasma aliquotiert und bei -80°C gelagert. Mit dem Patientenserum wurde entsprechend verfahren. Ein mit 25ml Ficoll (Materialteil 3.1.1) gefülltes Zentrifugenröhrchen wurde mit 25ml des, zuvor 1:2 mit PBS, verdünnten EDTA-Blutes überschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 2000rpm, 25min, ohne Bremse.

Der Leukozytenring (Volumen: 10-20ml) wurde nach der Zentrifugation abgezogen und in ein neues Röhrchen überführt, 1:1 mit PBS verdünnt und bei 1400rpm, 10min zentrifugiert (Waschschritt). Daraufhin wurde das Zellpellet in 10ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (Kova-Kammer / Abschnitt 4.1.4.).

Für eine folgende DNA-Präparation (Abschnitt 4.3.1) wurden 6×10^6 bis 1×10^7 der mononukleären Zellen in 220µl PBS, bei -80°C gelagert. Der Rest der Zellen wurde in jeweils 1ml Freezemedium (Materialteil 3.2.5) weggefroren. Die Dichte der Freezealiquots belief sich dabei auf $2 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^6$ Zellen / ml.

4.1.6 Herstellung von Teflonbeuteln

Zur Kultivierung von MNC bzw. bei Virusanzuchten wurde die Methode des Teflonsacksystems gewählt. Teflonsäcke stellen ein nahezu ideales Kultursystem dar (von Briesen et al., 1990a). Der Beutel besteht aus einer Folie, die einseitig hydrophobe Eigenschaften aufweist. Diese Seite wird bei der Herstellung nach innen gebracht, um bei Kulturrende die adherenten Zellen besser von der Folie lösen zu können. Da der Teflonbeutel gasdurchlässig (CO₂) ist, bietet er für die Zellen ideale Kulturbedingungen.

Gerade für die Anzucht von humanpathogenen Viren ist es von Vorteil, ein einerseits abgeschlossenes System zu besitzen, das andererseits zum Gasaustausch befähigt ist und somit für die Zellen optimale Bedingungen gewährleistet.

Die Teflonbeutel wurden aus einer spezialbeschichteten Folie der Firma Du Pont hergestellt. Dabei wurde die Folie in entsprechend große Stücke geschnitten und so gefaltet, dass die hydrophobe Seite nach innen zeigt. Daraufhin wurden die Seiten mit einem Schweißgerät verschweißt. An der verbleibenden Stirnseite wurde zum Schluss ein Röhrchen (beliebiges 1 ml Plastikröhrchen mit Drehverschluss), dessen Boden abgeschnitten worden war (eigene Herstellung) mit einem Gummiring befestigt. Damit Sterilität gewährleistet werden konnte, wurden die fertiggestellten Teflonsäcke mit Ethylenoxid bei 40°C für 45min gassterilisiert (Firma Hoechst AG). Vor Verwendung mussten die frisch sterilisierten Säcke noch für ein paar Tage lüften, da Ethylenoxid auch für eukaryontische Zellen toxisch ist.

4.1.7 Zellinfektion mit HIV in einem *in vitro*-System

Herstellung eines HI-Virusstocks im Teflonsack:

Bei der Anzucht von Patientenviren wurden die Viren in MNC-Kulturen (Mischkulturen) von gesunden Spendern im Teflonsack vermehrt. Die Anzucht im Mischkultursystem vermindert den Selektionsdruck und gewährleistet deshalb über einen längeren Zeitraum eine größere Virusvielfalt. Makrophagotrope und lymphozytotrope Virusvarianten können in diesem Kultursystem gleichermaßen vermehrt werden, was für spätere Neutralisationsexperimente essentiell ist.

Es wurden zunächst 10ml isolierte MNC eines gesunden Spenders (*buffy coat* Abschnitt 4.1.1) in einen Teflonsack mit dem Fassungsvermögen von 15ml gegeben. Dabei spielt die Spenderzellzahl eine untergeordnete Rolle. Auf den Zellen eines "guten" Buffys werden sich die Viren immer besser vermehren, als auf jenen eines "schlechten". Dieses Phänomen und die Definition von "gut" und "schlecht" wird ausführlich in der Diskussion besprochen. Daraufhin wurden 1ml Zellen (in *Freeze-Medium*; Materialteil 3.2.5) eines HIV-Patienten aufgetaut, in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 20min, bei 100.000rpm ultrazentrifugiert.

Das Pellet wurde in 1ml Mo/Mak-Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift musste der eigentlichen Infektion vorangestellt werden, da der Bestandteil DMSO im Freeze-Medium auf die Zellen toxisch wirkt. Das gelöste Virus wurde nun in den Teflonsack überführt. Da es sich bei den Viren um primäre Viren handelte, betrug die Infektionsdauer mindestens 20 Tage. Dieser Zeitraum variierte allerdings von Isolat zu Isolat stark und konnte bei Subtyp E-Isolaten bis zu 70 Tagen betragen. Die erste Kontrolle der Virusproduktion fand bereits nach 7-10 Tagen statt.

Sie bestand aus einem p24-Ag-Test des Kulturüberstandes (Abschnitt 4.1.8.1). Mit Hilfe des Testsystems der Firma Coulter lässt sich die Produktion von viralem Protein und somit die erfolgte Infektion erfassen.

Der Test musste in kurzen Abständen wiederholt werden, um zu sehen, ob auch tatsächlich eine Steigerung der Virusproduktion stattgefunden hat. War dies der Fall, wurde ein RT-Test (Abschnitt 4.1.8.2) angeschlossen. Da die Anzucht über einen größeren Zeitraum erfolgte, wurden im Abstand einiger Tage neue MNC gesunder Spender dem Kultursystem zugeführt und ein geringeres Volumen aus dem Teflonsack entfernt. Somit wurden stets frische Zellen in das System eingebracht und toxische Stoffwechselprodukte entfernt. Daraus resultierte eine Volumenzunahme, woraufhin auf einen größeren Teflonsack ausgewichen werden musste. Diese Volumenzunahme war beabsichtigt, da für die folgenden Versuche zum Teil erhebliche Mengen an Virus benötigt wurden.

Hatte der RT-Wert eine Höhe von mindestens 120.000-150.000cpm/ml/90min⁻¹ erreicht, wurden die Zellen bei 2000rpm, 10min zentrifugiert. Der Virusüberstand wurde dann zu 1ml Aliquots in Kryoröhrchen bei -80°C gelagert.

Das Virus wurde zu Beginn der maximalen Virusproduktion geerntet, da die Reverse Transkriptase-Aktivität in den Kulturen über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt, aber die Fähigkeit des Virus neue Kulturen zu infizieren, bei einer späteren Ernte abnimmt (Wild, 1991). Außerdem lassen weder p24-Wert noch RT-Wert eine Aussage über die Infektiosität des Virus zu, da auch defekte Viren und Viruspartikel miterfaßt werden. Um die Infektiosität der Viruskultur zu ermitteln, wurde eine TCID₅₀-Bestimmung (Abschnitt 4.1.10) angeschlossen.

4.1.8 Virusnachweisverfahren

4.1.8.1 Bestimmung von viralem p24-Antigen

Das Maß der Virusproduktion in einer infizierten Kultur kann durch Bestimmung des Gehaltes an viralem Kernprotein p24 und/oder der Messung der Reversen Transkriptase-Aktivität ermittelt werden (Abschnitt 4.1.8.2).

p24-ELISA (*Enzym Linked Immunosorbent Assay*)

Der Nachweis, ob die Infektion einer Kultur erfolgreich verlaufen ist, kann mittels eines HIV-Antigen ELISA erbracht werden. Zu diesem Zweck wurde der kumulative Gehalt an viralem Antigen im Überstand gemessen, d.h., es wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten Überstand entnommen und als Probe im HIV-Antigen ELISA eingesetzt.

Mit Hilfe des ELISA´s konnte nicht nur eine Ja-Nein-Aussage über eine erfolgte Infektion getroffen werden, sondern auch ein relatives Maß der Virusproduktion durch parallele Benutzung eines Standards dargestellt werden.

Es wurde ein kommerziell erhältlicher Testkit der Firma Coulter (Materialteil 3.1.5) verwendet. Im folgenden sei das Prinzip des Testes kurz erläutert.

Bei dem Coulter HIV-1 p24-Antigen Assay handelt es sich um einen qualitativen und quantitativen *in vitro* Enzym Immunoassay. Die Basis bildet ein an eine Mikrotiterplatte (96-Kavitäten-Platte) gebundener monoklonaler Antikörper gegen das HIV-1 p24-Antigen. Die Inaktivierung des Zellüberstandes erfolgte durch Zugabe von Lysispuffer im Verhältnis 1:10.

Das Testvolumen war immer 200µl/well. Allerdings wurden die Kulturüberstände, um eine Messung wiederholen zu können, häufig 1:2 mit PBS verdünnt (100µl PBS + 100µl Kulturüberstand + 20µl Lysispuffer). Bei der Auswertung der Meßergebnisse wurden die Verdünnungsfaktoren dann berücksichtigt.

Bei der folgenden Inkubation von 1h bei 37°C ist das eventuell in der Probe vorhandene HIV-Antigen in der Lage, eine Verbindung mit den monoklonalen Antikörpern auf der Platte einzugehen.

Nach 5 maligem Waschen (mit 1 x Waschpuffer) folgt eine Inkubation von 200µl/well mit einem zweiten biotinylierten, humanen Anti-HIV-1-Antikörper (IgG/CH-Biotinreagenz-lösung). Dieser kann während der Inkubation von 1h bei 37°C an den Komplex binden, der sich zwischen dem HIV-1 p24-Antigen der positiven Probe und dem an die Platte gekoppelten Anti-HIV-1-Antikörper gebildet hat. Nach einem weiteren Waschschrift (5 x) kommt es zur Zugabe von 200µl/well an Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Streptavidin (SA-HRPO). Das Konjugat kann nun einen Komplex mit dem biotinylierten Antikörper ausbilden. Durch erneutes Waschen (5 x) wird nichtgebundenes Konjugat entfernt. Bei der folgenden Inkubation von 30min bei Raumtemperatur mit 200µl/well eines chromogenen Substrats, das Tetramethylbenzidin (TMB) und Hydrogenperoxid enthält, reagiert dieses mit der Meerrettich-Peroxidase und wird zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50µl/well 4N Schwefelsäure (CSR-1-Stopreagenz) gestoppt, wobei ein Farbumschlag nach gelb erfolgt. Die Farbentwicklung ist ein Maß für die Menge an Peroxidase bzw. für die Menge an HIV-Antigen.

Parallel zu den Proben wurde noch der im Testkit mitgelieferte quantitative Kalibrierungsstandard getestet. Der Standard besteht aus einem gereinigten HIV-p24-Antigen, das aus einer humanen T-Zelllinie, die mit HTLV-IIIIB infiziert wurde, gewonnen wird. Mit Hilfe des Standards besteht die Möglichkeit, eine Standardkurve zu erstellen und durch lineare Regression die Probenwerte so in Relation zum Standard zu setzen, dass eine quantitative Auswertung bzw. die Menge an p24-Antigen in der Probe angegeben werden kann.

Da das Standardreagenz in PBS gelöst wurde, wurden als Negativkontrolle mehrere mit PBS gefüllte Kavitäten benutzt. Der Mittelwert der Negativkontrollen bildete den sogenannten *cutoff*. Alle Werte, die darüber lagen, wurden als positiv gewertet.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Dual-Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 450nm (L1). Die Referenzwellenlänge wurde auf 620nm (L2) festgelegt. Die Extinktion wurde dann als L1-L2 angegeben. Der Meßbereich des Testsystems liegt bei einer maximalen Extinktion von 1.5-2.0. Diese Werte liegen noch im linearen Bereich der Standardkurve. Alle Werte darüber befinden sich im Sättigungsbereich der Standardkurve und lassen sich nicht mehr korrekt auswerten. Sie liegen im sogenannten *overflow*. Proben, die eine höhere Konzentration an p24-Antigen enthielten, wurden verdünnt getestet und der Verdünnungs-faktor in die Berechnung mit einbezogen.

4.1.8.2 Bestimmung der Reversen Transkriptase-Aktivität

Bei der von Howard Temin und David Baltimore 1970 unabhängig voneinander entdeckten Reversen Transkriptase handelt es sich um eine für Retroviren charakteristische, RNA-abhängige DNA-Polymerase (Baltimore, 1970; Temin, 1970). Sie ist in der Lage, genau wie die zelluläre DNA-Polymerase I (Pol I), DNA in 5'-3' Richtung zu synthetisieren. Im Gegensatz zu Pol I verwendet das Enzym jedoch RNA als Matrize. Als Primer für die Initiation der Minusstrang DNA-Synthese benutzt die Reverse Transkriptase ein t-RNA Molekül der Wirtszelle. An dieses Molekül kann dann die RNA des HI-Virus binden.

Diese Bindung erfolgt mit Hilfe der *t-RNA primer binding site*, einer Sequenz, die komplementär zu 18 Basen der t-RNA^{lys} ist und auf die LTR-Region am 5'Ende des Virusgenoms folgt. Es liegt ein kurzer RNA/RNA-Komplex vor, an den die Reverse Transkriptase binden kann. Von dort aus wird daraufhin mit Hilfe von zellulären Nukleotiden ein RNA/DNA-Hybrid-Strang synthetisiert.

Durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Reversen Transkriptase im Überstand einer Zellkultur, lässt sich auf eine Infektion mit Retroviren schließen.

Prinzip des Reversen Transkriptase Tests:

Die Reverse Transkriptase der im Zellkulturüberstand vorhandenen Viren, wird nach erfolgter Anreicherung durch Ultrazentrifugation und folgender Zugabe eines Detergenz (Triton X-100 im Lysis-Puffer) freigesetzt.

Als Substrat bietet man ihr eine synthetische Primer-Template Kombination an. Diese Kombination (Polyadenylsäure Dodecathymididylsäure (Poly A (dT)₁₂) besteht aus einem als Template dienenden Polyadenylsäure-Strang (Poly (rA)), an den entsprechend der komplementären Basenpaarung ein Stück Oligodesoxythymidylsäure (Oligo (dT)) als Primer gebunden ist.

Daraufhin gibt man ein weiteres Substrat, das zur Poly rA-Matrize komplementäre, mit Tritium markierte Nukleotid Desoxythymidin-5'-triphosphat [(Methyl, 1', 2'-³H) Thymidin 5'-Triphosphat] zu.

Mit diesen Nukleotiden ist die Reverse Transkriptase in der Lage, den Oligo dT-Primer an seinem 3'-OH-Ende entlang der Poly rA-Matrize zu verlängern. Das Produkt ist eine ³H-markierte RNA/DNA Hybrid-Nukleinsäure.

Nach erfolgter Inkubation, wird eine Probe auf Ionenaustauscher-Chromatographie Papier aufgetragen. Während nicht eingebaute Nukleotide bei den Waschschrritten entfernt werden, binden die höhermolekularen Nukleinsäuren an das Papier. Die Menge der am Papier gebundenen Radioaktivität ist ein Maß für die Enzymaktivität.

Durchführung des Reversen Transkriptase Tests:

Zunächst wurden 1,5ml Zellkulturüberstand bei 3000rpm , 10min zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile abzutrennen. Daraufhin wurden 1ml des zellfreien Überstandes in ein Ultrazentrifugenröhrchen transferiert. Die Anreicherung der Viruspartikel erfolgte dann durch Ultrazentrifugation bei 100.000rpm, 7min, unter Benutzung eines Festwinkelrotors (Typ TL 100). Nach der Zentrifugation wurden die Überstände verworfen und das Pellet in 30µl TSAM-Puffer (Materialteil 3.4.3) resuspendiert. Zu einer besseren Absicherung der Ergebnisse wurde eine Doppelbestimmung der Proben durchgeführt. Aus diesem Grund wurden die 30µl des Puffers auf zwei Eppendorfgefäße verteilt. An dieser Stelle kann der Test unterbrochen und die Proben bei 4°C für einen Tag aufbewahrt werden.

Durch Zugabe von 25µl Lysis-Puffer (Materialteil 3.4.3) zu jedem Testansatz kommt es zur Lyse des Virus und zur Freisetzung der Reversen Transkriptase. Alle weiteren Schritte bis zum Start der eigentlichen Reaktion, d. h., bis zur Inkubation mit dem rAdT/³H-TTP-Mix (Materialteil 3.4.3), sollten auf gekühlten Eisplatten durchgeführt werden. Zu den gekühlten Proben wurden nun 30µl der Substrate (rAdT/³H-TTP-Mix) dazugegeben.

In diesem Mix sind die Tritiummarkierten Nukleotide (^3H -TTP; Materialteil 3.1.6) und die Primer-Template-Kombination (rAdT; Materialteil 3.1.6) enthalten. Da nach Zugabe des Lysis-Puffers die Proben nicht mehr infektiös waren, konnte der L3-Bereich verlassen werden.

Nach Überführung der Proben in den Isotopenbereich wurden die Proben 90min, bei 37°C (im Wasserbad) inkubiert. Falls aktive Reverse Transkriptase im Testansatz vorhanden ist, polymerisiert sie mit den ^3H -markierten Nukleotiden, entlang der Matrize, zu einem RNA/DNA-Hybrid. Durch Zugabe von $10\mu\text{l}$ Lauroylsarkosinlösung, einem Detergenz, wurde die Reaktion gestoppt.

Das DE81 Ionenaustauscher-Chromatographie Papier der Firma Watman (Materialteil 3.1.6) wurde in 3×2 cm große Felder eingeteilt und mit den Probennummern beschriftet. Nachdem jeweils $50\mu\text{l}$ des Testansatzes auf das entsprechende Feld pipettiert worden sind, wurde das Papier in der Mikrowelle getrocknet, um eine feste Bindung der Probe an das Trägermaterial zu gewährleisten. Die nun folgenden Waschschrte wurden in flachen Schalen mit der jeweiligen Waschlösung durchgeführt. Zuerst wurde $2 \times 10\text{min}$ mit $0,35\text{M}$ Natriumhydrogen-phosphat (Na_2HPO_4) und daraufhin $1 \times$ mit destilliertem H_2O gewaschen.

Nach erneutem Trocknen in der Mikrowelle wurden die Felder ausgeschnitten und mit 5ml Szintillationsflüssigkeit in ein Meßröhrchen gegeben. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers ermittelt.

In jedem RT-Test liefen eine Positiv-Kontrolle (infizierte, bekannte Kultur) sowie eine Negativ-Kontrolle (uninfizierte Kultur) mit. Weiterhin wurde eine Nullprobe (*blanc*), die aus TSAM-Puffer (Materialteil 3.4.3) bestand, mitgetestet. Sie diente als Kontrolle um sicherzugehen, dass der Puffer frei von radioaktiven Substanzen war, bzw. sie war dazu da, den Hintergrund der durch den Puffer entstand zu ermitteln. Der Einbau von Radioaktivität in die Negativ-Kontrolle ist auf eine unspezifische Aktivität von zellulären DNA-Polymerasen zurückzuführen.

Der Einbau von radioaktiv markieren Nukleotiden ist ein Maß für die Aktivität der Reversen Transkriptase. Im Allgemeinen wird die Reverse Transkriptaseaktivität in cpm/ml pro Zeiteinheit ausgedrückt. Bezogen auf den oben beschriebenen Test bedeutet dies, bei einer Reaktionszeit von 90min, ein Einheit von cpm/Test x 90'. Man bildet zunächst aus den beiden Werten der Doppelbestimmung den Mittelwert und zieht den Wert der Negativkontrolle ab. Die Berechnung sieht wie folgt aus:

Probeneinsatzvolumen	1 ml (2 x 500µl)	+	15 µl	TSAM
		+	25 µl	Lysis-Puffer
		+	30 µl	Radioaktiv-Mix
		+	<u>10 µl</u>	Stopmix
		Σ	80 µl	

Von dem Volumen von 80µl wurden nur 50µl auf das Watmanpapier aufgetragen. Setzt man das in Relation mit dem einfachen Probeneinsatzvolumen von 500µl, so erhält man einen Wert von 312,5µl. Da das Ursprungsvolumen 1000µl betrug, muss noch durch 312,5µl dividiert werden.

$$\text{Daraus folgt:} \quad \text{cpm / Test} \quad \times \quad \frac{1000}{312.5} \quad = \quad \text{cpm / Test} \times 90'$$

4.1.8.3 Immuncytochemische Färbung infizierter Makrophagen

Mit dieser, im folgenden beschriebenen, Methode war es möglich, einen immun-histochemischen Nachweis einer erfolgten Infektion von adherenten Zellen zu erbringen. Dabei kam der Vectastain Elite ABC-Peroxidase-Kit® (Fa. Linaris / Materialteil 3.1.14) zum Einsatz. Dieser Test wird als Detektionssystem für immunologische Verfahren benutzt, indem er sich die hohe Affinität des Proteins Avidin zu dem Vitamin Biotin zunutze macht.

Der eigentliche Infektionsnachweis erfolgte nach Fixierung der Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd und folgender Blockierung der endogenen Peroxydase (Oxydoreduktasen) mit 1%igem Wasserstoffperoxyd, durch Zugabe eines Primäantikörpers. Bei dem in dieser Arbeit angewendeten Primäantikörper handelte es sich um einen monoklonalen Maus HIV-1 p24-Antikörper (Fa. ScheBo-Tech GmbH). Ein Antikörper der kappa IgG1-Subklasse, der das p24 Capsidprotein des HIV1 erkennen kann.

Bindeglied zwischen dem spezifischen Primärantikörper und dem ABC-Komplex ist ein biotinylierter Sekundärantikörper (Anti-Maus-IgG-Biotin), der die tierspezifische Ig-Kette des Primärantikörpers erkennt. Dabei dient der Sekundärantikörper als Brücke für die Nachweisreaktion mit dem ABC-Komplex. Die Farbreaktion erfordert einen zusätzlichen Substrat-Kit (AEC® = 3-amino-9-ethylcarbazole), der das benötigte Peroxidase-Substrat liefert.

Verlaufschema:

- Fixierung der Makrophagen mit 4% Paraformaldehyd (L3-Labor)
- 2 x mit 1 x PBS waschen (10min bei Raumtemperatur)
- Blockierung der endogenen Peroxydase mit 1 % H₂O₂ (10min bei Raumtemperatur)
- 2 x mit 1 x PBS waschen (10min bei Raumtemperatur)
- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Pferdeserum (20min bei Raumtemperatur)
- Zugabe des Primären Antikörpers (50ng/ml) (60min bei 37°C)

Positiv Kontrolle: Beta 2 Mikroglobulin (Fa. Dianova-Immunotech / Materialteil 3.1.14)

Negativ Kontrolle: Monoklonaler IgG-AK (Fa. Dianova-Immunotech / Materialteil 3.1.14)

- 2 x mit 1 x PBS waschen (10min bei Raumtemperatur)
- Zugabe des Sekundären Antikörpers (45min bei 37°C)
- 2 x mit 1 x PBS waschen (10min bei Raumtemperatur)
- Zugabe des Enzymkomplex-Ansatzes (Avidin + biotinylierte Meerrettichperoxidase) (30min bei 37°C)
- 2 x mit 1 x PBS waschen (10 min bei Raumtemperatur)
- Farbreaktion anschließen: AEC-Kit (1 h bei 37°C)
- Reaktion mit H₂O stoppen (10 min bei Raumtemperatur)

Die benutzten Reagenzvolumina variierten dabei stark mit dem verwendeten Trägermaterial für die adherenten Zellen (z.B. 96-, 12-, 24-well-Mikrotiterplatte, *microchamberslide*) und mussten diesen angepasst werden.

4.1.9 V3-Peptid-ELISA

Um den Gehalt an V3-spezifischen Antikörpern in einem Isolat zu ermitteln, wurde der V3-Peptid-ELISA angewendet (Materialteil 3.1.5). Bei dieser Form des ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) wird eine Mikrotiterplatte mit einem V3-Peptid des entsprechenden Subtyps beschichtet (*coaten*). Im folgenden Inkubationsschritt können die Serumantikörper der Probe mit dem Antigen (Peptid) eine Verbindung eingehen. An diesen Ag-Ak-Komplex kann dann ein weiterer, mit dem Enzym Meerrettichperoxidase markierter, Antikörper (Konjugat) binden. Anschließend muss noch, damit es zu einer Farbstoffentwicklung kommen kann, ein Chromogen (Substrat) dazugegeben werden. Als Chromogen für die Meerrettichperoxidase dient OPD (o-Phenylendiamindihydrochlorid). Das OPD wird in Phosphat-Citrat-Puffer gelöst und mit 30%igem Wasserstoffperoxid versetzt. Die Farbstoffbildungsrate verläuft dabei nur linear, wenn der pH-Wert der Reaktion und die Wasserstoffperoxid-Konzentration stimmen. Diese Werte sind für den jeweiligen Versuchssansatz empirisch zu ermitteln. Zum Schluss wird die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte innerhalb von 15min, bei einer Wellenlängen von 492nm und 650nm ermittelt.

Verlaufschema (die Pufferzusammensetzungen sind dem Materialteil 3.4.4 zu entnehmen):

Coaten:

- P1-Peptidstock (1mg/ml / Subtyp B) mit Coat-Puffer auf 5µg / ml verdünnen.
- In jede Vertiefung (*well*) der Mikrotiterplatte, 100µl der Peptidverdünnung geben.
- → + 4°C, über Nacht
- Peptidlösung auf ein Papier abklopfen.

Blocken:

- In jede Vertiefung 200µl Block-Verdünnungspuffer geben.
- → 37°C, 2 Stunden
- Serumverdünnungen herstellen (mit Block-Verdünnungspuffer)
- Verdünnungen von 1:500 bis 1:100.000
- Platte 2 x mit Wasch-Puffer (200µl/*well*) waschen

Serumzugabe:

- In jede Vertiefung 100µl Serumverdünnung geben.
- → 37°C, 2 Stunden
- Platte 5 x mit Waschpuffer (200µl/*well*) waschen

Konjugat:

- Konjugat 1:2000 mit Block-Verdünnungspuffer mischen.
- In jede Vertiefung 100µl der Konjugatverdünnung geben.
- → 37°C, 1.5 Stunden

Substrat:

- 1 Substrattablette (OPD) in 35ml Phosphat-Citrat-Puffer lösen.
- 30µl 30% H₂O₂ hinzufügen.
- In jede Vertiefung 100µl der Substratverdünnung geben.
- → Raumtemperatur, 6 Minuten

Stoppen:

- Reaktion mit, 100µl pro Vertiefung, 1N H₂SO₄ stoppen
- Extinktion bei den Wellenlängen von 492nm und 650nm ermitteln.

4.1.10 TCID₅₀-Bestimmung (*tissue culture infectious dose*)

Die TCID₅₀-Bestimmung ist eine Virustiterbestimmung durch Endpunkttitration, die eine Festlegung des infektiösen Virusgehaltes ermöglichen soll. Bei der Endpunkttitration werden verschiedene Verdünnungsstufen der Probe auf mehreren Zellkulturen und unterschiedlichen Zellsystemen getestet. Der Virustiter ist dann die daraus berechnete Verdünnung der Probe, nach deren Applikation 50% der Zellkulturen infiziert worden sind.

4.1.10.1 TCID₅₀-Bestimmung auf Lymphozyten

Es wurden Mononukleäre Zellen aus zwei Buffy's (Abschnitt 4.1.1) extrahiert und die Lymphozyten zwei Tage, durch Zugabe von Phytohämagglutinin, stimuliert (Abschnitt 4.1.2). Die Zelldichte wurde auf 4.5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die folgende Infektion wird in einem Gesamtvolumen von 500µl durchgeführt. Daraus resultiert eine Zelldichte von 2.25×10^6 Zellen/500µl.

Pro Isolat und Buffy wurden 8 Verdünnungen (4^{-1} bis 4^{-8}) hergestellt, d.h., es wurden 16 Eppendorfgefäße (2x8) benötigt. Da das Gesamtvolumen der Infektion 500µl/Eppendorf-gefäß nicht übersteigen sollte, mussten die Spenderlymphozyten durch Zentrifugation von 10min bei 120rpm ankonzentriert werden. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Zellen jeweils in 50µl PBL-Medium (Materialteil 3.2.1) resuspendiert und bei 37°C im Inkubator gelagert (2.25×10^6 Zellen in 50µl PBL-Medium/Eppendorfgefäß).

Um die Virusprobe zu verdünnen, wurde zuerst 1ml des Virus bei 100.000rpm, 4°C, 20min ultrazentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde daraufhin in 450µl PBL-Medium resuspendiert. Davon ausgehend, wurden die benötigten Verdünnungen hergestellt. Nun wurden von den entsprechenden Virusverdünnungen jeweils 450µl in die vorbereiteten Eppendorfgefäße mit den Zellen (50µl) gegeben. Das Virus-Zell-Gemisch (Infektionsvolumen 500µl/Eppendorfgefäß) wurde daraufhin 3-4 h bei 37°C in einem Rotor (Rotorstufe 2) inkubiert.

Währendessen wurden Mikrotiterplatten (96well), deren Vertiefungen mit jeweils 200µl PBL-Medium gefüllt worden waren, vorbereitet. Nach erfolgter Inkubation wurde das Virus, durch zweimaliges Waschen mit PBL-Medium, entfernt. Die Zellen wurden dann in jeweils 350µl Medium resuspendiert und auf die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte verteilt (50µl/well).

In jeder Vertiefung der Platte befanden sich nun 200µl PBL-Medium + 50µl infizierte Lymphozyten einer bestimmten Virusverdünnung.

Nach 10 Tagen wurden 200µl/well des Virusüberstandes genommen, um den p24-Gehalt der Verdünnungen zu ermitteln (Abschnitt 4.1.8.1). Dabei kam der Höhe des p24-Gehaltes nur eine geringe Rolle zu, da bei der TCID₅₀-Bestimmung nur Ja-Nein-Aussagen von Bedeutung waren.

Berechnung des TCID₅₀ nach Spearman-Kärber (Cavalli-Sforza, L., 1974)

$$m = x_k + d / 2 - (d \times \sum p_i)$$

x_k = -log der kleinsten Dosis, die alle Kulturen infiziert

d = log des Verdünnungsfaktors

$\sum p_i$ = Summe der Verdünnungen, bei denen noch positive Vertiefungen vorhanden sind

$$\text{TCID}_{50} = 10^{+m} \text{ I.U.} / 200\mu\text{l}$$

Standardabweichung von m:

$$s_m^2 = d^2 \sum [p_i (1 - p_i) / (n_i - 1)]$$

n = Anzahl der getesteten Kulturen pro Verdünnung

4.1.10.2 TCID₅₀-Bestimmung auf Makrophagen

Es wurden jeweils die mononukleären Zellen zweier Buffy's (Abschnitt 4.1.1) isoliert und in einem Zell-(Makrophagen)-Medium-Gemisch von 200µl/well auf die Mikrotiterplatten (96well) verteilt. Die Zellzahl wurde auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Nachdem die Monozyten nach 30-60min am Plattenboden adheriert hatten, wurden die nichtadherenten Zellen (PBL's) durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Mediums innerhalb der Vertiefungen der Platte entfernt.

Die verbleibenden Monozyten wurden mit jeweils 200µl Mo/Mak-Medium pro Vertiefung überschichtet und bei 37°C bis zur Ausreifung in Makrophagen (6-8 Tage) im Brutschrank inkubiert.

Die zu testenden Virusisolate (jeweils 1ml) wurden entsprechend der Lymphozyteninfektion bei 100.000 rpm, 20 min, 4°C ultrazentrifugiert. Im Anschluss wurden die Pellets in 850µl Mo/Mak-Medium resuspendiert. Zum Schluss wurden 9 Virusverdünnungen (4^0 - 4^8) pro Isolat hergestellt.

Die Infektion erfolgte, indem aus jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte jeweils 100µl Medium entfernt wurden und diese durch die entsprechende Virusverdünnung ersetzt wurde. Nach 10Tagen wurden dann je 200µl den Plattenvertiefungen entnommen und für eine p24-Bestimmung eingesetzt. Die Berechnung des TCID₅₀ wurde nach Spaerman-Kärber durchgeführt (Abschnitt 4.1.10.1).

4.1.11 Bestimmung der Neutralisationsaktivität auf Lymphozyten

Ähnlich der TCID₅₀-Bestimmung wurden die mononukleären Zellen zweier Buffy's isoliert und mit PHA für zwei Tage stimuliert (Abschnitt 4.1.2). Am dritten Tag wurden die Zellen auf eine Infektionsdichte von 4.5 x 10⁶Zellen/ml mit PBL-Medium (Materialteil 3.2.1) eingestellt.

Je Isolat und Buffy wurden jeweils 5 Vertiefungen mit autologem Serum (unverdünntes Serum), mit negativem Serum, ohne Serum und mit einer Positiv-Serumverdünnung (Verdünnung des HIV1-positiven Serums mit Negativserum) von 1:50, 1:100 und 1:500 auf einer Mikrotiterplatte (96well) getestet.

	Buffy 1						Buffy 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ohne Serum
neg. Serum
pos. Serum (unverd.)
1:50 Verd.
1:100 Verd.
1:500 Verd.

Abb. 4. 1

Die Infektion sah im Einzelnen wie folgt aus:

- Die Infektion erfolgte für jeweils 5 Vertiefungen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (z. B. ein Eppendorfgefäß für Buffy 1/ohne Serum). Es wurden somit 6 Reaktionsgefäße (A1-A6) für Buffy 1 mit je 2.25 x 10⁶ Zellen in einem PBL-Medium-Volumen von 50µl und 6 Reaktionsgefäße (B1-B6), mit gleicher Zellzahl, für Buffy 2 vorbereitet. Die Ankonzentrierung der Spenderlymphozyten entsprach dabei der, der TCID₅₀-Bestimmung (Abschnitt 4.1.10).
- Der eigentliche Infektionsschritt wurde in 6 weiteren Reaktionsgefäßen (C1-C6) durchgeführt. Dabei wurden 1000I.U.Virus/Reaktionsgefäß eingesetzt. Die entsprechenden Virusüberstände des Virusstocks wurden aufgetaut und bei 100.000rpm, 20min, 4°C ultrazentrifugiert. Genauer, bei der Infektion wurde ein Volumen von 990µl Virus-PBL-Medium-Gemisch pro Reaktionsgefäß (C1-C6) eingesetzt. Bei 6 Reaktionsgefäßen (C1-C6) pro 96well-Platte

(2 Buffy's mit jeweils 6 Serumstufen) wurden 12.000 I.U Virusstock benötigt. Da bei der Infektion ein Volumen von 990 µl des Virus-PBL-Mediums eingesetzt wurde, musste das Viruspellet in 12 ml PBL-Medium resuspendiert werden.

3. Dekomplementierung aller, für den Versuch benötigten Seren bei 56°C für 30 min, im Wasserbad.

4. Verdünnung der Positivseren durch Mischen eines entsprechenden Anteils mit Negativserum (gepoolte Seren HIV1-negativer Spender).

5. Herstellung einer Serum-Virus-Vorverdünnung. Dabei wurden jeweils 110 µl der Negativ- bzw. Positiv-Serum-Verdünnung mit 990 µl des Virus-PBL-Medium-Mixes gemischt. Das daraus resultierende Gesamtvolumen betrug 1100 µl (Reaktionsgefäße C1-C6).

Infektion: 110 µl Serum bzw. Serumverdünnung + 990 µl Virus-PBL-Medium-Mix

Im Falle des Versuchsteils ohne Serum, wurde der Serumanteil durch 110 µl PBL-Medium ersetzt.

Die Serum-Virus-Vorverdünnung wurde für 30 min bei 37°C inkubiert, um eine Bindung der Serumantikörper an das Virus zu vereinfachen. Die Serumkonzentration bei der Infektion war somit 10%.

6. Nach der Vorinkubation wurden 900 µl (2 x 450 µl) aus jedem der 6 Reaktionsgefäß (C1-C6 / Volumen: je 1100 µl) auf die vorbereiteten Reaktionsgefäße (A1-A6 und B1-B6) mit den Zellen verteilt. Die Reaktionsgefäße A1-A6 und B1-B6 (Infektionsvolumen: 450 µl Virus-Vorverdünnung + 50 µl Spenderlymphozyten = 500 µl) wurden nun 4 h bei 37°C (Rotorstufe 2) im Rotor gedreht. Dies war von Bedeutung, um eine gleichmäßige Durchmischung der Zellen während der Infektion zu gewährleisten.

7. Vorbereitung der Mikrotiterplatte. In jede Vertiefung der Platte wurden 200 µl PBL-Medium vorgelegt.

8. Nach der Infektion der Lymphozyten wurden die Reaktionsgefäße A1-A6 und B1-B6 mit dem Virus-Serum-Zellgemisch 2 mal mit PBL-Medium gewaschen, um das Serum zu entfernen. Abschließend wurde das serumfreie Zellpellet in einem Volumen von 300 µl PBL-Medium resuspendiert.

9. In jede der vorbereiteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden 50 µl der infizierten Zellen gegeben (pro Vertiefung: 200 µl PBL-Medium + 50 µl infizierte Zellen).

10. Nach 10 Tagen wurden aus jedem *well* 200 µl Virusüberstand genommen und in eine p24-Bestimmung (Abschnitt 4.1.8.1) eingesetzt.

Da parallel zur p24-Bestimmung der Virusüberstände, eine Standardkurve mit einer Positivkontrolle (*HIV-1 p24-Antigen Reagent*) der Firma Coulter erstellt worden war, konnte von den gemessenen Extinktionen die Konzentration (pg / ml) an p24-Ag der getesteten Proben ermittelt werden.

Um den Neutralisationseffekt zu bestimmen, wurde der Antigengehalt der getesteten Kulturen quantitativ bestimmt (Abschnitt 4.1.8.1). Daraufhin wird die Summe der ermittelten Antigenmenge der getesteten Kulturen durch die Anzahl der getesteten Kulturen dividiert.

Der Neutralisationseffekt berechnet sich dann aus dem Mittelwert der Antigenmengen der unterschiedlichen Patientenseren zur produzierten Antigenmenge in der positiven Kontrolle.

Mittelwert $z : \Sigma (a_i)/a_n$

a_i = Antigenmenge der Einzelkultur einer gegebenen Virus/Serum-Kombination

a_n = Zahl der Kulturen einer gegebenen Virus/Serum-Kombination

% Neutralisation (N) = $(1 - z_a/z_y) \times 100$

z_a = Mittelwert der Virus/Serum-Kombination a

z_y = Mittelwert der Virus/Serum-Kombination der Positiv-Kontrolle.

Die ermittelte Prozentzahl stellt ein Maß der erfolgten Neutralisation dar (hohe p24-Reduktion = geringe p24-Produktion = hohe Neutralisation). Genauer, hat z.B. eine Neutralisation (Reduktion der p24-Produktion) von 30% eines Virus durch autologes oder heterologes Serum stattgefunden, so konnten die Serumantikörper bei 70% der Viren die Infektion der Zielzellen nicht verhindern.

Der 50% Neutralisationstiter wird als die reziproke Verdünnungsstufe des Patientenserums definiert, bei der noch eine 50%ige Reduktion des für die Infektion definierten Parameters vorliegt.

4.1.12 Bestimmung der Neutralisationsaktivität auf Makrophagen

Nach Isolierung der mononukleären Zellen aus zwei unterschiedlichen Buffy's (Abschnitt 4.1.1) und Einstellung der Zellzahl auf 1×10^6 Zellen / well (Abschnitt 4.1.3) wurden die nichtadherenten Zellen nach 30min durch zweimaliges Waschen mit Mo/Mak-Medium (Materialteil 3.2.2) aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte entfernt. Die adherenten Monozyten bildeten dabei einen Monolayer aus. Eine einschichtige Zelllage, die den gesamten Boden der Platte bis zum Rand ohne Lücken bedeckt. Die mit den adherenten Monozyten behafteten Mikrotiterplatten wurden daraufhin für 6-8 Tage, bei 37°C inkubiert, bis die Ausreifung zu Makrophagen vollzogen worden war.

	Buffy 1						Buffy 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ohne Serum
neg. Serum
pos. Serum (unverd.)
1:50 Verd.
1:100 Verd.
1:500 Verd.

Abb. 4.2

1. Am Tag der Infektion (Tag 6-8 nach Isolierung der MNC aus humanem Blut) wurde die für den Versuch benötigte Menge an Virusüberstand aufgetaut, ultrazentrifugiert und anschließend in Mo/Mak-Medium resuspendiert. Da bei den unterschiedlichen Virusisolaten eine starke Spender-Buffy-Abhängigkeit zu verzeichnen war, wurden unterschiedliche Virusmengen in den Experimenten eingesetzt. Die Viruseinsatzmengen wurden in Vorversuchen empirisch festgelegt. Sie lagen im Bereich von 300I.U. -1000I.U./well. Im Falle schlecht infizierender Viren wurden mehr infektiöse Einheiten (I.U.), als bei gut infizierenden Viren eingesetzt. Zur Infektion wurden insgesamt 12 Reaktionsgefäße benötigt (A1-A6 und B1-B6).

Da die folgende Infektion (siehe Schritt 4.) in einem Gesamtvolumen von 550µl/Reaktionsgefäß durchgeführt wurde, wurde das Virus in einem Volumen von 5.5ml (440µl/Reaktionsgefäß A1-A6 und B1-B6) nach erfolgter Zentrifugation resuspendiert.

2. Wie bei der Neutralisation auf Lymphozyten (4.1.11; Schritt 3.) wurde das benötigte Positiv- und Negativserum bei 56°C für 30min, dekomplementiert.

3. Zuerst wurden die Positivseren mit dem Negativserum (gepooltes Serum HIV1-negativer Spender) verdünnt. Für die anschließende Infektion wurde ein Volumen der Serumverdünnungen von jeweils 110µl benötigt.

4. Die Infektionsvolumina sahen pro Reaktionsgefäß (A1-A6 und B1-B6) wie folgt aus:

450µl Virus-Medium-Gemisch + 110µl Serumverdünnung = 550µl

Diese Virus-Serum-Vorverdünnung wurde daraufhin für 30min, bei 37°C inkubiert.

5. Nach erfolgter Vorinkubation wurde aus jeder Vertiefung der Makrophagenplatte jeweils 100µl Medium entfernt und durch jeweils 100µl Virus-Serum-Vorinkubation ersetzt.

6. Nach 7-10 Tagen wurde der p24-Gehalt der Überstände mittels p24-ELISA bestimmt.

Die Auswertung entsprach der der Lymphozyten-Neutralisationsversuche.

4.1.13 Neutralisationsaktivität von aufgereinigten IgG's und deren Spaltprodukten

Die Bestimmung der Neutralisationsaktivität isolierter Immunglobuline und Fab-Fragmenten wurde auf Makrophagen und auf Lymphozyten durchgeführt. Der Versuchsablauf entsprach dabei im Falle der Makrophagen, dem unter Punkt 4.1.12 erläuterten Experiment zur Bestimmung der Neutralisationsaktivität auf Makrophagen. Entsprechend war der Versuchsablauf auf Lymphozyten identisch mit dem, unter Punkt 4.1.11 dargestellten Experiment zur Bestimmung der Neutralisationsaktivität auf Lymphozyten. Auf beiden Zellkultursystemen wurden anstelle des Serums HIV1-positiver Patienten, die mit dem Mab Trap GII-Kit (Abschnitt 4.4.1; Materialteil 3.1.9) isolierten Immunglobuline oder Fab-Fragmente (Abschnitt 4.4.2; Materialteil 3.1.10) eingesetzt.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die IgG's und Fab-Fragmente genauso behandelt wie die Serum-AK HIV1-positiver Patienten.

4.2 Anzucht, Kultur und Infektion unterschiedlicher Zelllinien

4.2.1 Vorstellung unterschiedlicher Zelllinien

4.2.1.1 Zelllinie U87.MG (Ursprung: Dr. P. Clapham/Clapham et al., 1991)

Bei der Zelllinie U87.MG handelt es sich um menschliche Gliomazellen, die mit einem amphotropen Retrovirus (MoMLV), das eine Neomycinresistenz als selektiven Marker besitzt, infiziert wurden. Die resultierenden Zellen sind resistent gegen eine HIV-1 Infektion. Sie wurden während der Versuche als Negativkontrolle benutzt.

4.2.1.2 Zelllinie U87.CD4 (Ursprung: Dr. D. Littman)

Bei diesen Zellen handelt es sich um die oben erwähnten menschlichen Gliomazellen, die zusätzlich das menschliche CD4 auf der Zelloberfläche exprimieren. Weiterhin sind sie, durch stabile Transfektion, in der Lage, neben CD4 auch menschliche Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche zu exprimieren (Clapham et al., 1991). Der Begriff CD4 (*cluster of differentiation*) steht dabei für die Nomenklatur der Antigene, die mit Hilfe monoklonaler Antikörper eine Differenzierung unterschiedlicher Zellpopulationen erlaubt.

Mit der Zelllinie U87.CD4 können die Chemokinrezeptoren der HIV1-positiven Patientenisolate bestimmt werden. Somit kann der Infektionsmechanismus des jeweilige Patientenvirus in Bezug auf die Chemokinrezeptoren aufgeklärt werden.

Die Anzucht der Zellen erfolgt in einem Kulturmedium (Materialteil 3.2.3), das neben DMEM und FCS (*foetal calf serum*) auch verschiedene Antibiotika enthält. Durch die Antibiotika Gentamycin (G418) und Puromycin war es möglich, die Zellen mit Chemokinrezeptorexpression zu selektionieren.

Um den Verlust der Rezeptorexpression zu verhindern, mussten die Zellen ständig selektioniert werden. Es wurden folgende Antibiotika-Konzentrationen dem Medium zugesetzt:

Gentamycin (G418): Selektionskonzentration 300µg/ml Medium

Puromycin: Selektionskonzentration 0.5µg/ml Medium

Die Selektion erfolgt bei CD4 Zellen durch Gentamycin. Genauer, nur CD4 positive Zellen können in Anwesenheit des Antibiotikums G418 wachsen. CD4 negative Zellen sterben ab. Die Corezeptorgene besitzen eine Puromycinresistenz. Folglich können unter Puromycin-selektion ausschließlich solche Zellen wachsen, die diese Resistenz aufweisen. Puromycinsensible Zellen sterben nach kurzer Zeit ab. Durch diese Art der Selektion wird gewährleistet, dass nur CD4 positive Zellen, die einen Chemokinrezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren, in dem Selektionsmedium wachsen können. Im einzelnen werden folgende Schritte durchgeführt:

1. Auftauen der Zellen:

- Zellen (1ml-Aliquot) aus dem Flüssigstickstoff holen.
- 15ml Plastikröhrchen mit 10ml PBS füllen und bereitstellen.
- aufgetaute Zellen in die vorbereiteten Plastikröhrchen überführen.
- Zellen bei 1000rpm, 5min zentrifugieren.
- Überstand entfernen und Zellpellet in 10ml Kulturmedium (Materialteil 3.2.3) resuspendieren.
- Zellen + Medium in eine Kulturflasche überführen und bei 37°C, 5% CO₂ inkubieren.

2. Splicen der Zellen (alle 2 Tage, wenn die Zellen zu dicht sind):

- Medium + Zellen aus der Kulturflasche abziehen.

- mit 10ml PBS waschen um FCS-Reste aus dem Kulturmedium zu entfernen (FCS stoppt die Trypsinierung).
 - PBS aus der Kulturflasche entfernen und 2 ml Trypsin (löst die Zellen ab) dazugeben.
 - 5min stehen lassen.
 - 10ml 1 x PBS (mit 10% FCS) in die Kulturflasche geben.
 - Zellen in ein 15ml Plastikröhrchen überführen und bei 1000rpm, 5 min zentrifugieren.
 - Überstand entfernen und Pellet in 10ml Kulturmedium (Materialteil 3.2.3) resuspendieren.
- 1 - 2ml daraus entnehmen und in eine Kulturflasche mit 10ml Kulturmedium überführen.

4.2.2 Infektion von U87 Zellen mit Virusüberständen

Die Infektion erfolgte auf Plastikobjektträgern, die mit Hilfe eines Deckels eine Kammer bildeten (*slideflask* 9 CM 2; Materialteil 3.1.15). Zuerst wurden 5×10^4 U87 Zellen/ml Medium in die Kammer aufgebracht. Das Gesamtkammervolumen ist 5ml. Den Zellen wurde daraufhin 1-2 h Gelegenheit gegeben zu adherieren.

Im Verlauf dieser Zeit wurden 1ml Virusüberstand eines Virusstocks (Abschnitt 4.1.7) mit der Ultrazentrifuge bei 100.000rpm, 7min, unter Benutzung eines Festwinkelrotors (Typ TL 100) herunterzentrifugiert und in U87-Medium resuspendiert. Pro *slide* konnte ein Volumen von 100µl Virus (gelöst in Kulturmedium) eingesetzt werden. Das Virus, wurde daraufhin in die mit den Zellen vorbereiteten Kammern überführt. Die Viruskultur wurde für 24h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Nach 24h wurde der Virusüberstand durch einmaliges Waschen mit 5ml Kulturmedium entfernt. Häufigeres Waschen war nicht möglich, da die Zellen nur eine geringe Adhärenz aufwiesen. Im Anschluss wurde ein Volumen von 5ml Kulturmedium in die Kammer gegeben. Nach weiteren 6 Tagen wurden 200µl Virusüberstand für eine p24-Bestimmung entnommen und die Zellen auf den *slides* mit Paraformaldehyd fixiert, um ihre Infektion nach immunocytochemischer Färbung (Abschnitt 4.1.8.3) unter dem Mikroskop beurteilen zu können.

4.2.3 MT-2 Assay (Ursprung MT-2 Zellen: Dr. B. Larder)

MT-2 Zellen sind nicht-adherente, humane T-Zellen, die humanes T-Zell Leukämie Virus Typ 1 (HTLV-I) tragen. Durch Cokultivierung von Blutlymphozyten mit Zellen der adulten T-Zell Leukämie, erhalten sie ähnliche Oberflächenmarker (Harada et al., 1985).

MT-2 Zellen exprimieren als Chemokinrezeptor ausschließlich CXCR 4 und können somit nur von Synzytium induzierenden (SI) HIV-Isolaten infiziert werden.

Nach erfolgter Infektion treten nach kurzer Zeit cytopathische Effekte und Cytotoxizität auf. Es bilden sich, durch Zellfusion entstandene, multinukleäre Riesenzellen aus.

Mit Hilfe des MT-2 Assays kann man den Virusphänotyp (SI/NSI) visuell bestimmen, indem unter dem Lichtmikroskop die Ausbildung von Synzytien (SI-Phänotyp) oder deren Fehlen (NSI-Phänotyp) beobachtet werden kann.

Infektion:

Da es sich bei den MT-2 Zellen um nicht-adherente Zellen handelt, konnte die Infektion entsprechend der der Lymphozyten erfolgen. Zuerst wurden die MT-2 Zellen, durch Zentrifugation (1500rpm, 5min) auf eine Infektionszellendichte von 4.5×10^6 Zellen/ml Kulturmedium (Materialteil 3.2.4) eingestellt. Genauer, nach der Zentrifugation wurden die Zellen gezählt (Kova-Kammer; Abschnitt 4.1.4) und in soviel Kulturmedium resuspendiert, dass die daraus resultierende Zellzahl 4.5×10^6 Zellen/ml war. Durch die Zentrifugation wurden die Zellen ankonzentriert und das Pellet in einem Volumen von 50µl Kulturmedium resuspendiert. Daraufhin wurden jeweils 1ml der zu testenden Virusüberstände aufgetaut, bei 100.000rpm, 7min ultrazentrifugiert und in 500µl Kulturmedium resuspendiert. Das in 500µl Medium gelöste Virus wurde nun zu den MT-2 Zellen (50µl) gegeben und für 4h, bei 37°C im Rotor gedreht. Danach wurden die Zellen 2 x mit Kulturmedium gewaschen und in einem Volumen von 200µl/well auf eine Mikrotiterplatte überführt. An den folgenden 11-14 Tagen wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf Synzytienbildung untersucht. Zum Schluss wurde zur Bestätigung der Infektion ein p24-Test (ELISA) angeschlossen.

4.3 Schwerpunkt Molekularbiologie

4.3.1 DNA-Extraktion aus peripherem, humanem Blut

Die Isolierung genomischer DNA aus peripheren mononukleären Zellen wurde mit Hilfe eines Testkits der Firma Qiagen (Materialteil 3.1.7) durchgeführt. Das Testverfahren, das hier in Kürze erläutert werden soll, erlaubt eine schnelle und effektive Isolierung von Gesamt-DNA aus humanen *pbmc*'s. Die Präparation von DNA erfolgt in drei Schritten. Dabei verhindern die verschließbaren Spinsäulen Kreuzkontaminationen zwischen den Proben, und erlauben die sichere Handhabung von infektiösem Material.

Zuerst wurde die Probe (200µl-Aliquot = 1×10^7 Zellen in PBS) aus der MNC-Isolierung (Abschnitt 4.1.5) auf Raumtemperatur gebracht. Daraufhin wurden 25µl QUIAGEN Protease Stammlösung (Konz. 19.23mg/ml) und 200µl Lysepuffer (AL-Puffer; Materialteil 3.4.2) dazugegeben. Da mit den benutzten Spinsäulen nicht nur DNA, sondern auch RNA isoliert wird, wurde vor Zugabe des AL-

Puffers die Probe mit 20mg/ml RNase Stammlösung versetzt. Um eine effiziente Lyse zu erreichen, wurde die Probe sofort mit Hilfe eines Vortex kräftig gemischt, bis eine homogene Lösung erzielt worden war. Die Reaktion der Lyse wurde durch 10minütiges Erhitzen auf 70°C unterstützt. Da es sich um infektiöse Partikel handelte, wurden diese durch einen zusätzlichen Inkubationsschritt von 15min bei 95°C inaktiviert. Als nächstes wurde die Probe mit 210µl 96 % igen Äthanol versetzt. Nachdem das Lysat auf die Spinsäule aufgetragen worden war, wurde die DNA während eines Zentrifugationsschrittes (1min, 6000 x g) an die Silicamembran gebunden. Dabei stellten die Salz- und pH-Bedingungen im Lysat sicher, dass weder Proteine noch andere Kontaminationen, die eine anschließende PCR hemmen könnten, auf der Membran zurück blieben. Die an die Membran gebundene DNA wurde daraufhin mit jeweils 500µl Wasch-Puffer (AW-Puffer; Materialteil 3.4.2) gewaschen. Durch die beiden Waschschrte wurden verbliebene Kontaminationen entfernt, ohne die DNA-Bindung zu beeinflussen. Die abschließende Elution erfolgte durch Zugabe von 200µl, zuvor auf 70°C erhitzten, Elutionspuffer (AE-Puffer; Materialteil 3.4.2).

4.3.2 Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction/PCR*)

Prinzip der Polymerasekettenreaktion:

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt Desoxyribonukleinsäure-(DNA) Abschnitte vervielfältigen kann. Um DNA mit Hilfe einer PCR amplifizieren zu können, benötigt man als Starthilfe Oligonukleotidprimer. Genauer, kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (*template*) sind. Die DNA-Polymerase ist daraufhin in der Lage, in Gegenwart von Desoxy-nukleosidtriphosphaten (dNTPs), unter definierten Reaktionsbedingungen, die Primer entlang der einzelsträngigen, denaturierten DNA-Matrize zu verlängern. Die Verlängerung erfolgt dabei in 5' Richtung der *template*-DNA. Es entstehen zwei neue DNA-Stränge, deren Sequenzen komplementär zu den Matrizen sind.

Da alle neusynthetisierten Stränge als Doppelstränge vorliegen, muss für eine Wiederholung der Synthese die doppelsträngige DNA durch Erhitzung auf mindestens 90°C denaturiert werden. Dieser Vorgang gewährleistet, dass nach Abkühlung der Mischung die Primer erneut binden können. Die neusynthetisierten DNA-Stränge dienen nun ebenfalls als Matrize und tragen so dazu bei, dass mit jedem neuen Zyklus die Konzentration der vervielfältigten Zielsequenz ansteigt (Davies K., 1988; Erlich HA, 1989; Innis et al., 1990; McPherson et al., 1991) Die PCR-Methode ist durch Patente der Fa. Hoffman-La Roche geschützt.

PCR-Verlaufschema:

Die Vermehrung der Zielsequenz erfolgt somit exponentiell und lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$(2^n - 2n)x$$

- n = Anzahl der Vermehrungszyklen
- 2n = Produkte des ersten und zweiten Vermehrungszyklus, deren Länge nicht definiert ist
- x = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize

Diese Formel gilt nur, wenn die Ausbeute in jeder Runde 100%tig ist. Dies ist jedoch in der Praxis nicht möglich, da z. B. die Enzymaktivität im Verlauf der Reaktionszyklen abnimmt bzw. die Hitze das Enzym denaturiert.

Durchführung der Polymerasekettenreaktion:

Bei der erfolgreichen PCR kommt es vor allem auf die Wahl geeigneter Reagenzien an. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein genetisch verändertes Enzym (Amplitaq®; Fa. Perkin-Elmer Cetus) eingesetzt. Bei der Taq-DNA-Polymerase handelt es sich um ein hitzestabiles Enzym aus *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988). Sie ist in der Lage, bei einer Temperatur von 70-80°C, DNA mit einer Geschwindigkeit von 35-100 Nukleotiden pro Sekunde zu synthetisieren (Newton and Graham, 1994). Weiterhin besitzt sie eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität, die die Nukleotide vor der Polymerase abbauen kann. Die eingesetzte Endkonzentration belief sich, bei einem 50µl-Reaktionsansatz, auf 1 Unit.

Um ein optimales Ergebnis zu erhalten, muss die benutzte PCR-Puffer-Zusammensetzung auf die verwendete Polymerase abgestimmt sein. Der bei den Experimenten benutzte Puffer bestand aus 100mM Tris-HCl (pH 8.3) und 500mM KCl (Fa. Perkin-Elmer Cetus). Magnesiumchlorid wurde separat, in einer Endkonzentration von 62.5mM, hinzugefügt. Bei der PCR-Reaktion wurde weiterhin eine Konzentration von 10mM dNTPs verwendet.

Um die optimale *annealing*-Temperatur eines PCR-Primers zu ermitteln, muss man die Schmelztemperatur T_m des Primers bestimmen. Für jede Amplifizierung werden Primerpaare mit möglichst ähnlicher T_m synthetisiert. Dazu kann man folgende Gleichung benutzen:

$$[(\text{Anzahl von A} + \text{T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G} + \text{C}) \times 4^\circ\text{C}].$$

Bei einem 50 μ l-Reaktionsansatz wurde eine Primer-Endkonzentration von jeweils 10 μ M eingesetzt. In der Praxis besteht die Durchführung einer PCR-Reaktion aus zwei elementaren Arbeitsgängen. Zuerst wird ein Reaktionsmix aus Puffer, dNTPs, MgCl₂, Primern, H₂O und DNA-Polymerase in einem "DNA-freien" Raum hergestellt. Dieser Mix wird dann auf entsprechende Reaktionsgefäße verteilt (50 μ l- oder 100 μ l-Ansatz pro Probe), in einen anderen Raum transferiert, um dort die DNA hinzuzufügen.

Darstellung des zyklischen Temperaturverlaufes einer PCR-Reaktion:

Schritt 1: Die doppelsträngige DNA wird, bei einer Temperatur von 93-100°C, denaturiert.

Schritt 2: Die Oligonukleotidprimer binden, bei einer *annealing*-Temperatur von 37-65°C, an die denaturierte Matrize. Dabei gilt, umso höher die *annealing*-Temperatur, umso stringenter verläuft die Reaktion.

Schritt 3: Die hitzestabile DNA-Polymerase verlängert die Primer bei einer Temperatur von 72°C (Elongation).

Zum Schluss wurde der Erfolg der PCR-Reaktion auf einem 1% Agarosegel überprüft. Dabei wurde 1g Agarose in 100ml 1 x TBE gelöst, erhitzt und in einer Gel-Kammer zu einem ca. 5mm dicken Agarosegel gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Gel-Kamm entfernt und die PCR-Produkte in die einzelnen Vertiefungen des Agarosegels pipettiert. Der elektro-phoretische Lauf wurde bei 100Volt für ca. 1h durchgeführt. Im Anschluss daran wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert.

Da ein Marker (z. B. 100bp DNA Ladder [(Fa. Gibco BRL) und/oder λ /HindIII (Fa. Appligene)] parallel zur Probe mitlief, konnten Größe und Menge der neu amplifizierten DNA bestimmt werden.

4.4 Schwerpunkt Proteinbiochemie

4.4.1 Serumantikörperisolierung

Die Isolierung von humanen IgG-Antikörpern aus Serum erfolgte durch Anwendung des Mab Trap GII-Kit® der Firma Pharmacia Biotech. Das Prinzip des Kits beruht auf eine Bindung der Antikörper an Sepharose G, die als Säulenmaterial fungiert. Nachdem das humane Serum, verdünnt mit Bindepuffer (Bestandteil des Kits), auf die Säule aufgebracht und die Säule mit Bindepuffer gewaschen worden war, wurden die Immunglobuline der Subklasse G mit Hilfe des Elutionspuffers (Bestandteil des Kits) gewonnen. Der Versuchsablauf im einzelnen sieht wie folgt aus:

1. Pufferverdünnungen herstellen.

- 2.5ml Bindingbuffer + 22.5ml dH₂O
- 0.5ml Elutionbuffer + 4.5ml dH₂O

2. Auffanggefäße (Collectiontubes) vorbereiten.

- Jedes tube mit 60-100 μ l Neutralisationspuffer (im Kit enthalten) füllen. Durch Zugabe des Neutralisationspuffers bleibt die Aktivität labiler IgG's erhalten.

3. Probenvorbereitung:

- 500 μ l Patientenserum 1:1 mit Bindingbuffer mischen

4. Säulenvorbereitung:

- 10ml Spritze mit dH₂O füllen
- Spritze über Adapter (luer adaptor) mit der Säule verbinden
- Aufbewahrungslösung (Ethanol) aus der Säule mit 5ml dH₂O entfernen.

5. Säulenequilibration mit 3ml Bindingbuffer

6. IgG-Isolierung:

- Serum mit der Spritze auf die Säule auftragen
- Eluatsammlung starten
- Säule mit 5-10ml Bindingbuffer waschen bis Durchfluss klar ist
- Elution mit 3-5ml Elutionbuffer in vorbereitete tubes(siehe Punkt 2.)

7. Re-Equilibration der Säule mit 5ml Bindingbuffer (Lagerung der Säule mit 5-10ml Ethanol (20%) bei + 4°C).

4.4.2 Herstellung von IgG-Fab-Fragmenten

Immunglobuline kann man mit Papain in ihre Fragmente zerlegen (Escribano MJ, 1979; Mohanty et al., 1985). Durch Papain wird das IgG-Molekül in der Gelenkregion gespalten. Es entstehen dadurch ein Fc-(c = *crystallizable*) und zwei Fab-Fragmente (ab = *antigen binding*).

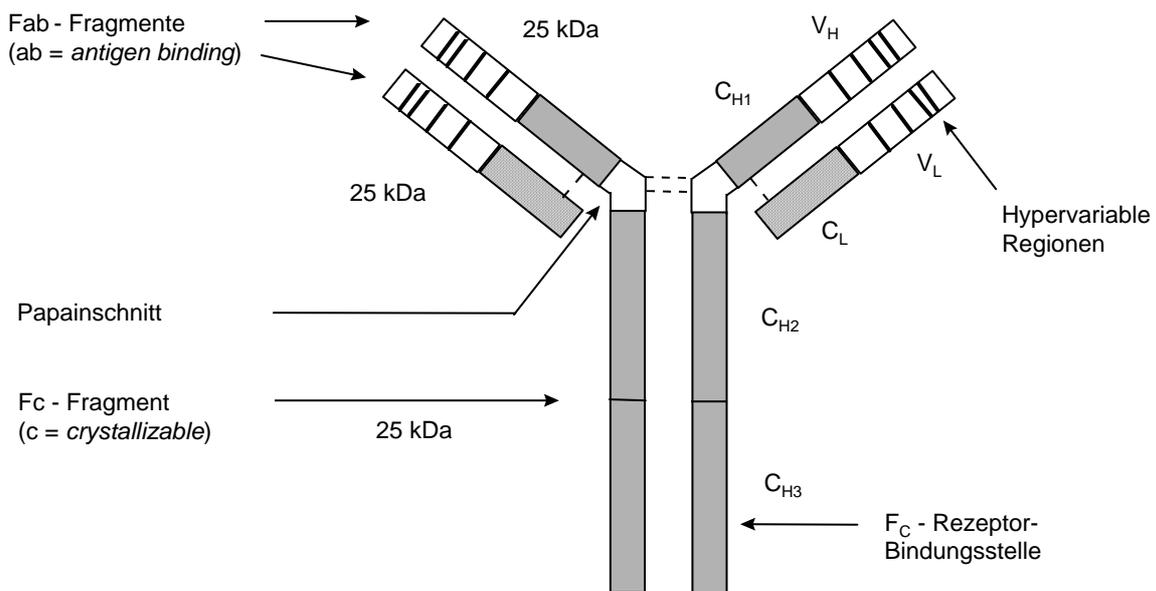


Abb. 4. 3

Reaktion:

- Vor Gebrauch musste das Enzym Papain mit Cystein-HCl aktiviert werden.
- IgG-Mengenbestimmung durch Messung der Optischen Dichte bei 280nm.
- 100µl IgG-Lösung (5mg/ml)
- + 50µl Papainlösung (Konz. stock: 10mg/ml. Gebrauchsfertige Lösung)
- + 25µl 4 mM EDTA (4mM)
- + 25µl Cystein-HCl (0.2M)
- 2 Stunden bei 37°C inkubieren
- Reaktionsstop durch Zugabe von 50µl Iodoacetamid (40mM).

4.4.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay® (Materialteil 3.1.11). Der zu bestimmende Proteingehalt wurde bei diesem Test ermittelt, indem die Probe in Relation zu einem Standard aus Rinderserumalbumin (BSA) gesetzt wurde. Der Standard selbst wurde, parallel zur Testprobe, mit getestet. Seine Konzentrationen lagen im Bereich von 0.049mg/ml bis 0.74mg/ml. Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung der Extinktion bei 595 nm.

Reaktion:

200µl 1 x Dye-Reagent (braun) + 10µl Probe (bzw. Standardverdünnung)

- auf Mikrotiterplatte geben
- Extinktion (OD₅₉₅) nach 5 - 60 min messen.

Ein Vorteil des Testes war die Möglichkeit, schon rein makroskopisch ein qualitatives Urteil über das Vorhandensein oder Fehlen von Protein in ausreichender Menge fällen zu können. Eine tiefblaue Färbung zeugte von großen Proteinmengen. Im Gegensatz dazu wurde das Fehlen von Protein durch das Auftreten einer braunen Färbung angezeigt.

4.4.4 SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Natriumdodecylsulfat ist ein Detergens, das in der Lage ist, Proteine zu denaturieren und zu entfalten. Durch die Denaturierung geht die enzymatische Aktivität der Enzyme verloren. Zusätzlich werden, durch Zusatz von Mercaptoethanol, Disulfidbrücken reduzierend gespalten. SDS-Gelelektrophorese ist eine schnelle Methode zur Molekülmassen-Abschätzung von Proteinen (Materialteil 3.1.12). Die Genauigkeit der Bestimmung der relativen Molekülmasse liegt dabei in der Regel bei $\pm 10\%$ (Knippers et al., 1990). Durch Verwendung eines Sammelgels kann zusätzlich noch eine Bandenschärfung erzielt werden (Laemmli UK, 1970). Kleine Proteine wandern schnell durch das Gel, während große weiter oben bleiben.

Nach Reinigung mit Isopropanol und Anbringen von Abstandshaltern (*spacer*), wurden zwei Glasplatten mit Klammern fest miteinander verbunden. Daraufhin wurde zuerst ein 12%iges Trenngel (Materialteil 3.3.1) bis 1cm unter den oberen Rand gegossen. War die Polymerisation des Trenngels beendet, wurde ein 4%iges Sammelgel (Materialteil 3.3.1) darüber gegossen. Im Sammelgel wurde anschließend der Kamm befestigt. Das Gel war nach 15 - 30 min auspolymerisiert.

Die Proben wurden vor dem Auftragen 5min bei 96°C gekocht und mit SDS *Gel loading buffer* (2x) (Materialteil 3.4.6) auf das Gel aufgetragen. Zur Molekülmassenabschätzung der Proteine wurde ein gefärbter SDS-Marker (SDS-PAGE Standards, Broad Range / Fa. BioRad) benutzt. Der Gellauf erfolgte 1 - 2 Stunden bei 80 Volt. Die Proteinbanden wurden, nach vollendetem Elektrophoreselauf, durch Silberfärbung (Abschnitt 4.4.5) sichtbar gemacht. Die genaue Zusammensetzung der Gele sind dem Materialteil 3.3.1 und die des Laufpuffers dem Materialteil 3.4.6 zu entnehmen.

4.4.5 Silberfärbung

Mit einer Silberfärbung ist, im Gegensatz zu einer Coomassie-Brilliant-Blue Färbung, ein Nachweis von 0.02µg eines Proteins möglich. Die Silberfärbung ist also weit sensitiver als die Färbung mit Coomassieblue. Im Rahmen dieser Promotion kam die *Silver Stain*[®] Methode der Firma BioRad zur Anwendung.

Verlaufschema:

- Gel für 30min in 100ml Fixativ 1 [Fixierer: 40% Methanol, 10% Essigsäure (v/v)] legen
- Gel für 5min in 50ml *Oxidizer* überführen
- Gel 15min wässern (Wasser 6 - 7 mal wechseln)
- Gel für 20min in 50ml *Silver Reagent* legen
- Gel 30sek wässern
- Gel maximal 5min im Entwickler (*Developer*) entwickeln
- Reaktion durch Überführung des Gels in Stop-Reagenz [5% Essigsäure (v/v)] stoppen
- Gel auf Whatmanpapier im Vakuumtrockner trocknen.

5 Ergebnisse

5.1 Vorstellung des Patientenkollektives

Die Basis aller folgenden Experimente war die Isolierung von *p_{bmc}* 's aus Blut von Patienten, die sich mit dem HI-Virus infiziert hatten. Der Ursprung der Patientenproben lag in einem kleinen, gut dokumentierten Patientenkollektiv, das in ausgesuchten Schwerpunktpraxen medizinisch behandelt bzw. therapiert worden war.

Die folgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über das Patientenkollektiv. Der Zeitpunkt der HIV-1-Infektion konnte nur ermittelt werden, wenn ein negativer HIV-Test vorangegangen war. Die mit römischen Ziffern gekennzeichneten Proben stellen dabei die Folgeproben dar (w = weiblich; m = männlich).

Patientenprobe	Datum (Proben-erhalt)	Subtyp	Infektionszeitpunkt	Infektionsmodus	Therapie	Bemerkungen
HR001 (w)	03/95	C	10/94	heterosexuell	nein	Partnerin von HR001-1
HR001-II	11/95				ja	
HR001-III	02/97				ja	
HR001-1 (m)	06/95	C	05/90	heterosexuell	nein	Partner von HR001 und HR001-1-1
HR001-1-II	10/97				ja	
HR001-1-1 (w)	12/95	C	02/93	heterosexuell	nein	Partnerin von HR001-1
HR002	04/95	B	11/94	homosexuell	nein	
HR002-II	11/95				nein	
HR003	06/95	B	01/95	homosexuell	nein	
HR004	06/95	E	02/95	heterosexuell	nein	
HR004-II	01/96				nein	
HR005	07/95	B	02/95	homosexuell	nein	
HR006	07/95	B	11/94		nein	
HR006-II	11/95				nein	
HR006-III	06/96				nein	
HR006-IV	02/97				nein	
HR006-V	09/97				ja	
HR006-VI	06/98				ja	
HR008	09/95	E	03/95	homosexuell	nein	
HR009	09/95	E	01/95	homosexuell	nein	
HR009-II	01/96				nein	
HR009-III	06/97				nein	
HR010	09/95	B	02/95	homosexuell	nein	
HR010-II	09/96				nein	
HR014	05/96	B	12/95	heterosexuell	nein	
HR014-II	12/96				nein	
HR014-III	02/98				ja	

Tab. 5. 1

5.2 Virusstockherstellung

5.2.1 Ergebnisse der Virusanzuchten

Zur Durchführung von Neutralisationsexperimenten war die Herstellung eines Virusstocks unabdingbar (Methoden 4.1.7). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die p24-Produktion und die RT-Werte der positiven Anzuchten zum Zeitpunkt der Virusaliquotierung. Die Bestimmung der Viruslast erfolgte durch die Arztpraxen (Praxisgemeinschaft Dr.Knechten / Dr.Habets in Aachen bzw. Praxis Dr.Jäger in München), die die Patientenproben zur Verfügung gestellt haben.

Virusstock	Subtyp	Phänotyp	Viruslast (Kopien / ml)	Therapie	Anzuchtdauer (d)	RT-Werte (cpm/ml/90min)	p24-Ag Produktion (ng/ml)
HR001	C	NSI	n. b.	-	28	15.6 x 10 ⁴	24.8
HR001-II	C	NSI	3.2 x 10 ³	+	79	15.8 x 10 ⁴	426.7
HR001-1-1	C	NSI	n. b.	-	43	14.2 x 10 ⁴	13.3
HR004	E	NSI	31.4 x 10 ³	-	62	11.9 x 10 ⁴	8.1
HR004-II	E	NSI	42.7 x 10 ³	-	62	17.9 x 10 ⁴	10.7
HR006	B	NSI	50.0 x 10 ³	-	27	14.7 x 10 ⁴	322.3
HR006-II	B	NSI	88.0 x 10 ³	-	26	28.5 x 10 ⁴	675.6
HR006-III	B	NSI	28.8 x 10 ³	-	26	17.8 x 10 ⁴	473.4
HR006-IV	B	NSI	14.0 x 10 ³	-	26	38.9 x 10 ⁴	123.2
HR009-III	E	NSI	24.5 x 10 ³	-	76	14.5 x 10 ⁴	15.1
HR010	B	SI	n. b.	-	24	19.1 x 10 ⁴	63.8
HR014	B	NSI	102.0 x 10 ³	-	26	12.0 x 10 ⁴	18.2
HR014-II	B	NSI	201.6 x 10 ³	-	29	12.6 x 10 ⁴	264.9

Tab. 5. 2

Legende: n. b. = nicht bestimmt

Da die zugeführten Zellen aus Lymphozyten und Makrophagen bestanden, d.h. Bestandteil einer Mischkultur waren, konnte in gewissen Grenzen die *in vivo* Situation nachempfunden werden.

Eine Selektion der Viren auf einem bestimmten Zelltyp wurde somit vermieden. Die Anzucht in einem Mischkultursystem erlaubt die Vermehrung des Virus mit einem umfassenden Quasispeziespektrum (von Briesen et al., 1990). Eine Anzucht auf nur einem Zelltyp würde eine Selektionierung bzw. Reduzierung auf den am besten angepaßten Virustyp (*surviving of the fittest*) bedeuten. Eventuell vorhandene Quasispezies gingen dabei verloren. Das daraus resultierende Virusspektrum wäre von vornherein eingeschränkt.

Am Beispiel der Isolate HR001-II und HR001-1-1 lässt sich aufzeigen, dass es bei ähnlichen Ergebnissen des RT-Testes zu grossen Diskrepanzen bei den Ergebnissen der p24-Ag-Bestimmung kommen kann. Gründe dafür liegen bei den unterschiedlichen Testverfahren. Der HIV-p24-Ag-ELISA erfasst als immunologischer Assay, neben defektiven und toten Viren, auch Virusbruchstücke. Im Gegensatz dazu werden vom RT-Test Virusbruchstücke und tote Viren nicht erfasst. Er gibt somit eine genauere Zustandsbeschreibung des Virusvermehrungsstatus, als der Antigen-Antikörper-Assay.

5.2.2 Bestimmung der Virustiter

Die Fähigkeit eines Virusstocks, Zellen zu infizieren, kann durch den TCID₅₀-Wert (*tissue culture infectious dose*) wiedergegeben werden. Die Durchführung der TCID₅₀-Bestimmung ist Kapitel 4.1.10 zu entnehmen. Die Ergebnisse wurden durch zwei unterschiedliche Verfahren ermittelt. Zum einen wurde die p24-Produktion der Überstände aus den unterschiedlichen Kulturvertiefungen mittels eines ELISA gemessen, zum anderen konnte über eine Ag-Ak-Reaktion immunocytochemisch der Nachweis einer erfolgten Infektion erbracht werden. In beiden Fällen kam es weniger auf die Quantität an. Eine einfache Ja-Nein-Aussage, ob eine Infektion in den Kulturen bei einer gegebenen Verdünnung stattgefunden hatte oder nicht, war für die Auswertung der Ergebnisse ausreichend.

Bei der Bestimmung des Virustiters wurde ein Verdünnungsfaktor von 4 gewählt. Weiterhin wurde der TCID₅₀ z.T. auf zwei unterschiedlichen Zellkultursystemen (Makrophagen /Lymphozyten) wiederholt getestet um deutlich zu machen, inwieweit der Virustiter von der Wahl des Zellsystems und der Spenderzellen abhängig ist.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der verschiedenen TCID₅₀-Bestimmungen auf. Das ursprüngliche Testvolumen belief sich dabei in allen Fällen auf 1ml Virusüberstand. Aufgrund des zur Verfügung stehenden Probenmaterials, wurde die TCID₅₀ Bestimmung nur mit solchen Isolaten durchgeführt, die später Bestandteil von Neutralisationsexperimenten sein würden.

Isolat	TCID ₅₀ (I.U./ml) Makrophagen (V1)	TCID ₅₀ (I.U./ml) Makrophagen (V1)	Faktor (a zu b)	Faktor (b zu c)	TCID ₅₀ (I.U./ml) Makrophagen (V2)	TCID ₅₀ (I.U./ml) Lymphozyten (V2)	Faktor (c zu d)
	Immuncyt. a	ELISA b			ELISA c	ELISA d	
	HR001	3155			790	3.75 >	
HR001-II	1580	500	3.2 >	< 26.2	13.099	40.770	< 3.1
HR001-1-1	n.d.	n.d.	-	-	80	64.309	< 803
HR006	3970	1990	2.0 >	> 6.3	317	8109	< 27
HR006-II	5000	3970	1.25 >	-	n.d.	n.d.	-
HR006-III	1580	998	1.6 >	-	n.d.	n.d.	-
HR006-IV	25.055	79.245	< 3.16	> 7.8	10.168	161.796	< 16
HR014	3155	6290	< 2.0	> 78.6	80	40.640	< 507
HR014-II	1255	400	3.14 >	> 1.3	315	26.240	< 83

Tab. 5. 3

Legende:

- V1 = Versuch 1
- V2 = Versuch 2
- > = Wert a größer Wert b bzw. Wert b größer Wert c
- < = Wert b größer Wert a, Wert c größer Wert b bzw. Wert d größer Wert c
- n.d. = nicht durchgeführt

Die aufgeführten Daten sind Teile zweier getrennter Versuche (V1 und V2). Bei V1 wurde der Virustiter auf Makrophagen, mit zwei unterschiedlichen Methoden ermittelt (Immuncytochemie, ELISA). Der Versuch V2 wurde ausschließlich mittels ELISA ausgewertet. Er zeichnete sich jedoch durch die Wahl zweier unterschiedlicher Kultursysteme (Makrophagen, Lymphozyten) aus. Beide Zelltypen stammten dabei vom gleichen Spender.

Die TCID₅₀-Werte, die der Tabelle 5.3 zu entnehmen sind, zeigen deutlich, dass die TCID₅₀-Bestimmung von verschiedenen Einflüssen abhängig ist. Man kann erkennen, dass bei den vorliegenden Viren die Infektionsrate auf Lymphozyten größer ist, als die auf Makrophagen. Lymphozyten lassen sich, bei gleichem Spender, um einen Faktor von 4 bis 803 besser infizieren, als Makrophagen (Faktor c zu d).

Weiterhin wird klar, dass die Spenderabhängigkeit bei einer Infektion von großer Bedeutung ist. Dieser Sachverhalt wird durch den Faktor b zu c verdeutlicht. Bei gleicher Methodik (ELISA), auf gleichem Spenderzelltyp (Makrophagen), die unterschiedlichen Ursprungs sind (verschiedene Spender), zeigt sich ein differierendes Infektionsverhalten. Die Variationsbreite des Faktors b zu c liegt dabei zwischen 1.3 und 78.6. Auffällig ist, dass die Subtyp C-Isolate (HR001, HR001-1-1) zur Infektion, die Spendermakrophagen aus Versuch 2 bevorzugen. Die Subtyp B-Isolate HR006 und HR014 hingegen zeigen einen höheren TCID₅₀-Wert auf den Spendermakrophagen des 1. Versuches. Die Art der Auswertung, spielt bei der oben angeführten TCID₅₀-Bestimmung nur eine untergeordnete Rolle. Die ELISA (Methoden 4.1.8.1) und die immunzytochemische Ergebniserfassung (Methoden 4.1.8.3) unterscheiden sich in ihren TCID₅₀-Werten maximal um Faktor 4, sie gleichen sich jedoch in ihrer Tendenz.

5.3 Virusabwehrmechanismen der humoralen Immunantwort

5.3.1 Antikörpergewinnung aus dem Virusisolat HR006 und einer Folgeprobe

Die Isolierung von Antikörpern aus Patientenserum diente als Vorversuch für die folgenden Neutralisationsexperimente. Denn es galt herauszufinden, inwieweit isolierte Immunglobuline von Primärisolaten und deren Bruchstücke in der Lage sind, autologe oder heterologe Viren zu neutralisieren. Weiterhin wurde eine Proteinmengenbestimmung durchgeführt (Bio Rad Protein Assay; Methoden 4.4.3).

Die Ergebnisse der Proteinbestimmung sind der untenstehenden Tabelle zu entnehmen.

Fraktion	Proteingehalt (mg/ml) HR006	Proteingehalt (mg/ml) HR006-IV
1	0.71	0.63
2	0.71	1.14
3	0.55	0.82
4	0.32	0.51
5	0.25	0.32

Tab. 5. 4

Die Proteinausbeute zeigte sich bei den Fraktionen 1-3 am größten. Bei beiden Isolaten (Ursprungs- und Folgeprobe) liegt die Ausbeute in ähnlichen Bereichen. Für die anschließende Spaltung der Immunglobuline in ihre Fab-Fragmente nach Escribano 1979, wurden die Fraktionen Nr. 2 eingesetzt. Um überschüssige Fc-Bruchstücke zu entfernen, wurden die Fab-Fragmente im Anschluss an die Spaltung ein zweites mal mit Hilfe der Sepharose G Säule eluiert. Da Fc-Bruchstücke an das Säulenmaterial binden beinhaltet das resultierende Eluat ausschließlich Fab-Fragmente.

Zur Größen- und Mengenabschätzung der erhaltenen Immunglobuline und ihrer Fragmente wurde eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine auf einem Polyacrylamidgel durchgeführt (SDS-PAGE, Methoden 4.4.4). Die aufgereinigten Fab-Fragmente waren im ELISA negativ.

Serumprotein-Bestandteile, Immunglobulin- und Fab-Fragment-Fractionen des Isolates HR006

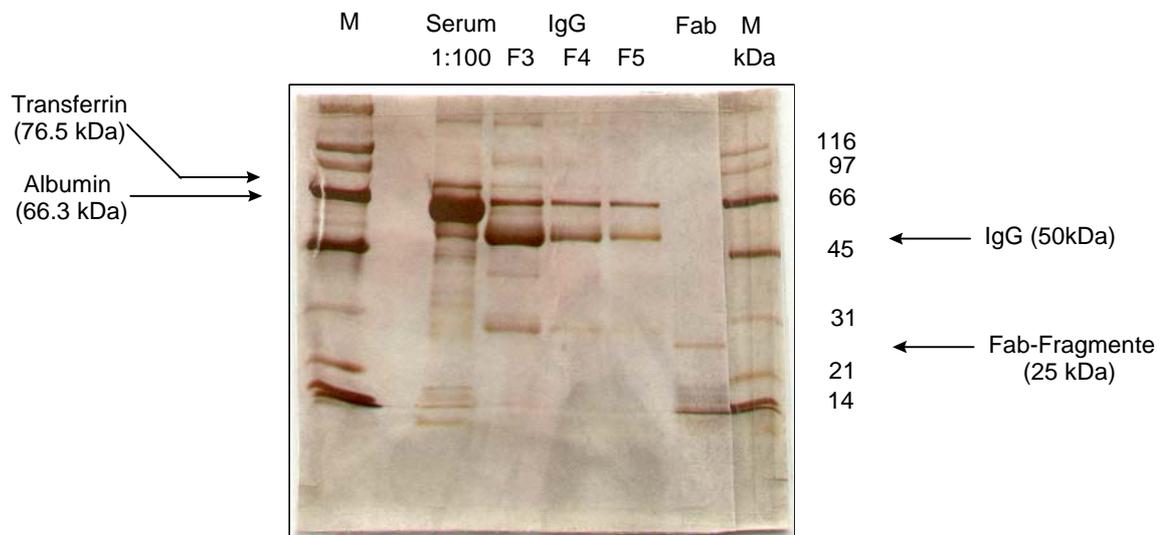


Abb. 5. 1

Abbildung 5.1 zeigt neben dem Marker das Patientenserum von HR006 in einer Verdünnung von 1:100, die Immunglobulin-Fractionen F3-F5 und die isolierten Fab-Fragmente der Fraktion Nr.2. Da aus der Elution durch die Sepharosesäule mehrere Fraktionen erhalten wurden, wurde mit Hilfe des Proteingels nicht nur die Reinheit der gewonnenen Substanzen, sondern auch deren Mengen im Verhältnis zueinander abgeschätzt. Auf dem Proteingel wird deutlich, dass die erste Fraktion (F3) den höchsten Anteil an Immunglobulin G besitzt.

Auch zeigte sich, dass die Ausbeute der Fab-Fragmente weit unter der, der ursprünglichen Immunglobuline lag. Durch die Spaltung mit Papain kam es somit zu einem Massenverlust. Außerdem sind bei dem verdünnten Patientenserum, neben der Immunglobulinfraktion, noch Fraktionen der Transportproteine Albumin und Transferrin zu erkennen.

Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass für die folgenden Neutralisationsversuche im Falle der Immunglobuline bei dem Isolat HR006 die Fraktion 1 (0.71mg/ml) und bei dem Folge-Isolat HR006-IV die Fraktion 3 (0.82 mg/ml) zum Einsatz kamen. Bei den Fab-Fragmenten wurden, nach Aufreinigung, bei dem Isolat HR006 die Fraktion mit einem Proteingehalt von 0.37mg/ml und bei dem Isolat HR006-IV die Fraktion mit einem Proteingehalt von 0.48mg /ml zu Neutralisationsversuchen eingesetzt. In beiden Fällen wurde besonders darauf geachtet, nahezu identische Immunglobulin- bzw. Fab-Fragment Mengen für nachfolgende Experimente zu verwenden.

5.3.2 Veränderungen der V3-AK-Menge im Verlauf der Krankheitsprogression

Anhand der Serumantikörpertitration ist es möglich die Menge der Serumantikörper mit Hilfe eines gegebenen Antigens (V3-P1-Peptid) zu bestimmen. Bei diesem Experiment wurden die Seren des Patienten HR006 zu unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten im ELISA (V3-P1-Peptid-ELISA) getestet. Weiterhin wurden die autologen Immunglobuline der Isolate HR006 und HR006-IV mit in den Assay einbezogen. Es wurden Verdünnungen von 1:100 bis 1:500.000 eingesetzt.

Isolat	Entnahmezeitpunkt		Letzte positive Verdünnung	Therapie
HR006	Juli	95´	1:10.000	nein
HR006-II	Novemberr	95´	1:100.000	nein
HR006-III	Juni	96´	1:100.000	nein
HR006-IV	Februar	97´	1:100.000	nein
HR006-V	September	97´	1:100.000	ja
HR006-VI	Juni	98´	1:50.000	ja
IgG HR006			1:10.000	
IgG HR006-IV			1:15.000	

Tab. 5. 5

Dieser Versuch zeigt, dass die V3-Antikörper sich im Verlauf der Krankheitsprogression verändern. Zu Beginn der Infektion liegt noch ein geringer Antikörpertiter vor, der jedoch im Krankheitsverlauf deutlich zunimmt.

5.3.3 Rolle der V3-Antikörper bei der Neutralisation auf Makrophagen

Basis dieses Versuchs war die Annahme, dass Serumantikörper in der Lage sind, außerhalb der Zelle an das HI-Virus zu binden und dieses am Eintritt in die CD4⁺-Zelle zu hindern. Diese Neutralisationsreaktion ist durch eine verminderte p24-Produktion messbar. Würde man nun ein, dem V3-loop des gp120 komplementäres Peptid mit den Serumantikörpern eines infizierten Patienten vorinkubieren, so könnten diese an das Peptid binden. Die V3-Antikörper im Serum würden somit "abgefangen" und die Bindung an das Virus würde vermindert. Als Resultat würde keine oder reduzierte Neutralisation stattfinden.

Das verwendete V3-P1-Peptid (Subtyp B, cyclisch, Konz. 1mg/ml) wurde mit den Verdünnungen 1400ng/ml, 700ng/ml und 140ng/ml getestet. Für die Neutralisation ohne Peptid wurden dieselben Verdünnungsstufen gewählt.

Weiterhin zeigte ein Vergleich der V3-Sequenzen des P1-Peptides und des Isolates HR014 nur geringe Unterschiede (siehe unten). Somit wurde deutlich, dass die Serumantikörper in gleichem Maß an das P1-Peptid binden können, wie an das getestete Isolat HR014.

V3-Sequenz P1-Peptid: CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYYTTGE

V3-Sequenz HR014: CTRPHNNNTRKSIPMGPGRAFYYTTGE

Die Serumendkonzentration pro Vertiefung (200µl) betrug während des Versuches 10%. Dies galt auch für den Versuchsteil mit der Peptid-Vorinkubation. Die Peptid-Endkonzentrationen in den Vertiefungen beliefen sich auf 120ng/ml, 60ng/ml oder 13ng/ml.

Parallel zur p24-Bestimmung mittels ELISA (Fa. Coulter; Methoden 4.1.8.1) wurde ein Standard der Firma mitgetestet, um eine Standardkurve erstellen zu können. Mit Hilfe dieser Standardkurve war es möglich, die erhaltenen Extinktionen der Virusüberstände nach erfolgter Neutralisation in Relation zum Standard zu setzen.

Die gemessenen Extinktionen konnten somit näherungsweise in p24-Konzentrationen umgerechnet werden. Indem der Wert, der in Gegenwart des Negativserums ermittelt wurde, gleich 100% gesetzt wurde (keine Neutralisation, keine Reduktion der p24-Produktion), war es möglich, den Neutralisationseffekt in Prozent zu bestimmen (Berechnung siehe Methoden 4.1.11).

Einen Neutralisationseffekt von z.B. 90% entspricht dem Wert der reziproken Serum-verdünnung, bei der 90% der Viren neutralisiert worden sind.

Tabelle 5.6 gibt die Mittelwerte der p24 Antigenproduktion von mindestens 3, meist 5 Kulturen auf Makrophagen zweier unterschiedlicher Spender (inkl. Standardabweichung), sowie den daraus ermittelten Neutralisationseffekt (N) *mit* und *ohne* P1-Peptidvorinkubation wieder. Die in Tabelle 5.6 beschriebenen Neutralisationseffekte werden gleichermaßen in der Abb. 5.2 graphisch umgesetzt.

Primäres Isolat [10% pos. Serum]	Peptidstatus [ng/ml]	p24 Ag-Menge [pg/ml]	N [%]	p24 Ag-Menge [pg/ml]	N [%]
		[Spender 1]	[Spender 1]	[Spender 2]	[Spender 2]
HR014	<i>ohne</i> Peptid	4.81 (± 0.72)	92	4.82 (±0.96)	99
HR014	1400	4.80 (± 0.24)	99	1.91 (±0.25)	99
HR014	700	4.26 (±0.32)	98	1.91 (±0.19)	99
HR014	140	4.26 (±0.53)	98	1.11 (±0.22)	99

Tab. 5. 6

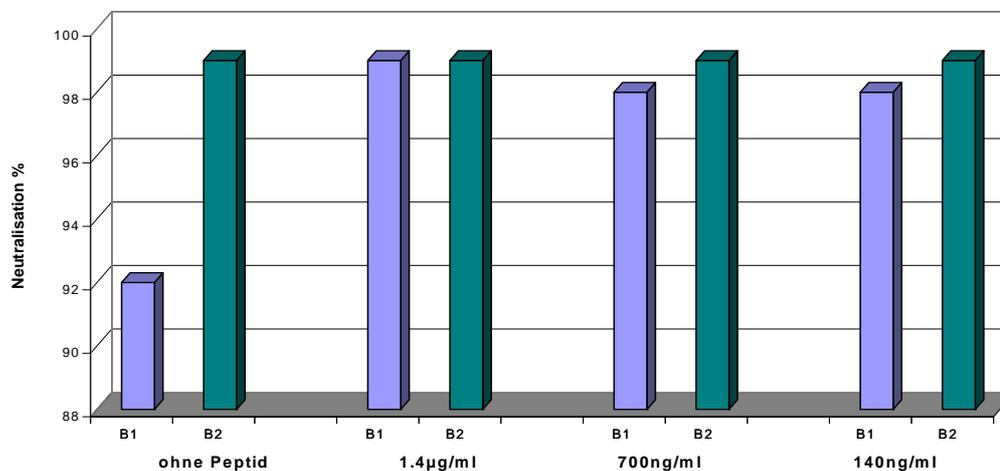


Abb. 5. 2

Wie Tabelle 5.6 und Abbildung 5.2 zu entnehmen ist, zeigen sich keinerlei Unterschiede in der Neutralisation in An-oder Abwesenheit des P1-Peptides. Bei allen getesteten Peptid-konzentrationen kam es zu einem fast 100%igen Neutralisationseffekt der Viren durch die autologen Antikörper des Patienten. Dieses Phänomen war auch bei unterschiedlichen Spendermakrophagen zu beobachten.

Um auszuschließen, dass die eingesetzten Peptidkonzentrationen zu gering waren, wurde der Versuch mit dem gleichen Isolat, aber mit Peptidkonzentrationen bis zu 4700ng/ml, wiederholt. Diese Konzentration entspricht ungefähr der, der im V3-Peptid-ELISA eingesetzten Peptidmenge (5µg/ml). Letztendlich wurden die Serumantikörper in einer Vorverdünnung 1:50, 1:100 und 1:500 verdünnt, um sicher zu gehen, dass die Peptidkonzentration im Verhältnis zur Antikörpermenge ausreichend war, um ggf. eine Neutralisation zu verhindern.

Es wurden folgenden Neutralisationseffekte (N) ermittelt:

Primäres Isolat [10% pos. Serum]	Peptidstatus [ng/ml]	Serum-Endverdünnung [%]	p24 Ag-Menge [pg/ml]	N [%]
HR014	<i>ohne</i> Peptid	10	4.82 (±0.96)	99 (B2)
HR014	<i>ohne</i> Peptid	0.2	34.68 (±2.89)	94
HR014	<i>ohne</i> Peptid	0.1	164.83 (±51.95)	75
HR014	<i>ohne</i> Peptid	0.02	378.18 (±43.95)	45
HR014	1400	10	12.71 (±0.76)	93
HR014	1400	0.2	12.71 (±1.27)	93
HR014	1400	0.1	58.75 (±7.93)	73
HR014	1400	0.02	89.45 (±10.73)	59
HR014	4700	10	12.71 (±1.27)	94
HR014	4700	0.2	21.92 (±7.39)	90
HR014	4700	0.1	61.82 (±34.74)	76
HR014	4700	0.02	46.47 (±24.39)	81

Tab. 5. 7

Wie man den oben stehenden Ergebnissen entnehmen kann, wurden auch in diesem Zusatzexperiment keinerlei Veränderung der Neutralisationsaktivität, im Vergleich zum Vorversuch erzielt. Die Abnahme des Neutralisationstiters, die mit der Serumverdünnung zu verzeichnen ist, entspricht der Neutralisation *ohne* Peptid-Vorinkubation (hier am Beispiel des Buffy's B2 aus dem Ursprungsversuch). Somit hat eine Vorinkubation des autologen Patientenserums mit dem P1-Peptid in den getesteten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Neutralisation durch Serumantikörper.

5.3.4 Neutralisationseffekt von HR006 und einer späten Folgeprobe mit autologen Seren

Bei diesem Experiment wurden zwei Makrophagenkulturen des gleichen Spenders hergestellt. Die eine Kultur wurde mit dem Isolat HR006 infiziert, die andere mit dem Virus eines späten Folgeisolates (HR006-IV). Zuvor wurde jedoch, durch Vorinkubation der Viren mit unterschiedlichen autologen Seren, eine Neutralisationsreaktion durchgeführt (Methoden 4.1.12). Bei den zum Einsatz kommenden Seren handelte es sich um Serumproben des gleichen Patienten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden waren.

Es wurden pro Isolat (HR006 bzw. HR006-IV) 42 Kulturüberstände zur Bestimmung der Extinktion entnommen (6 seronegative Kulturen/jeweils 6 seropositive Kulturen mit autologen Ursprungs- oder Folgeseren). Der Neutralisationseffekt wurde daraufhin aus dem Mittelwert von jeweils 6 Kulturüberständen ermittelt.

Im Rahmen dieses Versuches soll geklärt werden inwieweit bzw. zu welchem Zeitpunkt der Infektion, Serumantikörper in der Lage sind, eine Neutralisation hervorzurufen.

Folgende Neutralisationseffekte ließen sich aus den Mittelwerten der p24 Antigenproduktion der einzelnen Kulturen auf Makrophagen ermitteln. Die Standardabweichungen sind in Klammern angegeben.

Primäre Isolate [Virus]	Primäre Isolate [Serum]	p24 Ag-Menge [pg/ml]	N [%]
HR006	<i>HR006 (autolog)</i>	11.05 (± 3.56)	96
HR006	HR006-II	3.67 (± 0.22)	98
HR006	HR006-III	3.67 (± 0.37)	98
HR006	HR006-IV	1.83 (± 0.14)	99
HR006	HR006-V	1.84 (± 0.18)	98
HR006	HR006-VI	9.20 (± 1.04)	97
HR006-IV	HR006	372.31 (± 25.43)	72
HR006-IV	HR006-II	206.42 (± 24.59)	85
HR006-IV	HR006-III	36.85 (± 10.09)	97
HR006-IV	<i>HR006-IV (autolog)</i>	14.73 (± 6.69)	99
HR006-IV	HR006-V	3.67 (± 1.54)	99
HR006-IV	HR006-VI	3.68 (± 0.44)	99

Tab. 5. 8

Wie aus Tabelle 5.8 ersichtlich, sind jeweils die nachfolgenden Serumantikörper in der Lage, Viren eines früheren Zeitpunktes zu fast 100% zu neutralisieren. Die Seren, deren Entnahmekzeitpunkt vor dem der Viruskultur lag, konnten dies nur mit einem geringeren Prozentsatz. Fettgedruckte Neutralisationsergebnisse kennzeichnen jeweils das Serum, das der Probe entspricht, aus der das Virus isoliert und in Kultur vermehrt worden ist.

5.3.5 Infektions- und Neutralisationsverhalten der Isolate HR006 und HR006-IV

Sinn und Zweck des folgenden Experimentes war die Bestimmung der Neutralisationsaktivität von Ursprungs- und Folgeseren. Hierbei stellte sich vor allem die Frage, ob auch aus autologem Serum extrahierte Antikörper (IgG) und deren Spaltprodukte (Fab-Fragmente) fähig sind, eine Neutralisationsreaktion herbeizuführen. Auch war zu klären, ob sich das Neutralisationsverhalten im Verlauf der Krankheitsprogression auf unterschiedlichen Zellkultursystemen verändern würde.

Eine besondere Rolle spielte dabei die Spenderabhängigkeit. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene Spenderbuffy's getestet. Von beiden wurden jeweils Lymphozyten und Makrophagen isoliert.

5.3.5.1 Bestimmung der Infektions- und Neutralisationskapazität auf Makrophagen

Zwei Kriterien sind bei der Beurteilung der folgenden Neutralisationsergebnisse mit autologen Serumantikörpern zu berücksichtigen. Zum einen besteht eine große Spenderzellabhängigkeit, zum anderen handelt es sich um zwei völlig unterschiedliche Kultursysteme. Makrophagen sind, einmal auf die Mikrotiterplatte aufgebracht, nicht mehr zur Teilung fähig. Im Gegensatz dazu teilen sich Lymphozyten permanent. Außerdem ist zu beachten, dass beide Kultursysteme ein unterschiedliches Maß der Infektion aufzeigen.

Die ermittelten p24 Ag-Produktionen (inkl. Standardabweichungen), die aus den Mittelwerten der gemessenen Extinktionen der unterschiedlichen Kulturen berechnet wurden sowie die daraus resultierende Neutralisationsaktivitäten (N) auf Makrophagen können der folgenden Tabelle entnommen werden. Die Verdünnungen von 1:3 mit Kulturmedium wurden bereits berücksichtigt.

Primäre Isolate	Spender [B1 oder B2]	Mittelwert Extinktion [OD]	p24 Ag-Menge [pg/ml]	N [%]
HR006 <i>neg.</i> S.	1	0.23	42.68 (±20.41)	0
HR006 <i>pos.</i> S.	1	0.01	2.65 (±0.53)	96
HR006 <i>neg.</i> S.	2	0.15	30.34 (±10.11)	0
HR006 <i>pos.</i> S.	2	0.02	4.16 (±0.62)	82
HR006-IV <i>neg.</i> S.	1	1.12	204.60 (±74.90)	0
HR006-IV <i>pos.</i> S.	1	0.01	2.65 (±0.27)	99
HR006-IV <i>neg.</i> S.	2	1.54	281.01 (±42.88)	0
HR006-IV <i>pos.</i> S.	2	0.01	2.65 (±0.27)	99

Tab. 5. 9

Die folgende graphische Darstellung verdeutlicht die Ergebnisse (die einzelnen Balken stellen hierbei die Mittelwerte der 6 Kulturvertiefungen dar).

Infektion (negativ Serum) und p24-Reduktion (positiv Serum)
auf Makrophagen

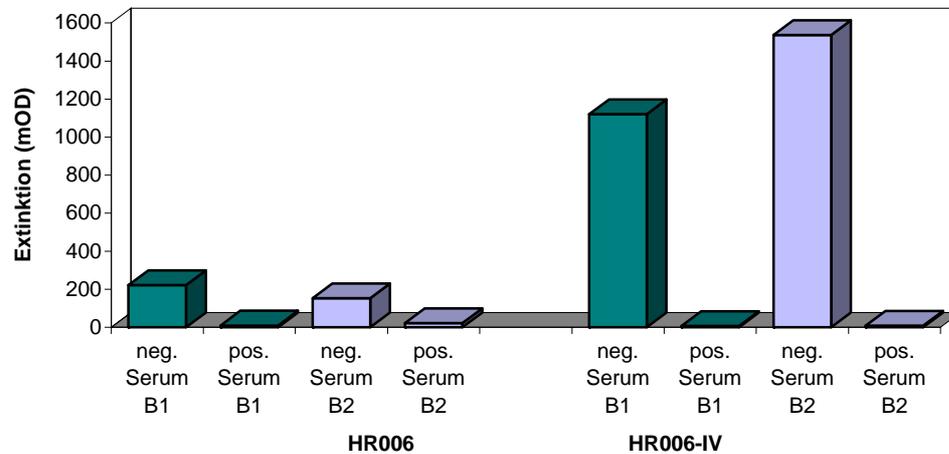


Abb. 5. 3

5.3.5.2 Bestimmung der Infektions- und Neutralisationskapazität auf Lymphozyten

Entsprechend dem Experiment mit Makrophagen, können die ermittelten p24 Ag-Produktionen (inkl. Standardabweichungen), die aus den Mittelwerten der gemessenen Extinktionen der unterschiedlichen Kulturen berechnet wurden sowie die daraus resultierende Neutralisationsaktivitäten (N) auf Lymphozyten der folgenden Tabelle entnommen werden.

Bei der Berechnung der p24 Ag-Produktion wurden die Verdünnungen von 1:2000 bzw. 1:40 mit Kulturmedium berücksichtigt. Weiterhin ist zu beachten, dass die p24 Ag-Produktion zum Teil in 'ng' und zum Teil in 'pg' angegeben wurde.

Primäre Isolate	Spender [B1 oder B2]	Mittelwert Extinktion [OD]	p24 Ag-Menge [ml]	N [%]
HR006 neg. S.	1	3342	706.94 ng (± 128.20)	0
HR006 pos. S.	1	4489	949.57 ng (± 98.88)	-34
HR006 neg. S.	2	15.96	3310 pg (± 340.95)	0
HR006 pos. S.	2	16.44	3411 pg (± 581.16)	-3
HR006-IV neg. S.	1	3820	808.06 ng (± 123.79)	0
HR006-IV pos. S.	1	3246	686.70 ng (± 132.53)	15
HR006-IV neg. S.	2	12.3	2511 pg (± 170.87)	0
HR006-IV pos. S.	2	6.53	1343 pg (± 209.37)	47

Tab. 5. 10

Abbildung 5.4 stellt die Ergebnisse, die in Tabelle 5.10 ersichtlich wurden graphisch dar. Um die Werte der Tabelle 5.10 sinnvoll darstellen zu können, wurden bei der Erstellung der Graphik die einzelnen Verdünnungen nicht berücksichtigt.

*Infektion (negativ Serum) und p24-Reduktion (positiv Serum)
auf Lymphozyten*

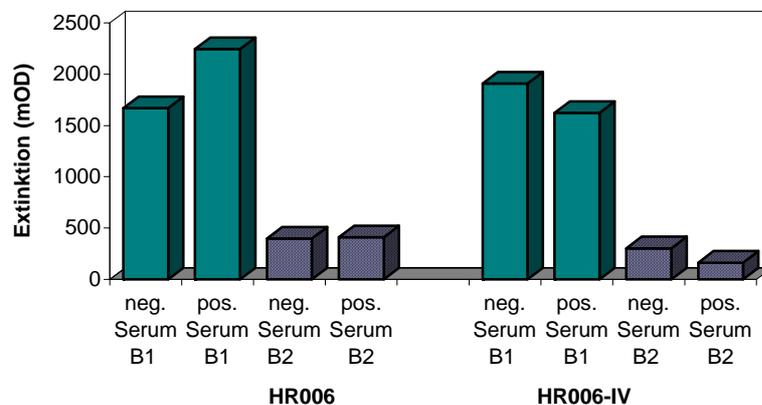


Abb. 5.4

Die auf Abbildung 5.4 dargestellten Infektionsextinktionen der Lymphozyten wurden in größeren Verdünnungen ermittelt als die der Makrophagen. Im Falle der Makrophagen führte bereits eine Verdünnung der Kulturüberstände von 3:1 mit Medium zu einem Extinktionswert, der sich im Meßbereich befindet. Dagegen mussten die Überstände der Lymphozyten auf 1:40 bis 1:2000 mit Medium verdünnt werden, um aus dem *overflow*-Bereich der Messung zu kommen. Dies bedeutet, dass die Infektion der Lymphozyten weit aus erfolgreicher verlief als die der Makrophagen auf Abbildung 5.3.

5.3.6 Neutralisationaktivität von autologen Seren der Isolate HR006 und HR006-IV

Die folgenden Neutralisationsversuche von autologen Serumantikörpern, isolierten IgG's und deren Fab-Fragmenten wurden mit denselben Spenderzellen (Buffy B1, Buffy B2) durchgeführt.

Der Neutralisationseffekt des Isolates HR006 und seiner späten Folgeprobe HR006-IV auf Lymphozyten und Makrophagen lässt sich den Tabellen 5.9 und 5.10 entnehmen. In beiden Tabellen ist auch die p24-Antigenproduktion (inkl. Standardabweichung) beschrieben worden.

Zur Veranschaulichung wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die einzelnen Balken entsprechen jeweils dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen aus 6 Kulturüberständen bzw. der daraus resultierenden Berechnung der Neutralisation.

Neutralisationsaktivität von autologem Serum gegen HR006 vs HR006-IV
auf Lymphozyten und auf Makrophagen

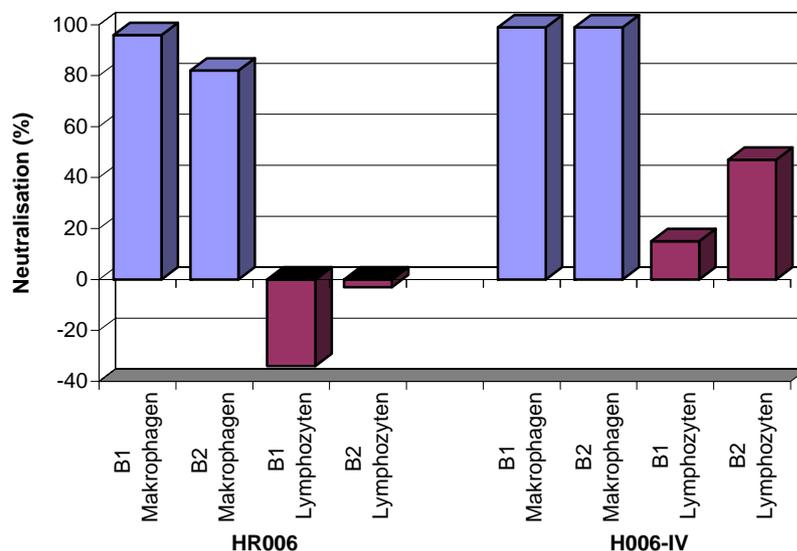


Abb. 5.5

Wie in Abbildung 5.5 zu sehen ist, zeigen Ursprungs- und Folgeprobe gleichermaßen eine hohe Neutralisationsaktivität auf Makrophagen. Dieses Verhalten ist bei zwei unterschiedlichen Spendern zu beobachten. Im Gegensatz dazu, findet auf Lymphozyten keine Neutralisation der Viren durch autologes Serum statt. Obwohl nur Reduktionen von >50% als über das Maß biologischer Schwankungen hinausgehende tatsächliche Neutralisationseffekte zu sehen sind, so zeigte das Isolat HR006-IV auf Lymphozyten (Spender B2) eine Neutralisationsaktivität von 47%. Berücksichtigt man dabei die Standardabweichung der p24 Ag-Produktion von $\pm 15\%$ (HR006-IV pos. Serum auf Lymphozyten (B2)), so liegt der Wert der Neutralisation von 47% in einem Bereich der experimentellen Schwankung, die erlaubt das Ergebnis als Neutralisationseffekt zu bewerten. Bei dem Spender B1 auf Lymphozyten fällt sie jedoch unter den als positiv zu beurteilenden Wert.

5.3.7 Funktionsklärung autologer Immunglobuline bei der Neutralisation

Die Ergebnisse der Experimente mit autologen Immunglobulinen in Bezug auf ihr Neutralisationsvermögen werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst (beachte: die Werte werden zum Teil in 'pg', zum Teil in 'ng' angegeben).

Primäre Isolate [10% IgG]	Kultursystem	Spender [B1 oder B2]	p24 Ag-Menge [ml]	N [%]
HR006	Makrophagen	1	6.29 pg (± 1.89)	85
HR006	Makrophagen	2	10.20 pg (± 3.06)	61
HR006	Lymphozyten	1	465.79 ng (± 53.04)	34
HR006	Lymphozyten	2	4287 pg (± 725.72)	-30
HR006-IV	Makrophagen	1	88.34 pg (± 37.03)	61
HR006-IV	Makrophagen	2	84.52 pg (± 22.42)	73
HR006-IV	Lymphozyten	1	457.26 ng (± 109.71)	43
HR006-IV	Lymphozyten	2	1437 pg (± 236.34)	43

Tab. 5. 11

Die Neutralisationseffekte der Ergebnisse der Tabelle 5.11 werden in folgender Abbildung veranschaulicht.

Neutralisationsaktivität von autologen IgG's gegen HR006 vs HR006-IV
auf Lymphozyten und auf Makrophagen

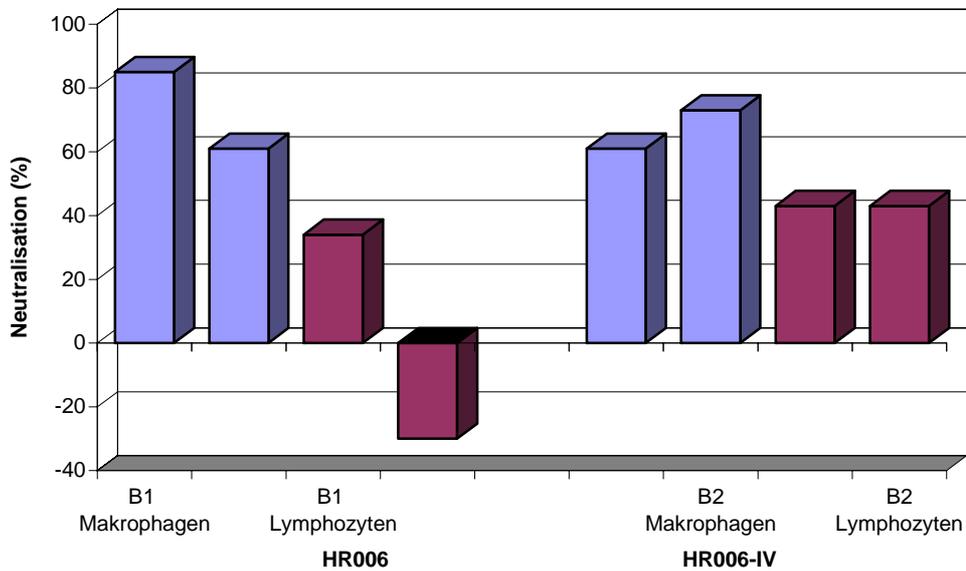


Abb. 5. 6

Abbildung 5.6 verdeutlicht, dass auch aus dem Patienten isolierte Immunglobuline in der Lage sind, eine Neutralisationsreaktion hervorzurufen. Auch hier zeigten die Makrophagen deutlich positive Werte.

Setzt man die Neutralisationsaktivität in Relation zur eingesetzten Menge an Immunglobulinen, so kann man die Menge an IgG's bestimmen, bei der eine 50% Neutralisation möglich ist. Bei den Neutralisationsversuchen wurden beim Isolat HR006 0.71 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufgereinigte IgG's eingesetzt. Beim Isolat HR006-IV wurden 0.82 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ für die Versuche verwendet. Daraus resultiert, dass bereits eine Konzentration von 0.42 μg bis 0.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ IgG eine halbmaximale Neutralisation hervorrufen kann.

Bei den Spenderlymphozyten der Ursprungsprobe (HR006) in Anwesenheit autologer IgG's konnte kein Neutralisationseffekt festgestellt werden. Der Wert von 34% bei den Spender-B1-Lymphozyten liegt noch unter dem als üblichen Maß biologischer Schwankung festgelegten Schwellenwert von 50% Reduktion.

Bei dem Folgeisolat (HR006-IV) ist dagegen bereits die Tendenz zu erkennen, dass auch auf Lymphozyten eine Neutralisationsreaktion hervorgerufen werden kann. Beide Werte auf unterschiedlichen Spendern liegen knapp unterhalb von 50%. Berücksichtigt man die biologische Schwankung, die über die Berechnung der Standardabweichung festgelegt werden kann, so ist auch im Falle der Neutralisation mit IgG's auf Lymphozyten ein Neutralisationseffekt festzustellen.

Bemerkenswert ist, dass die Bindung der Antikörper im V3-Peptid-ELISA beim Folgeisolat (HR006-IV) um den Faktor 10 höher liegt als beim Ursprungsisolat (Abschnitt 5.3.2/Tabelle 5.5). Offensichtlich findet eine Art "Sättigung" statt. Folglich, würde auch aus einer Verringerung der Serumkonzentration eine 100%ige Neutralisation resultieren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Neutralisationsverhalten isolierter Immunglobuline (IgG's) auf Makrophagen, in der Tendenz der Neutralisationsaktivität mit autologen Serumantikörpern entspricht.

5.3.8 Neutralisationsmöglichkeiten autologer Fab-Fragmente

Die Ergebnisse zur Feststellung der Neutralisationseffektivität autologer Fab-Fragmente können folgender Tabelle entnommen werden (beachte: die Werte werden zum Teil in 'pg', zum Teil in 'ng' angegeben).

Primäre Isolate [10% Fab-Fragmente]	Kultursystem	Spender [B1 oder B2]	p24 Ag-Menge [μl]	N [%]
HR006	Makrophagen	1	17.21 pg (±8.41)	77
HR006	Makrophagen	2	52.49 pg (±16.96)	-119
HR006	Lymphozyten	1	669.71 ng (±95.00)	5
HR006	Lymphozyten	2	3002 pg (±329.43)	9
HR006-IV	Makrophagen	1	204.60 pg (±58.82)	1
HR006-IV	Makrophagen	2	261.00 pg (±129.95)	7
HR006-IV	Lymphozyten	1	467.41 ng (±99.42)	42
HR006-IV	Lymphozyten	2	1854 pg (±457.31)	26

Tab. 5. 12

Veranschaulicht werden die Ergebnisse auf folgender Darstellung:

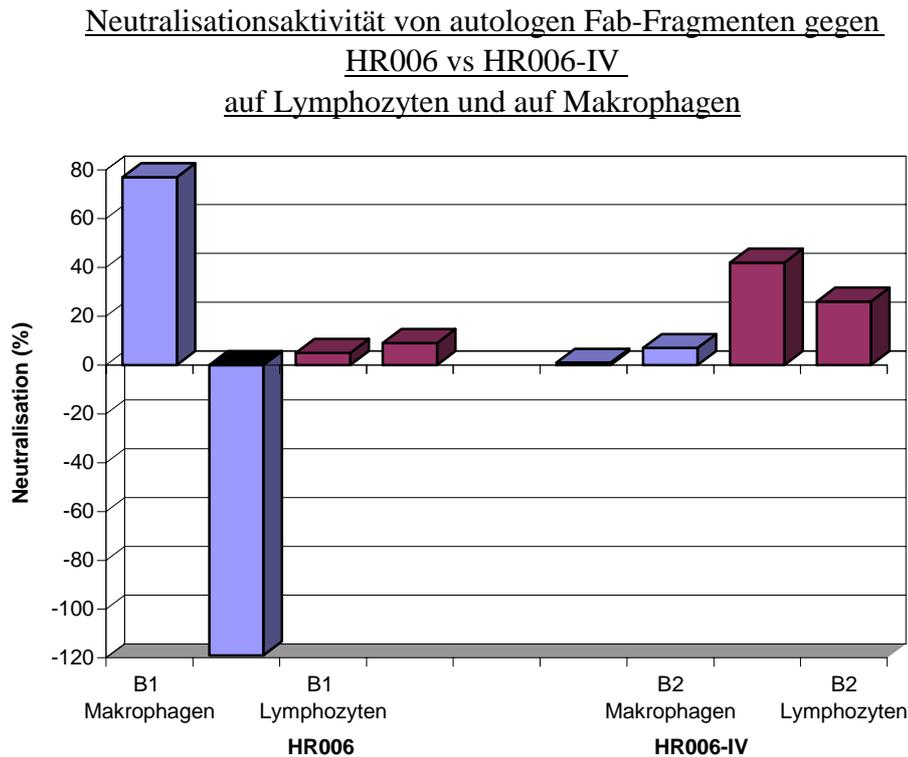


Abb. 5.7

Abbildung 5.7 zeigt, dass Neutralisationsversuche mit Fab-Fragmenten in diesem Rahmen kein eindeutiges Bild aufweisen. Bei der Ursprungsprobe (HR006) waren die Fab-Fragmente auf den Spendermakrophagen von B1 mit 77% durchaus in der Lage, Viren zu neutralisieren. Setzt man das Ergebnis, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, in Relation mit der Einsatzmenge der Fab-Fragmente ($0.37\mu\text{g}/\mu\text{l}$), so ergibt sich bei einer Konzentration von $0.24\mu\text{g}$ eine halbmaximale Neutralisation.

Im Gegensatz dazu zeigten sie bei den Makrophagen des Spenders B2 keinerlei Neutralisationsaktivität. Auch bei dem Makrophagenexperiment mit der Folgeprobe (HR006-IV) war keine Neutralisation zu beobachten.

Die Lymphozytenexperimente wiesen bei der Ursprungsprobe keine Neutralisationsaktivität auf. Allerdings konnte bei der Reaktion mit den Spenderlymphozyten B1 und den Viren der Folgeprobe HR006-IV eine geringe Aktivität von 42% ermittelt werden. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung, die in diesem Fall bei 21% lag kann auch hier von einem geringen Neutralisationseffekt gesprochen werden.

5.3.9 Bestimmung der Kreuzneutralisationsaktivität auf Makrophagen

Im Rahmen dieses Experimentes sollte geklärt werden, ob auch heterologe Seren, d.h. Seren unterschiedlicher Patienten, in der Lage sind, primäre Virusisolate zu neutralisieren. Zur Lösung der Fragestellung wurden in mehreren Experimenten unterschiedliche Spender-Makrophagen auf Mikrotiterplatten verteilt. Nach 8 Tagen erfolgte die Infektion. Um einen direkten Vergleich zur Neutralisationsaktivität innerhalb des Patienten (zum Zeitpunkt der Blutentnahme) zu haben, wurde parallel zu den heterologen Seren, das autologe Serum mitgetestet.

Es wurden folgende Viren getestet: HR006-IV, HR014, HR011.

Abbildung 5.8 gibt die, aus den Extinktionen ermittelte Neutralisationsaktivität wieder. Jeder Neutralisationsbalken wurde aus dem Mittelwert der p24-Werte von 6 unterschiedlichen Kulturen errechnet. Die in Klammern angegebenen Buchstaben repräsentieren den jeweiligen Subtyp der Probe.

Die mit einem Stern gekennzeichneten Seren (HR014* und HR001*) wurden in einem Experiment verwendet [E1], dessen Makrophagen, legt man einen TCID₅₀ von 50.000I.U./ml bei dem Isolat HR006-IV auf Makrophagen zugrunde, mit 800I.U./well infiziert worden waren. Bei den anderen Experimenten mit dem Isolat HR006-IV wurden nur 300I.U./well Virusanzucht eingesetzt. Auch wurde bei dem mit Stern gekennzeichneten Experiment weniger Serum eingesetzt, als bei den übrigen Experimenten (110µl statt 140µl).

Alle drei Experimente [E1-E3] wurden auf unterschiedlichen Spendermakrophagen durchgeführt.

Es wurden folgende Kreuzneutralisationen ermittelt:

Virus	Antikörper [Serum oder isolierte IgG's/Subtyp]		p24 Ag-Menge [pg/ml]	N [%] [Experiment]
HR006-IV	HR014*	B	1498 (± 351.14)	16 [E1]
	HR001*	C	713.96 (± 253.50)	67 [E1]
HR006-IV	HR006-IV	B	1.46 (± 0.66)	99 [E2]
	HR014	B	186.74 (± 34.73)	55 [E2]
	HR010	B	64.67 (± 27.42)	83 [E2]
HR014	HR014	B	0.18 (± 0.01)	95 [E2]
	HR006-IV	B	2.73 (± 0.27)	98 [E2]
	HR006-IV <i>IgG</i>	B	9.99 (± 3.27)	89 [E2]
HR011	HR011	B	6.03 (± 0.13)	70 [E3]
	HR009-II	E	10.12 (± 6.66)	63 [E3]
	HR001	C	21.02 (± 6.52)	22 [E3]
HR014	HR014	B	3.30 (± 0.14)	95 [E3]
	HR011	B	1.94 (± 0.13)	99 [E3]
	HR003	B	12.84 (± 2.48)	75 [E3]

Tab. 5. 13

Die graphische Umsetzung der Ergebnisse aus den Kreuzneutralisationsexperimenten auf Makrophagen können der Abbildung 5.8 entnommen werden.

Kreuzneutralisation auf Makrophagen

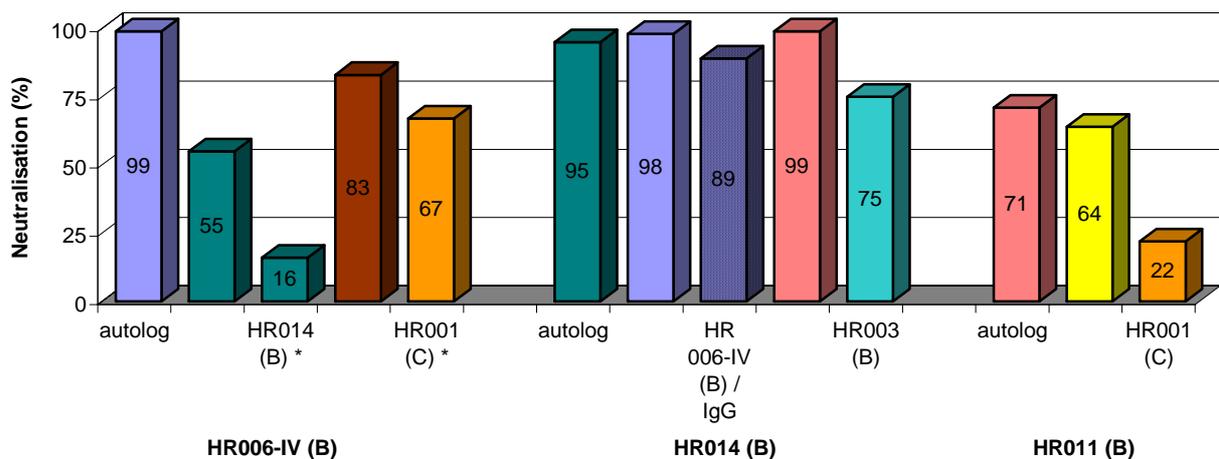


Abb. 5. 8

Der graphischen Darstellung, sowie Tabelle 5.13 sind zu entnehmen, dass bei fast allen getesteten Seren eine Neutralisation der Viren erfolgte. Dies geschah völlig unabhängig vom jeweiligen Subtyp. Serum des Subtyps C (HR001) war in der Lage, Viren des Subtyps B (HR006-IV) zu neutralisieren. Gleiches galt auch für das Serum des Subtyps E (HR009-II), das Viren des Isolates HR011 (B) zu neutralisieren vermochte.

Bemerkenswert ist auch, dass das Serum von HR011 bei einer Neutralisationsreaktion mit autologem Virus eine geringere Neutralisation (71%) aufwies, während es bei einer Reaktion mit dem Virus eines anderen Patienten (HR014) eine Aktivität von 99% erreichen konnte. Dies bedeutet, dass die heterologe Neutralisationsfähigkeit über der der autologen Reaktion des jeweils vorliegenden Isolates liegen kann. Weiterhin zeigt sich, dass die isolierten Immunglobuline der Folgeprobe des Patienten HR006 in der Lage sind, fremde Viren (HR014) mit einem Wert von 89% zu neutralisieren.

Bei dem Serum HR014 zeigte sich in zwei völlig getrennten Experimenten [E1 und E2] mit dem Virus HR006-IV eine unterschiedliche Neutralisationsfähigkeit. Zum einen [E2] war eine deutliche Neutralisation zu erkennen (55%), zum anderen [E1] fehlte sie völlig (16%). Offensichtlich spielen in diesem Fall die unterschiedlichen Virus- und Serumeinsatzmengen eine große Rolle.

Das Serum HR001 (C) wies beim Experiment E1 mit dem Virus HR006-IV (B) eine relativ hohe Neutralisation (67%) auf, während es beim Experiment E2 mit dem Virus HR011 (B) keine Neutralisationsaktivität (22%) zeigte. Dabei war die eingesetzte Serummenge im ersten Fall geringer als im zweiten. Daraus lässt sich folgern, dass nicht nur die eingesetzten Antikörpermengen bei Neutralisationsreaktionen von großer Bedeutung sind, sondern neben der zur Anwendung kommenden Virusmenge, auch eine Spenderzellabhängigkeit zu vermuten ist.

5.4 Charakterisierung der Infektiösität zellulärer Komponenten

5.4.1 Darstellung des SI- und NSI-Phänotyps auf MT-2 Zellen

Bei MT-2 Zellen handelt es sich um eine humane T-Zelllinie, die auf ihrer Oberfläche ausschließlich CXCR4 als Corezeptor exprimiert. Kommt es zur Infektion, treten cytophatische Veränderungen auf bzw. es bilden sich Synzytien aus (Harada et al., 1985). Viren, die in der Lage sind, MT-2 Zellen zu infizieren, werden als SI (*syncytium inducing*) eingestuft. Solche, die dies nicht können, als NSI (*non syncytium inducing*). Dies geschieht unabhängig davon, ob sie auf anderen Zellsystemen (U87, Makrophagen) Synzytien ausbilden können oder nicht. In allen Fällen ist das Erscheinen von Synzytien gleichzusetzen mit einer erfolgreichen Infektion.

Es wurden die Isolate HR001, HR001-II, HR001-1-1, HR006 und Folgeproben getestet. Die Einordnung in SI/NSI der Ursprungsproben war zu Beginn der Promotion bereits bekannt. Alle zwei bis drei Tage wurden die MT2-Zellen unter dem Mikroskop nach ihrer Fähigkeit Synzytien ausbilden zu können, beurteilt.

Während der gesamten Beobachtungsphase (17 Tage) zeigten sich keinerlei Tendenz zur Synzytienbildung. Bei positiver Beurteilung hätten die ersten Synzytien bereits nach 3-5 Tagen auftreten müssen. Auch eine angeschlossenen Bestimmung des p24-Gehaltes der hier getesteten Virusüberstände erwies sich als negativ.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über alle im MT2-Assay getesteten Isolate.

Isolat	Synzytienstatus
HR001	NSI
HR001-1-1	NSI
HR002	NSI
HR003	NSI
HR004	NSI
HR005	NSI
HR006	NSI
HR006-II	NSI
HR006-IV	NSI
HR008	NSI
HR009	NSI
HR010	SI
HR014	NSI

Tab. 5. 14

Auffällig zeigte sich nur das Isolat HR010, dessen Patient bereits 7 Monate nach Infektion mit dem HI-Virus ein synzytien-induzierendes MT2-Testergebnis aufwies.

5.4.2 Bestimmung der Chemokinrezeptornutzung einzelner Isolate

Mit Hilfe einer humanen Glioma Zelllinie (U87), wurden die unterschiedlichen Patientenisolate, einschließlich ihrer Folgeproben, auf ihre bei der Infektion benutzten Chemokinrezeptoren untersucht (Methoden 4.2.1.2).

Für die Versuche wurden folgende Zelllinien eingesetzt:

- U87.MG (keine Expression von Chemokinrezeptoren)
- U87.CCR5 (Expression von CD4 und CCR5 auf der Zelloberfläche)
- U87.CXCR4 (Expression von CD4 und CXCR4 auf der Zelloberfläche)
- U87.CCR3 (Expression von CD4 und CCR3 auf der Zelloberfläche)

Abbildung 5.9 zeigt die Synzytienbildung von U87.CCR5 nach erfolgter Infektion des Isolates HR006-IV. Deutlich ist die Zellverschmelzung zu vielkernigen Riesenzellen zu sehen. Ein weiteres Indiz für die erfolgte Infektion ist die immunocytochemische Färbung des Coreproteins p24. Die Färbung, die mit Hilfe eines monoklonalen Maus HIV-1 p24 Antikörpers erreicht worden ist, ist im Bild rot zu sehen.

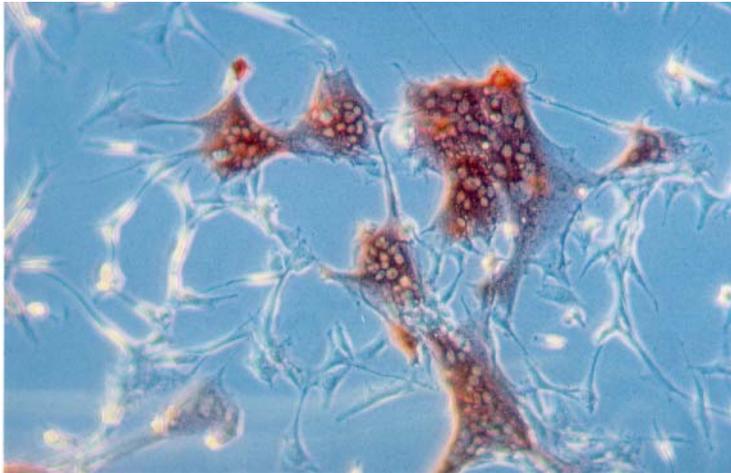


Abb. 5. 9

Zur Unterstützung der mikroskopischen Ergebnisse wurden die Virusüberstände entnommen und der p24-Gehalt mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Um die Hintergrundextinktion, d.h. den Wert einer uninfizierten Zelle zu bestimmen, wurden die Zellen U87.MG , die keine Chemokinrezeptoren exprimieren, beispielhaft jeweils mit einem SI und einem NSI-Isolat "infiziert" (SI/NSI bezieht sich auf die Synzytienbildungsfähigkeit im MT-2-Assay).

Die Bewertung der Ergebnisse, die in Tabelle 5.15 dargestellt sind, zeigen den Mittelwert der aus den p24-Werten der Einzelwells errechnet wurde.

Isolat	Subtyp	CCR5	CXCR4	CCR3
HR001	C	+++	-	-
HR001-II	C	+++	-	-
HR001-1-1	C	+++	++	-
HR002	B	+++	-	-
HR003	B	+++	-	-
HR004	E	+++	-	-
HR004-II	E	++	-	-
HR005	B	++	-	-
HR006	B	++	-	-
HR006-II	B	+++	-	-
HR006-IV	B	+++	-	-
HR008	E	++	-	-
HR009-III	E	+++	-	-
HR010	B	++	+++	-
HR014	B	++	-	-
HR014-II	B	+	-	-

Tab. 5. 15

Legende:

+++	=	stark positiv (alle Extinktionen im <i>overflow</i> = Werte über 2.50)
++	=	gut positiv (Werte zum Teil im <i>overflow</i> , zum Teil darunter)
+	=	schwach positiv (kein Wert im <i>overflow</i>)
-	=	negativ

Anhand der ELISA Ergebnisse sind folgende Aussagen möglich:

- ➔ Alle getesteten Isolate sind in der Lage, CCR5 als Corezeptor zur Infektion von Zielzellen zu benutzen. Dabei spielte die Art des Subtyps keine Rolle.
- ➔ Alle getesteten Isolate sind nicht in der Lage, CCR3 als Corezeptor zur Infektion von Zielzellen zu benutzen.
- ➔ Nur zwei Isolate können den Chemokinrezeptor CXCR4 als Corezeptor zur Infektion benutzen. Bei dem einen Isolat (HR010) handelt es sich um ein im MT-2-Assay synzytienbildenden Virustyp (SI). Bei dem anderen Isolat HR001-1-1 handelt es sich um die Partnerin von HR001-1. Die zweite Partnerin von HR001-1 (HR001) ist dagegen nicht in der Lage, CXCR4 als Corezeptor zur Infektion zu nutzen.

Ein Artefakt oder eine Kontamination ist in diesem Fall auszuschließen, da alle Ergebnisse aus zwei unterschiedlichen Experimenten auf Zellen unterschiedlichen Ursprungs durchgeführt worden waren. Eine Erklärung für dieses Ergebnis fällt schwer, da die Resultate aus dem MT-2 Assay und den Versuchen mit den U87 Zellen scheinbar im Gegensatz zueinander stehen. Jedoch handelt es sich einerseits um zwei völlig unterschiedliche Zelllinien und andererseits mag ein Grund für die Nutzung des CXCR4 Chemokinrezeptors im Falle der U87 Zellen im Vorhandensein eines sehr großen Quasispeziespektrum des Isolates HR001-1-1 zu suchen sein.

5.4.3 Darstellung der $\Delta 32$ Deletion des CCR5 Chemokinrezeptorgens

Zu einer umfassenden Charakterisierung der Zellen von HIV-Patienten während der Krankheitsprogression gehört auch eine Untersuchung des Vorkommens einer $\Delta 32$ Deletion innerhalb des CCR5 Chemokinrezeptorgens.

Um herauszufinden, ob die Zellen der untersuchten Proben eine $\Delta 32$ Deletion im CCR5 Rezeptorgen aufweisen, wurde eine PCR mit der genomischen DNA der unterschiedlichen Patientenproben durchgeführt (Methoden 4.3.1 und 4.3.2). Die Primersequenzen wurden der Veröffentlichung von Eugen-Olsen et al., AIDS 11 (1997): 305-310 entnommen. Diese Primer amplifizieren ein 547bp Fragment einer Wildtyp-DNA, zwei Fragmente einer heterozygoten CCR5-DNA (547bp und 515bp) oder ein Fragment von 515bp einer homozygoten $\Delta 32$ Deletions-CCR5-DNA. Nach Auftrag der Amplifikationsprodukte auf ein Agarosegel (Größenmarker: 100bp *ladder*) stellte sich folgendes Bild dar:

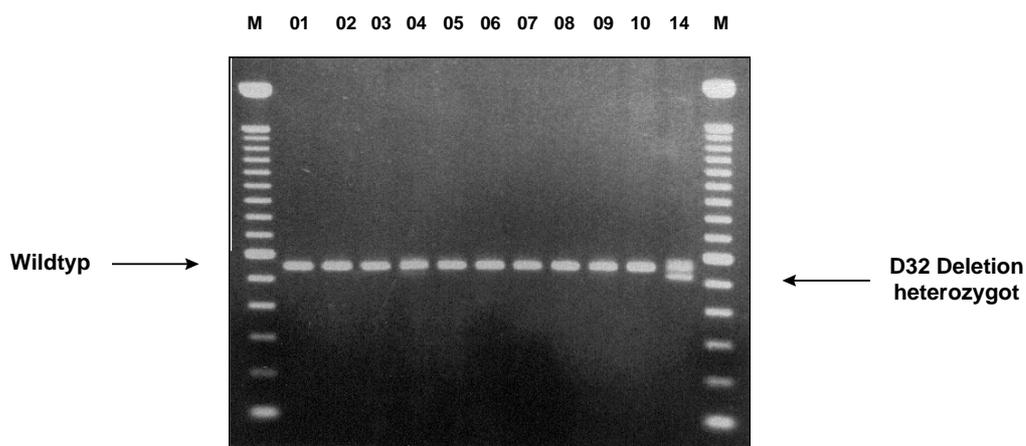


Abb. 5. 10

Das Foto der Amplifikationsprodukte veranschaulicht, dass lediglich die genomische DNA der Zellen der Patientenprobe HR014 eine $\Delta 32$ Deletion besitzt. Es sind zwei Banden mit unterschiedlicher Länge (547bp und 515bp) auf dem Agarosegel sichtbar. In diesem Fall liegt die Deletionsmutation heterozygot vor. Alle anderen getesteten Patientenzellen liegen als Wildtyp vor (nur eine Bande bei 547bp). Keine DNA besitzt die $\Delta 32$ Deletion des CCR5 Chemokinrezeptors in homozygoter Form.

6 Diskussion

6.1 Qualitätsmerkmale bei der Virusanzucht

Wie schon erwähnt, war es von besonderer Bedeutung, bei der Wahl des Versuchsaufbaus eine möglichst gute Analogie zur biologischen Realität zu schaffen. Dieses Kriterium wurde von der Teflonsackkultur, in der gemeinsam mononukleäre Zellen eines gesunden Spenders und eines infizierten Patienten in Mischkultur kultiviert worden waren, erfüllt.

Ein weiterer positiver Aspekt war die Minimierung des Selektionsdrucks. Meyerhans et al. (1989), Kusumi et al. (1992) und Sabino et al. (1994) konnten den Nachweis erbringen, dass es bei der Viruskultivierung zu einem starken Verlust von Genotypen der viralen Quasispezies kommen kann. Dies konnte 1999 von den Arbeitsgruppen des Georg-Speyer-Hauses abschließend bestätigt werden (von Briesen et al, 1999). Zum Versuchsaufbau gehörte in diesem Fall die Sequenzierung von 10-20 unabhängig voneinander isolierten Klonen, die durch Nukleinsäureamplifizierung der Zell-DNA aus unterschiedlichen Kultursystemen erhalten worden waren. Diese Ergebnisse wurden den DNA-Sequenzen, die aus unkultiviertem Plasma bzw. aus Pbmc's gewonnen worden waren, gegenüber gestellt. Das Resultat zeigte, dass die häufigsten Virusvarianten der Pbmc's denen des Plasmas entsprachen. Jedoch erlaubte die Kultivierung von Viren das Wachstum von Varianten, die in unkultivierten Pbmc's unterrepräsentiert waren.

Manche Genotypen waren in unterschiedlicher Frequenz in allen Kultursystemen zu finden, manche waren nur in speziellen zu finden. Die Anzucht in einem Mischkultursystem gewährleistet einen geringen Selektionsdruck und somit ein größeres Virusvarianten-spektrum.

Auf einem Mischkultursystem basierende Virusanzuchten zeigten, wie in Tabelle 5.2 (Ergebnisse 5.2.1) ersichtlich, unterschiedliche Anzuchtzeiten auf. So wurden von einigen Isolaten bereits nach 26 Tagen RT-Werte über 200.000cpm/ml/90min erhalten, während andere Isolate eine Anzuchtdauer von >60 Tagen benötigten, um akzeptable Werte zu erreichen. Im Rahmen der getesteten Primärisolate wiesen Subtyp E-Viren, im Vergleich mit Isolaten anderer Subtypen, eine deutlich längere Anzuchtphase auf.

Dieser Sachverhalt wurde bereits 1994 von Rübsamen-Waigmann et al. publiziert (Rübsamen-Waigmann et al., 1994). Eine ähnlich lange Anzuchtdauer wurde sonst nur von der Folgeprobe HR001-II (Subtyp C) erreicht. Das Verhalten der Folgeprobe HR001-II (therapiert), die einen RT-Wert von 158.000cpm/ml/90min und einen p24-Wert von 426.7ng/ml nach 79 Tagen erreichte, stellte einen starken Gegensatz zu den Parametern der Ursprungsprobe HR001 (untherapiert) dar. Diese wies bereits nach 28 Tagen den gleichen RT-Wert, mit einem p24-Wert von 24.8ng/ml, auf. Der hohe p24-Wert der Folgeprobe, bei gleichem RT-Wert, ist ein Hinweis für einen hohen Anteil an replikationsdefektiven Viren. Gründe dafür können (1) auf die Therapie zurückzuführen und (2) in der langen Anzuchtdauer zu suchen sein. Ein weiterer Grund für die Unterschiede in der Virusanzuchtdauer ist in der Viruslast zu sehen. Die Viruslast für HR001 betrug 42.000 Kopien/ml. Die der Folgeprobe HR001-II war um den Faktor 10 geringer (3.200 Kopien/ml).

Im Gegensatz zu der langwierigen Anzucht mancher Isolate wiesen andere extrem kurze Anzuchtzeiten auf. Ein Beispiel dafür ist das Folgeisolat HR006-IV, das trotz relativ geringer Viruslast (14.000Kopien/ml) innerhalb von 26 Tagen einen RT-Wert von 389.000cpm/ml/90min erreicht.

Gründe für dieses schnelle Viruswachstum des Isolates HR006-IV sind nicht nur in der Spender-Virus-Affinität zu suchen, sondern auch in phänotypischen Veränderungen, denen das Virus im Verlauf der Krankheitsprogression unterliegt, zu sehen. Im Besonderen ist dem *switch* von NSI (makrophagotrop) zu SI (lymphozytotrop) Beachtung zu schenken. Zu Beginn einer Infektion zeigt das Virus eher einen NSI-Phänotyp auf, der zu einem späteren Zeitpunkt in einen SI-Phänotyp wechselt (Tersmette et al, 1988; von Briesen et al, 1990; McNearney et al., 1992; Zhang et al., 1993; Zhu et al., 1993). Es gibt allerdings auch Ausnahmen. So zeigte das Isolat HR010 bereits 7 Monate nach der Infektion einen SI-Phänotyp auf (Tabelle 5.14/Ergebnisse 5.4.1).

Im Falle des Isolates HR006 und seiner Folgeprobe konnte im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Verhaltensmustern aufgezeigt werden, dass Ursprungs- und Folge-isolat, obwohl beide einen NSI-Phänotyp aufwiesen, unterschiedliche Zellpräferenzen hatten. In diesem Zusammenhang zeigte es sich, dass das Ursprungsisolat HR006 nur gering Makrophagen in Kultur infizieren konnte. Es war deutlich lymphozytotrop.

Im Gegensatz dazu erwies sich die Folgeprobe HR006-IV als eher amphotrop, da sie sowohl Lymphozyten, als auch Makrophagen infizieren konnte. Die graphischen Darstellungen der Abbildung 5.3 (Ergebnisse 5.3.5.1) und Abbildung 5.4 (Ergebnisse 5.3.5.2) verdeutlichen dies anhand der gemessenen Extinktionen und stellen gleichzeitig dar, dass Ursprungs- und Folgeisolat gleichermaßen, trotz NSI-Phänotyps, eindeutig Lymphozyten zur Infektion bevorzugen. Während die Unterscheidung SI/NSI sich in der Literatur aufgrund ihrer Einfachheit schnell durchsetzen konnte, bestätigt dieses Ergebnis die Befunde von von Briesen et al. (1990), die mindestens vier im Wachstumsverhalten auf primären Zellen unterscheidbare Phänotypen definieren. Amphotrope Primärisolate, wie z.B. HR006-IV, die Makrophagen und Lymphozyten gleichermaßen zur Infektion benutzen können, erreichen weitaus höhere Virustiter in relativ kurzer Zeit. Mit dem Ursprungsisolat HR006 konnte dagegen bei höherer Viruslast im gleichen Zeitraum nur ein um den Faktor 2.6 geringerer RT-Wert erhalten werden (Tabelle 5.2, Ergebnisse 5.2.1).

Gleiche Ergebnisse wiesen die TCID₅₀-Bestimmungen, als Nachweis der Infektiosität der Virusisolate auf. Die TCID₅₀-Bestimmungen der Versuche 1 (V1) und 2 (V2) wurden auf den Zellen unterschiedlicher Spender durchgeführt (V 1/buffy A; V 2/buffy B), um die Einflüsse verschiedener Spenderzellen auf das Versuchsergebnis zu verdeutlichen. Betrachtet man Tabelle 5.3 Kapitel 5.2.2, so zeigt das Isolat HR006 einen T-tropen Phänotyp auf. Der TCID₅₀-Wert (V2) von HR006, ist mit 8109I.U./ml auf Lymphozyten, um den Faktor 27 größer, als der auf Makrophagen (317I.U./ml). Die Makrophagen des V1-Versuches wurden von HR006 gleichermaßen schlecht infiziert (190I.U./ml). Das Folgeisolat HR006-IV zeigt dagegen auf Lymphozyten (161.796I.U./ml) und auf Makrophagen (10.168I.U./ml) hohe TCID₅₀-Werte.

Wie man der Tabelle 5.15 (Ergebnisse 5.4.2) entnehmen kann, benutzen die Primärisolate HR006 und HR006-IV beide den Chemokinrezeptor CCR5 zum Eintritt in die Zielzelle. Die CCR5 Expression wurden bei CD4⁺ T-Zellen (Raport et al., 1996; Wu et al., 1997a; Bleul et al., 1997), bei Monozyten/Makrophagen (Combadiere et al., 1996; Rottmann et al., 1997; Zhang et al., 1998), bei Langerhans Zellen (Dittmar et al., 1997; Zaitseva et al., 1997), in der Mucosa von Rectum und Colon (Zhang et al., 1998) und von Vagina und Cervix (Zhang et al., 1998; Patterson et al., 1998) nachgewiesen. Diese Ergebnisse zugrunde legend, müsste das Primärisolat HR006 amphotrop sein und Makrophagen mit gleicher Effizienz wie Lymphozyten infizieren können. Dies ist aber nicht der Fall.

Es ist zu vermuten, dass im Zusammenhang mit dem Zelltropismus auch die Spenderabhängigkeit eine Rolle spielt. Dies konnte u.a durch Untersuchungen von Eisert et al., 2001 gezeigt werden. Dabei wurde belegt, dass die Effektivität der HIV-1 Infektion zum einen unabhängig von der Menge der von der Wirtszelle exprimierten Chemokinrezeptoren ist und, dass zum anderen die virale Replikation nach dem Viruseintritt in die Zielzelle zusätzlich reguliert wird.

Die Spenderabhängigkeit der Virusproduktion von den Zielzellen konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Sie ist auf den Blockdiagrammen (Abbildung 5.3/Ergebnisse 5.3.5.1 und Abbildung 5.4/Ergebnisse 5.3.5.2) deutlich zu erkennen. Als Beispiel wird die Infektion, gemessen als Extinktion, des Isolates HR006 und seiner Folgeprobe HR006-IV aufgeführt. Offensichtlich bevorzugt das Ursprungsisolat HR006 Lymphozyten als Zielzellen zur Infektion. Obwohl es sich um ein amphotropes Primärisolat handelt, das auch Makrophagen infizieren kann, wurde doch den Lymphozyten des gleichen Spenderbuffy's der Vorzug gegeben. Die Spenderabhängigkeit, ist vor allem bei der Infektion der Lymphozyten gut zu erkennen. Sie zeichnete sich durch hohe Extinktionen, deren Messung erst bei einer Verdünnung der Kulturüberstände von 1:2000 mit PBS möglich war, aus. Des Weiteren zeigen beide Isolate (HR006 und HR006-IV) bei der Infektion der Lymphozytenkultur des Spenderbuffy's B2 eine deutlich verringerte Infektionsrate. Im Falle der Makrophagen wurde eine deutlich geringere Extinktion bzw. Infektion gemessen.

Layne et al. untersuchten 1992 die Infektiosität des HIV-1HXB3 Isolates mit Hilfe eines quantitativen Assays (*Quantitative infectivity assay* / Nara and Fischinger, 1988). Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass eine untherapierten Probe einen SFU (*syncytial forming units*), der als Maß zur Bestimmung infektiöser Partikel gilt, von 3×10^{-7} besitzt. Dies bedeutet, dass nur 1 von 3 Millionen Viruspartikel infektiös ist.

Weiterhin ist das HI-Virus durch eine labile Struktur gekennzeichnet. So wird z.B. das gp120 Protein auf der Virusoberfläche durch nichtkovalente Bindung mit dem gp41 fixiert. Im Falle des HI-Virus kann es zu einer spontanen Dissoziation des gp120 Proteins vom viralen Envelope kommen, was als "*shedding*" bezeichnet wird (Gelderblom et al., 1991; Modrow et al., 1987).

Verschiedene Faktoren (sCD4, einige Antikörper gegen env-Regionen) können diese Bindung zerstören, worauf es zum Verlust der Infektiosität des Virus kommen kann (Moore et al., 1990; Klasse et al., 1996; Dimitrov et al., 1992; McKeating et al., 1991). Auch kann es zu einem Auflösen des p24 core Proteins (Mc Dougal et al., 1985) und einem spontanen Verlust der RNA-Polymerase Aktivität (Lori et al., 1988; Goff et al., 1990) kommen.

Um die Einflüsse der Spenderzellen auf die Versuchsergebnisse zu minimieren, wurden Vergleichsuntersuchungen, wie beim Isolat HR006 und seiner Folgeprobe HR006-IV, jeweils auf denselben Spenderzellen durchgeführt.

6.2 *In vitro* Modelle zum Funktionsnachweis von Antikörpern

6.2.1 Wirkung von P1-Peptiden auf das Neutralisationsverhalten von Antikörpern

Es gibt unterschiedliche Theorien den Mechanismus der Neutralisation von HIV-1 Viren durch Antikörper zu erklären. Bei der "*few-hit-Theorie*" geht man davon aus, dass schon wenige Antikörper, die an ein Virion binden, eine Neutralisation auslösen können (McLaine et al., 1994; Dimmock NJ, 1993; Dimmock NJ 1995). Bei einem anderen Modell entsteht Neutralisation nur dann, wenn so viele Neutralisationsepitope auf dem Virus durch Antikörper besetzt sind, dass eine Infektion der Zelle durch das Virus nicht mehr möglich ist (*occupancy-model*: Della-Porte et al., 1977; Klasse et al., 1996; Nara et al., 1991). Eine weitere Möglichkeit der Antikörperneutralisation ist das Verhindern der Virus-Zell-Membran-Fusion (Armstrong et al., 1996; Dimmock NJ, 1993; Dimmock NJ, 1995; McInerney et al., 1997).

Die Neutralisationsaktivität der Antikörper ist gegen spezifische Epitope des HIV-1 Env Glykoproteins gp120 gerichtet (zusammengefasst bei: Burton et al., 1997; Moore et al., 1995a; Pognard et al., 1996). Weiterhin kann sie auch durch transmembranglykoprotein-spezifische Komponenten (gp41) vermittelt werden (Muster et al., 1993; Muster et al., 1994).

In verschiedenen Experimenten mit Monoklonalen Antikörpern wurde festgestellt, dass TCLA-Viren (*T-cell line adapted* / Laborstämme) ein anderes Neutralisationsverhalten als Primärisolate aufzeigen. Grund dafür ist, dass die Erreichbarkeit der Neutralisationsepitope auf den Viren für die Antikörper bei TCLA-Viren besser ist, als bei Primärisolaten (Bou-Habib et al., 1994; Fouts et al., 1997; Moore et al., 1995a; Moore et al., 1995b; Sattentau et al., 1994). So können auf TCLA-Viren neutralisierende Antikörper gegen gp120 mit den variablen Regionen V1/V2 und V3, mit der CD4-Bindungsstelle (*binding site*) und den Neutralisationsepitopen 2G12 und b12 interagieren (zusammengefasst bei: Burton et al., 1997; Poignard et al., 1996).

Im Gegensatz zu den TCLA-Viren scheinen bei der Neutralisation von Primärisolaten V3-Antikörper keine große Rolle zu spielen. Epitope außerhalb des *V3-loop* sind bei ihnen Ziel der Antikörperneutralisation (Spence et al., 1998).

Anhand des Versuches mit einer P1-Peptid-Vorinkubationsstufe sollte der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern im Serum erbracht werden. Gleichzeitig sollte festgestellt werden, inwieweit die Neutralisation auf Makrophagen durch V3-Antikörper bedingt ist.

Zu diesem Zweck wurden die HIV-1-Serumantikörper mit einem zum *V3-loop* des gp120 komplementären P1-Peptid (Subtyp B) unterschiedlicher Konzentration vorinkubiert, um im Anschluß eine Neutralisationsreaktion durchzuführen.

Legt man die Annahme zugrunde, dass die V3-Antikörper mit dem P1-Peptid eine Verbindung, ähnlich der des V3-Peptid-ELISA's, eingehen, so müsste die folgende Neutralisationsreaktion ausbleiben. Die Serumantikörper könnten nicht mehr an das Virus binden und somit die Infektion nicht beeinflussen.

Die Ergebnisse (Abbildung 5.2, Ergebnisse 5.3.3) zeigen, dass es nach erfolgter HIV 1-Antikörper-Peptidvorinkubation zu einer starken Reduktion der Infektion, also zu einer hohen Neutralisationsaktivität, kam. Folglich war kein Unterschied in der Neutralisationsaktivität mit oder ohne P1-Peptid-Vorinkubation festzustellen, die in allen Fällen über 90% lag (Tabelle 5.6).

Als Gründe für die fehlende Blockierung der Neutralisation nach erfolgter P1-Peptid-Vorinkubation sind zu sehen:

- (i) die eingesetzten Peptidkonzentrationen waren zu gering gewählt
- (ii) unterschiedliche Affinitäten der Serumantikörper zum Peptid im Falle des frei in Lösung befindlichen Peptides (im Gegensatz zu dem an der Mikrotiterplatte gebundenem)
- (iii) die Peptid/Antikörper-Bindung ist unter diesen Versuchsbedingungen nicht stabil genug gewesen

(iv) es sind nicht die V3-Antikörper, die eine Neutralisation auf Makrophagen hervorrufen. Die Annahme, dass der Grund für die hohe Neutralisationsaktivität, trotz Peptid-Vorinkubation, in der Konzentration des Peptides zu suchen ist (Punkt (i)), scheint am unwahrscheinlichsten. Die höchste getestete Peptidkonzentration lag bei 4.7µg/ml (Tabelle 5.7) und entsprach damit der im V3-ELISA benutzten Konzentration. Spätestens bei der Verdünnung der Serumantikörper, die das Mengenverhältnis noch weiter zugunsten des Peptides verschob, hätte eine Beeinflussung der Neutralisationsreaktion festzustellen sein müssen. Ebenso sind die Erklärungsmöglichkeiten (ii) und (iii) eher unwahrscheinlich.

Die Versuchsergebnisse machen es damit wahrscheinlich, dass V3-Antikörper bei der Neutralisation von Primärisolaten auf Makrophagen keine Rolle spielen. Da trotzdem eine große Neutralisationsaktivität bei dem Teilversuch mit P1-Peptid-Vorinkubation messbar war, ist gleichzeitig der Nachweis erbracht worden, dass bei Primärisolaten auf Makrophagen, andere Virusneutralisationsepitope (außer *V3-loop*) Ziel neutralisierender Antikörper sind. In Frage kommen z.B. die Neutralisationsepitope b12 (beinhaltet Teile der CD4 bs und des *V2-loops*) und 2G12 (beinhaltet Teile des *V3-* und *V4-loops*) (zusammengefasst bei : Parren et al., 1998).

6.2.2 Neutralisationsvergleich autologer Serumantikörper

Mittels V3-ELISA wurden die Verdünnungen ermittelt, bei denen die Seren zu unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten noch in der Lage waren, an V3-Peptide zu binden. Die ausgewerteten Daten der Tabelle 5.5, Ergebnisse 5.3.2 beschreiben einen starken Anstieg (Faktor 10) von der Ursprungsprobe bis zur nächsten Folgeprobe.

Dieser hohe Wert, an im ELISA an das V3-Peptid bindende Antikörper, bleibt über einen Zeitraum von fast 2 Jahren erhalten. Im Gegensatz dazu reduziert sich das Maß an neutralisierenden V3-Antikörpern nach 3 Jahren und unter Therapieeinfluss bis zu 50%. Ob nun die Therapie an sich oder der fortgeschrittene Krankheitsverlauf des Patienten diese Reduktion an neutralisierenden V3-Antikörpern hervorgerufen hat, ist schwer zu sagen.

Deshalb wurden im folgenden Experiment die Serumantikörper des gleichen Patienten zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten auf ihre Neutralisationsfähigkeit getestet. Als Virusisolate dienten zum einen das autologe Ursprungsisolat und zum anderen die Folgeprobe des gleichen Patienten.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Antikörperproduktion der der neu auftretenden Virusvarianten hinterher "hinkt". Diese Tatsache erklärt auch, warum frühe Seren nur in eingeschränktem Maße in der Lage sind, spätere Viren zu neutralisieren (Goudsmit et al., 1988; Schreiber et al., 1994).

6.2.3 Neutralisationsaktivität von isolierten Immunglobulinen

Ruppach et al., zeigten 2000, dass die Konzentration des β -Chemokins MIP-1 β im Serum zu niedrig ist, um für inhibitorische Effekte verantwortlich zu sein. Die Konzentration von RANTES, war dagegen im Vergleich zu HIV-1 negativen Individuen, vergrößert. In diesem Zusammenhang zeigten allerdings andere Arbeitsgruppen, dass RANTES in einer Konzentration von 50ng/ml eine Infektion von Makrophagen durch den HIV-1 Erreger nicht verhindern kann, obwohl der Chemokinrezeptor CCR5 auf Makrophagen exprimiert wird (Trkola et al., 1998; Simmons et al., 1996; Scarlatti et al., 1997).

Sind folglich β -Chemokine nicht in der Lage, die Infektion von Makrophagen zu verhindern, stellt sich die Frage, ob isolierte Antikörper eine Infektion von Makrophagen unterbinden können.

Um genauere Aussagen über die Wirkungsweise von Antikörpern bei der Infektabwehr treffen zu können, wurden immunreaktive Bestandteile aus Patientenserum isoliert. Das Hauptaugenmerk lag hier auf dem Immunglobulin G und dessen Rolle bei der humoralen Immunantwort.

IgG's sind von besonderer Bedeutung, da sie die wichtigsten Antikörper der sekundären Immunantwort sind. Sie sind die Hauptimmunglobuline des menschlichen Serums und machen 70-75% des gesamten Immunglobulinpools aus. Das IgG selbst zeichnet sich durch 4 Subklassen (IgG₁-IgG₄) aus, die sich durch die Anzahl der Verbindungen der schweren Ketten unterscheiden (zusammengefasst bei Roitt et al., 1995).

Mit Hilfe von Westernblottanalysen fanden Khalife et al., 1988 heraus, dass die unterschiedlichen Immunglobuline, einschließlich ihrer Subklassen, verschieden mit den HIV-Strukturproteinen gag, pol und env reagieren. Hervorstechend war dabei die Reaktion des IgG₁ mit pol (87%) und env (82%). Die Reaktion der anderen Immunglobuline mit den HIV Strukturproteinen lag unter 10%.

Um die Wirkungsweise der Antikörper besser einzugrenzen, wurde das isolierte IgG durch Papain gespalten (Methoden 4.4.2) (Escribano MJ, 1979; Mohanty et al., 1985). Die pflanzliche Proteinase Papain spaltet des IgG-Molekül in der "hinge"-Region in zwei identische Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Die Funktionen der Fab-Fragmente liegen in der Antigenbindung. Der Fc-Region kommen Effektorfunktionen wie Komplementfixierung und Bindung an phagozytierende Zellen (z.B. Monozyten) zu. Die so durch die Antikörper opsonierten Antigene (Viren) werden daraufhin von Phagozyten phagozytiert.

Es stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob isolierte Immunglobuline und deren Spaltprodukte (Fab-Fragmente) in der Lage sind, *in vitro* eine Neutralisation von HI-Viren auszulösen. Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurde, neben der Messung der Neutralisationsaktivität an sich, auch die Frage geklärt, inwieweit sich das Neutralisationsverhalten im Verlauf der Krankheitsprogression verändert.

Wie Abbildung 5.5 (Ergebnisse 5.3.6) und Tabelle 5.9 (Ergebnisse 5.3.5) zu entnehmen ist, findet bei der Ursprungs- und der Folgeprobe (Isolat HR006 und HR006-IV) auf Makrophagen in allen Fällen eine >80% Neutralisation der Viren durch autologe Serumantikörper statt. Die Neutralisationsaktivität auf Lymphozyten liegt bei den zwei getesteten Spendern beider Isolate <50%. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen konnte allerdings auch auf den Lymphozyten (Folgeisolat HR006-IV/B2) ein geringer Neutralisationseffekt festgestellt werden ($47\% \pm 15$), der jedoch bei weitem unterhalb dem auf Makrophagen lag.

Das unterschiedliche Neutralisationsverhalten auf Lymphozyten und Makrophagen war bereits durch die Arbeiten anderer Arbeitsgruppen bekannt. So stellte Zhuge et al., 1997 fest, dass Plasma von SIV_{mac} infizierten Makakken ebensolche Viren auf Lymphozyten fast nicht neutralisieren kann. Das gleiche Plasma konnte dagegen noch in einer Verdünnung von 1:20.000 Viren auf Makrophagenkulturen neutralisieren.

Ruppach et al. beobachtet 2000 dieses Phänomen auch. Im Rahmen seiner Arbeit wurden dafür folgendes Modell aufgestellt. Grundgedanke ist, dass das HI-Virus auf seiner Oberfläche im Bereich des gp120 unterschiedliche Epitope besitzt. Lymphozytrotrope (LTE) und makrophagotrope Epitope (MTE). Diese Epitope befähigen das Virus, in die jeweilige Zielzelle zu gelangen. Anfänglich besetzen die Serumantikörper die MTE's des Virus, so dass keine Infektion der Makrophagen erfolgen kann. Es kommt zu einer Reduktion der Virusproduktion bzw. zur Neutralisation auf Makrophagen. Im Verlauf der Krankheitsprogression kommt es zum *switch* der Antikörper in Richtung LTE. Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Neutralisationsaktivität auf Lymphozyten zu.

Die im Rahmen dieser Promotion gefundenen Ergebnisse bestätigen die Möglichkeit dieser These. Allerdings mit gewissen Einschränkungen. So ist im Verlauf der Krankheitsprogression im Falle des getesteten Isolates (HR006) ein Tendenz in Richtung LTE festzustellen. Jedoch kommt es zu diesem Zeitpunkt (ca. 2 Jahre nach Infektion) zu keinem vollständigen *switch* in Richtung LTE. Dies wird Anhand der Neutralisation auf Makrophagen deutlich. Auch nach zwei Jahren der Infektion läßt sich das Virus auf Makrophagen durch autologe Serumantikörper zu fast 100% neutralisieren.

Die Fähigkeit der Antikörper an MTE's zu binden geht somit nicht verloren. Genauer, kommt es zu einer zusätzlichen Epitopnutzung der Antikörper auf dem Virus. Aus der Nutzung von MTE's wird eine Nutzung von MTE's + LTE's.

Die Frage nach der Neutralisationsfähigkeit isolierter Immunglobuline ist, wie die Ergebnisse eindeutig zeigten, mit "Ja" zu beantworten. Es sind somit wahrscheinlich die Serum-antikörper, die die Neutralisation auf Makrophagen hervorrufen. Dies zeigen die Ergebnisse der Makrophagenkulturen, deren Viren der Ursprungs- und Folgeprobe (Isolat HR006 und HR006-IV) bis zu 85% (Tabelle 5.11/Ergebnisse 5.3.7) durch autologe IgG's neutralisiert werden konnten. Auf Lymphozyten lag der Wert bei den Versuchen mit dem Ursprungsisolat <50%. Auffällig ist, dass bei den Versuchen mit dem Folgeisolat HR006-IV ein leichter Neutralisationseffekt auf Lymphozyten zu verzeichnen ist. Ähnlich der Neutralisations-aktivität der Serumantikörper nimmt die Neutralisationsaktivität der IgG's im Verlauf der Krankheitsprogression auf Lymphozyten zu. Das Neutralisationsverhalten der isolierten Immunglobuline entspricht demnach der des Serums.

Die Untersuchungen mit den Fab-Fragmenten zeigten, dass auch diese zur Neutralisation befähigt sind. Aus Abbildung 5.7 und Tabelle 5.12 (Ergebnisse 5.3.8) ist ersichtlich, dass es im Falle der Makrophagen des Spenders B1 zu einer 77% Neutralisation kam. Alle anderen Versuche auf Makrophagen verliefen dagegen negativ.

Die Neutralisationsaktivität auf Lymphozyten war bei der Ursprungsprobe (HR006) deutlich negativ, während bei der Folgeprobe HR006-IV (Spender B1) ein geringer Neutralisationseffekt von $42 \pm 21\%$ zu verzeichnen war. Obwohl sich kein einheitliches Bild ergibt, ist, wie bei den Versuchen zuvor, ein Anstieg der Neutralisationsfähigkeit auf Lymphozyten im Verlauf der Krankheitsprogression festzustellen.

Ein Erklärungsversuch für die insgesamt geringe Neutralisationsfähigkeit von Fab-Fragmenten (monovalent) ist wahrscheinlich in der verringerten Avidität zu einem polyvalenten Antigen (Virus) zu sehen. Im Gegensatz dazu besitzen vollständige Immun-globuline (bivalent) zwei Bindungsstellen für potentielle Antigene (Janeway et al., 1996). Zusätzlich kam es bei der Papainspaltung zu einem Mengenverlust von bis zu 50% (SDS-PAGE Abbildung 5.1, Ergebnisse 5.3.1).

6.2.4 Kreuzreaktive Patientenserum bei Neutralisationsreaktionen

Den folgenden Experimenten liegt die Frage zugrunde, ob Virusisolate unterschiedlichen Subtyps durch heterologe Serumantikörper auf Makrophagen neutralisiert werden können. In diesem Zusammenhang wurde auch die Frage nach der Kreuzreaktivität isolierter Immunglobuline hinterfragt. Als Versuchsaufbau wurden Makrophagenkulturen mit unterschiedlichen Patientenviren infiziert (HR006-IV (B), HR014 (B), HR011 (B)).

Die Versuchsergebnisse, die der graphischen Darstellung Abbildung 5.8 und Tabelle 5.13 (Ergebnisse 5.3.9) zu entnehmen sind zeigen eindeutig, dass Neutralisationsreaktionen auf Makrophagen mit heterologen Antikörpern positiv verlaufen. Genauer, in fast allen Fällen war es den heterologen Antikörpern möglich, fremde Viren zu neutralisieren. Dabei lagen nur 2 von 10 getesteten Isolaten mit ihrer Neutralisationsaktivität unter 55%.

Dieses Ergebnis wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. So fanden Zhang et al. 1999 heraus, dass Antikörper in der Lage sind frühe, späte und heterologe Klone von HIV-env-Sequenzen zu neutralisieren. Weber et al. hatten zuvor (1996) schon festgestellt, dass Plasma von infizierten Patienten zwei oder mehr genetische Subtypen neutralisieren konnte. Sie stellten weiterhin fest, dass die Kreuzneutralisation vom Subtyp unabhängig ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Promotion können dies bestätigen. Die gefundene Kreuzneutralisationsaktivität zeigte in keinem Fall einen Zusammenhang mit den verschiedenen Subtypen auf.

Beim Isolat HR011 konnte eine Neutralisationsaktivität des Serums auf dem heterologen Virusisolat HR014 von 99% beobachtet werden. Die autologe Reaktion lag bei 70%. Eine mögliche Erklärung ist in der eingesetzten Virus- bzw. Antikörpermenge zu suchen.

Im Verlauf der Promotion wurde immer wieder Wert darauf gelegt, gleiche Mengen an Virus einzusetzen. Doch repliziert ein Virus, bei gleichen Mengen an TCID₅₀ auf unterschiedlichen Spenderzellen in unterschiedlichem Maß (Kreutz et al., 1998). Eine endgültige Bestimmung des TCID₅₀-Wertes ist somit nicht gegeben.

Ein wichtiges Ergebnis der Versuche wurde mit den isolierten Immunglobulinen erhalten. Sie zeichneten sich durch eine fast 90%ige Neutralisationsaktivität auf Makrophagen aus. Veranschaulicht wird dies auch durch das Ergebnis des Kreuzneutralisationsversuches (HR014/HR006-IV IgG), das der Tabelle 5.13 (Ergebnisse 5.3.9) zu entnehmen ist. Das Isolat HR014 konnte durch isolierte Immunglobuline des Isolates HR006-IV zu 89% neutralisiert werden.

Zusätzlich zeigten die Ergebnisse, dass es Isolate gibt, die sich besser neutralisieren lassen als andere. Wie im Falle des Isolates HR014 geschehen. Keine Neutralisationsaktivität der getesteten Antikörper (HR011, HR003, HR006-IV/Serum, HR006-IV/IgG) lag unter 75%.

Abbildung 5.8 zeigt weiterhin, dass der Subtyp der Viren bei Neutralisationsversuchen auf Makrophagen, nur von sekundärer Bedeutung ist. Alleine die Mengenverhältnisse Virus ↔ Antikörper und die Art der Zielzellen (auch Spenderabhängigkeit) scheinen wichtig zu sein. Dies hätte auch auf die Vakzineforschung großen Einfluß, denn die Immunisierung mit rekombinanten gp120 env-Proteinen unterschiedlicher Subtypen würde entfallen.

Einschränkend ist zu bemerken, dass diese Schlussfolgerung der Experimente nur für HIV-1 gilt. Bei großen Sequenzunterschieden, wie sie zwischen HIV-1 ↔ HIV-2 ↔ SIV vorliegen, kommt es auch zu unterschiedlichen Kreuzneutralisationen. HIV-1 erweist sich als nur gering kreuzreaktiv mit SIV und HIV-2. Im Gegensatz dazu zeigen HIV-2 und SIV eine hohe Kreuzneutralität (Nyambi et al., 1997; Zolla-Pazner et al., 1999).

6.3 Chemokinrezeptornutzung im Krankheitsverlauf

Die Rolle der Chemokinrezeptoren bei der Infektion mit HIV-1 (auch bei HIV-2 und SIV) ist seit vielen Jahren unumstritten. Viele Arbeitsgruppen (Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Deng et al., 1996; Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996; Zhang et al., 1996) fanden heraus, dass der Phänotyp (NSI oder SI) bestimmt, welcher Corezeptor benutzt wird.

Bezogen auf den Phänotyp bedeutet dies, dass T-trope Viren (*rapid/high*, SI) die charakteristisch für die fortgeschrittene Krankheitsprogression sind, zusätzlich zu den Zellen, die den Chemokinrezeptor CCR5 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, solche Zellen, die CXCR4 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, infizieren können (Connor et al., 1997; Simmons et al., 1996; Zhang et al., 1996).

Dagegen können M-trope Viren (*slow/low*, NSI), die charakteristisch für die frühe HIV Infektion sind, dies nicht. Sie können nur Zellen, die CCR5 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren infizieren (Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1997; Deng et al., 1996; Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996). Neuere Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass auch T-trope Viren CCR5 exprimierende Makrophagen infizieren können. Allerdings können sie dort nicht effizient replizieren (Schidtmayerova et al., 1997).

Ferner haben auch ältere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (von Briesen et al., 1990) nie eine 100%ige Spezifität der Tropismen für Lymphozyten oder Makrophagen gesehen. Auch wenn es große quantitative Unterschiede gab, war das Wachstum immer auf beiden Zellsystemen möglich.

Die meisten Publikationen, die das Thema "Chemokinrezeptoren" behandeln, haben diese durch Versuche an M- oder T-tropen Zelllinien erhalten. Alle vorangegangenen Experimente dieser Promotionsarbeit ließen die Vermutung aufkommen, dass es sich bei den untersuchten Isolaten um dual- oder M-trope Viren handelt. Um die Frage nach der Chemokinrezeptor-nutzung letztlich zu klären, wurden deshalb Experimente mit U87-Zellen, die unterschiedliche Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche exprimieren, angeschlossen. Dadurch war es möglich, den vom getesteten Isolat zur Infektion benutzten Chemokinrezeptor herauszufinden.

Die Ergebnisse, die der Tabelle 5.15, Ergebnisse 5.4.2 zu entnehmen sind, zeigen, dass alle hier benutzten Primärisolate CCR5 zur Infektion nutzen können. Zwei weitere (HR001-1-1 und HR010) können zusätzlich CXCR4 zum Eintritt in die Wirtszelle benutzen.

Der vermuteten Tropismus der Primärisolate konnte durch die Experimente mit den Chemokinrezeptoren und durch frühere Ergebnisse bestätigt werden. Alle Isolate konnten sowohl Lymphozyten als auch Makrophagen zur Infektion benutzen. Dies geschah allerdings mit unterschiedlicher Intensität und korrelierte nicht immer mit dem angenommenen Tropismus. So zeigte das Isolat HR006 bereits 8 Monate nach der Serokonversion (Tabelle 5.3/Ergebnisse 5.2.2) einen starken T-Zelltropismus auf. Ursprungs- wie Folgeprobe waren zwar in der Lage, Makrophagen zu infizieren, jedoch in weit geringerem Maß als Lymphozyten. Die Untersuchungen in Hinblick auf die Chemokinrezeptornutzung wies auf eine ausschließliche Nutzung von CCR5 bei der Infektion hin.

Die Ergebnisse der Experimente mit MT-2-Zellen (Tabelle 5.14/Ergebnisse 5.4.1.) zeigen im Falle des SI-Isolates HR010 hingegen eine eindeutige Präferenz zu Lymphozyten, während die Infektion von Makrophagen weit aus geringer ausfiel.

Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, dass eine Aussage der Infektionskinetik bei Primärisolaten aufgrund der Nutzung von Chemokinrezeptoren nicht zu treffen ist. Auch lässt die phänotypische Einteilung in NSI und SI, wie am Beispiel des Isolates HR006 gezeigt wurde, keine Aussage über die zur Infektion bevorzugten Zielzellen zu.

6.4 Funktion des $\Delta 32$ -Deletionspolymorphismus

Samson et al., fanden 1996 bei Untersuchungen hinsichtlich der Infektion mit HIV-1 der Bevölkerungen von West- und Zentralafrika, sowie Japan heraus, dass eine Allelmutante des Chemokinrezeptores CCR5 ($\Delta 32$ -Deletion), mit einer hohen Allelfrequenz (0.092) in der kaukasischen Bevölkerung vorhanden ist, aber in der schwarzen Population fehlt. Aus dieser $\Delta 32$ -Deletion in der codierenden Region resultiert ein *frameshift*, aus dem ein nicht funktioneller Rezeptor entsteht, der wiederum die Fusion oder Infektion durch makrophago- oder dual-trope HIV-1-Stämme mit der Wirtszelle verhindert wird.

Um die Rolle der $\Delta 32$ -Deletion bei der HIV-1 Infektion und Krankheitsprogression weiter zu klären, untersuchten Huang et al., 1996 den CCR5-Genotyp von 1252 homosexuellen Männern in Chicago. Als Ergebnis zeigte sich, dass 3.6% der uninfizierten kaukasischen Männer homozygot für die $\Delta 32$ -Deletion waren, während keiner der infizierten Männer eine Homozygotie der $\Delta 32$ -Deletion aufwies. Daraus wurde geschlossen, dass das $\Delta 32$ Allel des CCR5 ein wichtiger Wirtszellfaktor bei der HIV-1 Transmission und Pathogenese ist.

Durch Untersuchungen von infizierten und uninfizierten Individuen konnte von Balotta et al., 1997 die Vermutung, dass aus einer $\Delta 32/\Delta 32$ Homozygotie des CCR5-Gens ein Schutz gegen eine HIV-1-Infektion resultiert, nicht bestätigt werden.

In diesem Zusammenhang untersuchten Meyer et al. 1997, 412 kaukasische Patienten, mit bekanntem Zeitpunkt der Serokonversion, auf das Vorhandensein der $\Delta 32$ -Deletion, um Rückschlüsse auf die Krankheitsprogression schließen zu können. Es zeigte sich, dass bei 17% der untersuchten Patienten die $\Delta 32$ -Deletion heterozygot (wt/ $\Delta 32$) vorlag. Nach Auswertung der Daten beobachtete Meyer folgendes:

- (i) es waren weniger symptomatische Primärinfektionen zu beobachten
- (ii) geringe Viruslast während der ersten 6-24 Monate zu verzeichnen
- (iii) CD4-Zellzahl entsprach der des Wildtyps
- (iv) bei gleicher Behandlung war die Wahrscheinlichkeit geringer an *Pneumocystis carinii* oder Toxoplasmose zu erkranken
- (v) während der ersten 7 Jahre zeigte sich eine geringere Progression zu AIDS (wenn "Kaplan-Meier Kurve" zugrunde gelegt wird).

Daraus folgerte man, dass eine vorhandene $\Delta 32$ -Deletion während der ersten Infektionsjahre vor einer schnellen Krankheitsprogression schützen kann. Weiterhin wurde davon ausgegangen, dass aus einer heterozygoten $\Delta 32$ -Deletion eine geringere Viruslast resultiert. Zu ähnlichen Ergebnissen kam Eugen-Olsen et al., 1997 der bei einer heterozygoten $\Delta 32$ -Deletion einen längeren AIDS-freien Zeitraum festgestellt hatte.

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, inwieweit $\Delta 32$ -Deletionen vorhanden sind und was für Auswirkungen diese auf den Krankheitsverlauf haben. Der Nachweis von $\Delta 32$ -Deletionen konnte mittels PCR erbracht werden. Wies das amplifizierte DNA-Stück eine Länge von 547 Basenpaaren auf, so handelte es sich um die Wildtypform. Bei einem Fragment von 515 Basenpaaren lag eine homozygote $\Delta 32$ -Deletion im CCR5-Gen vor. Bei der heterozygoten Form wurden zwei Banden (547bp und 515bp) im Agarosegel sichtbar.

Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich (Abbildung 5.10/Ergebnisse 5.4.3), dass nur die Zellen des Isolates HR014 eine $\Delta 32$ -Deletion in heterozygoter Form aufwiesen (wt/ $\Delta 32$). Alle anderen Patientenzellen der getesteten Isolate wiesen den Wildtyp (wt/wt) auf. Obwohl auch andere Autoren (Dean et al., 1996) der Ansicht sind, dass eine heterozygote $\Delta 32$ -Deletion des CCR5-Gens Hinweise auf eine verminderte Krankheitsprogression geben, konnte dies nicht durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden.

Vergleicht man die Viruslastdaten des Isolates HR014 mit denen der Folgeprobe HR014-II (Tabelle 5.2, Ergebnisse 5.2.1), so zeigt sich eine Verdopplung der Viruslast innerhalb von 7 Monaten auf >200.000Kopien/ml. Eine geringe Viruslast während der ersten 6-24 Monate, wie von Meyer et al. beobachtet, ist hier nicht zu verzeichnen.

Die Beobachtungen im Falle der infizierten Zellen des Isolates HR014 stützen die Vermutung, dass der $\Delta 32$ -Deletionspolymorphismus keine Rolle als prognostischer Marker beim Verlauf einer HIV-Erkrankung spielt. Genauer, trotz CCR5-Heterozygotie kann es zu einem Anstieg der Viruslast kommen. Ähnliche Aussagen wurden 1996 von Huang et al. getroffen, der auch keine Hinweise auf eine heterozygote Schutzfunktion im Rahmen seiner Experimente gefunden hatte.

7 Zusammenfassung

Das Thema der vorliegenden Promotion ist die Aufklärung von Neutralisationsmechanismen auf Lymphozyten und Makrophagen unterschiedlicher primärer HIV-1-Subtypen im Verlauf der Krankheitsprogression.

Ausgangspunkt für die Experimente war die Tatsache, dass humane Seren von HIV-1 infizierten Patienten bereits kurz nach der Serokonversion autologe Virusisolate auf Makrophagen, nicht aber auf Lymphozyten neutralisieren können (Ruppach et al., 2000).

Bei Neutralisationsexperimenten mit einem dem V3-loop des gp120 komplementären P1-Peptids (Subtyp B), sollte der Nachweis von neutralisierenden Antikörper im Serum erbracht werden. Weiterhin sollte gezeigt werden, inwieweit die Neutralisation auf Makrophagen durch V3-Antikörper begründet ist (Kapitel 5.3.3).

Nach erfolgter Neutralisation auf Makrophagen mit und ohne P1-Peptidvorinkubation konnte gezeigt werden, dass es zu keinen Veränderungen im Neutralisationsverhalten durch Vorinkubation mit einem V3-Peptid gekommen ist. Die Serumantikörper konnten ungehindert an das HI-Virus binden und die autologen Patientenviren auf Makrophagen neutralisieren (Tabellen 5.6 und 5.7, sowie Abbildung 5.2). Daraus ließ sich folgern, dass es nicht die V3-Antikörper sind, die eine Neutralisation auf Makrophagen hervorrufen.

Als nächstes wurde das Neutralisationsverhalten des Isolates HR006 und einer späten Folgeprobe (HR006-IV) durch autologes Serum auf Lymphozyten und auf Makrophagen verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl Ursprungs- wie auch Folgeisolat auf Makrophagen eine große Neutralisationsaktivität zeigen, die auf Lymphozyten fehlt.

Um besser eingrenzen zu können, welche Antikörper bei Neutralisationsreaktionen auf Makrophagen eine Rolle spielen, wurden IgG's aus dem Serum des Patienten HR006 isoliert (Abbildung 5.1/Kapitel 5.3.1), in Fab-Fragmente gespalten (Escribano et al., 1979) und auf einem SDS-PAGE sichtbar gemacht. Mit den isolierten Immunglobulinen wurden daraufhin Neutralisationsexperimente durchgeführt. Wie Abbildung 5.6 zeigt, können autologe IgG's auf Makrophagen bei dem Virusisolat des Patienten HR006 eine Neutralisationsreaktion herbeiführen.

Dabei konnte das Isolat HR006 von seinen autologen IgG's auf den Spendermakrophagen B1 zu 85% neutralisiert werden. Es ist somit davon auszugehen, dass es die Serum-IgG's sind, die eine Neutralisation auf Makrophagen auslösen können.

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob autologe Immunglobuline in der Lage sind, heterologe Virusisolate zu neutralisieren. Um die Kreuzneutralisationsfähigkeit auf Makrophagen zu testen wurden unterschiedliche Viren (HR006-IV, HR014 und HR011) mit verschiedenen Seren und isolierten Immunglobulinen getestet. Als Ergebnis zeigte sich, dass im Test unterschiedlicher Subtypen, es zu einer hohen Kreuzneutralisationsaktivität gekommen war. Wie in Tabelle 5.13 (Kapitel 5.3.9) sichtbar, können Serumantikörper verschiedener Patienten heterologe Virusisolate mit bis zu 99% auf Makrophagen neutralisieren. Dabei spielt der Subtyp keine Rolle. Im gleichen Experiment konnte auch gezeigt werden, dass isolierte IgG's der 4. Folgeprobe des Patienten HR006 die Viren des Patienten HR014 zu 89% neutralisieren vermögen.

Als nächstes wurde die Rolle der Chemokinrezeptoren in Bezug auf Infektion und Krankheitsprogression der Isolate, untersucht. Der Chemokinrezeptor-Tropismus der Patientenisolate zeigte, dass alle Isolate CCR5 und zwei Isolate zusätzlich CXCR4 zur Infektion von Zielzellen benutzen können (Tabelle 5.15/Kapitel 5.4.2). Vereinfacht, alle Isolate können Lymphozyten und Makrophagen infizieren, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität. Allerdings konnte anhand der Ergebnisse gezeigt werden, dass weder eine phänotypische Einteilung, noch eine Einteilung der Isolate mit Hilfe von Chemokin-rezeptoren, eine Aussage über die Infektionskinetik zulässt. Auch eine heterozygote $\Delta 32$ -Deletion im CCR5-Gen der Zellen der Patientenprobe HR014, ergab keinen Hinweis auf eine schlechtere Krankheitsprogression. Genauer, spielt in diesem Fall der $\Delta 32$ -Deletions-polymorphismus keine Rolle, als prognostischer Marker, im Verlauf der Erkrankung.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass im Verlauf der Promotion gezeigt werden konnte, dass mit großer Wahrscheinlichkeit Serum IgG's für die Neutralisation auf Makrophagen verantwortlich sind und das diese kreuzneutralisierende Eigenschaften besitzen. Die in der Literatur beschriebene ausschließliche Nutzung von bestimmten Chemokinrezeptoren für SI und NSI Isolate konnte bei den hier verwendeten Primärisolaten jedoch widerlegt werden.

8 Literaturverzeichnis

- Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P., McClanahan T, et al.. 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387:713-717
- Ahmad A, Menezes J. 1995. Positive correlation between the natural killer and gp 120/41-specific antibody-dependent cellular cytotoxic effector functions in HIV-infected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 10: 115-119
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J D. 1986. Molekularbiologie der Zelle. 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-1958
- Altfeld M, Rosenberg ES, Shankarappa R, Mukherjee JS, Hecht FM, Eldridge RL, Addo MM, Poon SH, Phillips MN, Robbins GK, Sax PE, Boswell S, Kahn JO, Brander C, Goulder PJ, Levy JA, Mullins JI, Walker BD. 2001. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 193 (2): 169-180.
- Andreesen R, Bross KJ, Osterholz J, Emmrich F. 1986. Human macrophage maturation and heterogeneity: analysis with a newly generated set of monoclonal antibodies to
- Armstrong SJ, McInerney TL, McLain L, Wahren B, Hinkula J, Levi M, Dimmock NJ. 1996. Two neutralizing anti-V3 monoclonal antibodies act by affecting different functions of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 77: 2931-2941
- Asjö B, Albert J, Karlsson A, Morfeldt-Månson L, Biberfeld G, Lidman K, Fenyö EM. 1986. Replicative properties of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* II: 660-662
- Ayoub A, Souquieres S, Njinku B, Martin PM, Müller-Trutwin MC, Roques P, Barre-Sinoussi F, Mauclore P, Simon J, Nerrienet E. 2000. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* 14: 2623-2625
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B. 1997. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 675-705
- Balotta C, Bagnarelli P, Violin M, Ridolfo AL, Zhou D, Berlusconi A, Corvasce S, Corbellino M, Clementi M, Clerici M, Moroni M, Galli M. 1997. Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1-infected patient. *AIDS* 11: 67-71
- Baltimore D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 226: 1209-1211
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252
- Barratt-Boyes SM, Watkins SC, Finn OJ. 1997. In vivo migration of dendritic cells differentiated in vitro: a chimpanzee model. *J. Immunol.* 158:4543-4547

- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blein C, Brun-Vezinet F, Rozioux C, Rozenbaum W, Montagnier. 1993. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871
- Bazan HA, Alkhatib G, Broder CC, Berger EA. 1998. Patterns of CCR5, CXCR4, and CCR3 usage by envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *J. Virol.* 72: 4485-4491
- Beddows S, Louisirirochanakul S, Cheingsong-Popov R, Easterbrook PJ, Simmonds P, Weber J. 1998. Neutralization of primary and T-cell line adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1: role of V3-specific antibodies. *J. Gen. Virol.* 79: 77-82
- Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT. 1997. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by CCR5delta32. *J. Biol. Chem.* 272: 30603-30606
- Berger EA, Doms RW, Fenyö EM, Korber BTM, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391: 240
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 657-700
- Binley JM, Klasse PJ, Cao YZ, Jones I, Markowitz M, Ho DD, Moore JP. 1997. Differential regulation of antibody response to Gag and Env proteins of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 71: 2799-2809
- Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, Albert J, Scarlatti G, Littman DR, Fenyö EM. 1997. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J. Virol.* 71: 7478-7487
- Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulate on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1925-1930
- Bobkov A, Cheingsong-Popov R, Garaev M, Rzhaininova A, Mullins J, McCutchan F, Weber J. 1994. Identification of the new HIV-1 H subtype in Russia. *Int. Conf. AIDS* 10:65 (abstract no. 213C)
- Bobkov A, Cheingsong-Popov R, Garaev M, Rzhaininova A, Kaleebu P, Beddows S, Bachmann MH, Mullins JI, Louwagie J, Janssens W, Van der Groen G, McCutchan FE, Weber J. 1994. Identification of an env G subtype and heterogeneity of HIV-1 strains in the Russian Federation and Belarus. *AIDS* 8: 1649-1655
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MBA. 1994. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 68: 6103-6110
- Bou-Habib DC, Roderiquez G, Oravec T, Berman PW, Lusso P, Norcross MA. 1994. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J. Virol.* 68: 6006-6013
- Boyum A. 1986. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Invest.* 21, Suppl. B: 9

- Brother MB, Shang HK, Lisziewicz J, et al. 1996. Block of Tat-mediated transactivation of tumor necrosis factor beta gene expression by polymeric-TAR decoys. *Virology* 222: 252-256
- Brown AJL. 1991. Sequence variability in human immunodeficiency viruses: pattern and process in viral evolution. *AIDS* 5 (suppl. 2): 35-42
- Brugger W, Reinhardt D, Galanos C, Andreesen R. 1991. Inhibition of in vitro differentiation of human monocytes to macrophages by lipopolysaccharides (LPS): phenotypic and functional analysis. *Int. Immunol.* 3: 221-227
- Bruisten SM, Frissen PH, Van Swieten P, Harrigan PR, Kinghorn I, Larder B, Weigel HM, De Vries E, Regez RM, Henrichs JH, Koot M, Huisman JG. 1997. Prospective longitudinal analysis of viral load and surrogate markers in relation to clinical progression in HIV type 1-infected persons. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13: 327-335
- Bryant M, Ratner L. 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:523-527
- Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 8: 1123-1128
- Burton DR and Montefiori DC. 1997. The antibody response in HIV-1 infection. *AIDS* 11 (Suppl. A): 87-98
- Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* 249: 1555-1558
- Camerini D, Seed B. 1990. A CD4 domain important for HIV-mediated syncytium formation lies outside the virus binding site. *Cell* 60: 747-751
- Cao Y, Dieterich D, Thomas PA, Huang Y, Mirabile M, Ho DD. 1992. Identification and quantitation of HIV-1 in the liver of patients with AIDS. *AIDS* 6: 65-70
- Carr JK, Foley B, Leitner T, Dalminen M, Korber BT, McCutchan FE. 1998. Reference sequences representing the principal genetic diversity of HIV-1 in the pandemic. In: *Human Retroviruses and AIDS*. Edited by Los Alamos National Laboratory, Los Alamos NM Part III.
- Cavalli-Sforza L. 1974. Biometrie Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. Gustav Fischer Verlag Stuttgart. S. 171-173
- Centers for Disease Control (CDC). 1981a. Pneumocystis pneumonia - Los Angeles. *Morb. Mort. Wkly. Rep.* 30: 250-252
- Centers for Disease Control (CDC). 1981b. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York and California. *Morb. Mort. Wkly. Rep.* 30: 305-308
- Centers for Disease Control (CDC). 1982. Possible transfusion-associated immunodeficiency syndrome (AIDS) - California. *Morb. Mort. Wkly. Rep.* 35: 652-654
- Chaowanachan T, Young NL, Limpakarnjanarat K, Ungchusak K, Wasinrapee P, Pau CP, Kaewpant N, Suksripanich C, Mastro TD. 1998. Surveillance trends of HIV-1 subtypes B and E throughout Thailand, 1992-1997. *Int. Conf. AIDS* 12:112 (abstract no. 13134)

- Charneau P, Borman AM, Quillent C, Guét D, Chamaret S, Cohen J, Rémy G, Montagnier L, Clavel F. 1994. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* 205: 247-253
- Choe H, Farzan M, Sun Yy, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Macday CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. 1996. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85: 1135-1148
- Clapham PR, Blanc D, Weiss RA. 1991. Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus type 1 and 2 and by Simian immuno-deficiency virus. *Virology* 181: 703-715
- Cochran A, Wilson BA. 1999. Current management of AIDS and related opportunistic infections. *Medsurg. Nurs.* 8: 257-264
- Coffin JM. 1986. Genetic variation in AIDS viruses. *Cell* 46: 1-4
- Cohen AH, Sun NCJ, Shapshak P, Imagawa DT. 1989. Demonstration of human immunodeficiency virus in renal epithelium in HIV-associated nephropathy. *Mod. Pathol.* 2: 125-128
- Combadiere C, Ahufa SK, Tiffany HL, Murphy PM. 1996. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1 (alpha), MIP-1 (beta), and RANTES. *J. Leukoc. Biol.* 60: 147-152
- Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. 1993. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immuno-deficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 67: 1772-1777
- Connor RI, Paxton WA, Sheridan KE, Koup RA. 1996. Macrophages and CD4+ T lymphocytes from two multiply exposed, uninfected individuals resist infection with primary non-syncytium-inducing isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70: 8758-8756
- Connor RI, Sheridan KE, Cersdini D, Choe S, Landau NL. 1997. Changes in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J. Exp. Med.* 185: 621-628
- Corbet S, Müller-Trutwin MC, Versmisse P, Delarue S, Ayoub A, Lewis J, Brunak S, Martin P, Brun-Vezinet F, Simon F, Barre-Sinoussi F, Mauciere P. 2000. Env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J. Virol.* 74:529-534
- Cornelissen M, Van den Burg R, Zorgdrager F, Goudsmit J. 1999. The rooted position of subtype G among the HIV-1 group M viruses and evidence for A/G recombination to overcome fitness loss. *Conf. Retroviruses Opportunistic Infect.* 81 (abstract no. 77)
- Cozzi Lepri A, Sabin CA, Phillips AN, Lee CA, Pezzotti P, Rezza G. 1998. The rate of CD4 decline as a determinant of progression to AIDS independent of the most recent CD4 count. The Italian seroconversion study. *Epidemiol. Infect.* 121: 369-376
- Crofton RW, Diesselhoff-den Dulk MMC, Van Furth R. 1978. The origin, kinetics and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J. Exp. Med.* 148: 1-17

- Curtis BM, Scharnowske S, Watson AJ. 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:8356-8360
- Daar ES, Moudgil T, Meyer AD, Ho DD. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324: 961-964
- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-767
- Daniel V, Susal C, Weimer R, Zipperle S, Kropelin M, Zimmermann R, Huth-Kuhne A, Opelz G. 1996. Association of T cell dysfunction with the presence of IgG autoantibodies on CD4+ lymphocytes in haemophilia patients; result of a 10-year study. *Clin. Exp. Immunol.* 104: 4-10
- Davies K. 1988. *Genome analysis: A Practical Approach.* Oxford University Press, Oxford
- De Boer RJ, Perelson AS. 1998. Target cell limited and immune control models of HIV infection: a comparison. *J. Theor. Biol.* 190: 201-214
- De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J. Virol.* 66: 6777-6780
- De Maria A, Pantaleo G, Schnittman SM, Greenhouse JJ, Baseler M, Orenstein JM, Fauci AS. 1991. Infection of CD8+ T lymphocytes with HIV. Requirement for interaction with infected CD4+ cells and induction of infectious virus from chronically infected CD8+ cells. *J. Immunol.* 146: 2220-2226
- Desrosiers RC, Lifson JD, Gibbs JS, Czajak SC, Howe AYM, Arthur LO, Johnson RP. 1998. Identification of highly attenuated mutants of Simian Immunodeficiency Virus. *J. Virol.* 72: 1431-1437.
- De Wolf F, Hogervorst E, Goudsmit J, Fenyö E-M, Rübsamen-Waigmann H, Holmes H, Galva-Castro B, Karita E, Wasi C, Sempala SDK, Baan E, Zorgdrager F, Lukashov V, Osmanov S, Kuiken C, Cornelissen M, and the WHO Network for HIV isolation and characterization. 1994. Syncytium-inducing and non-syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes other than B: phenotypic and genotypic characteristics. *AIDS Res. and Hum. Retroviruses* 10: 1387-1340
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Dornfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study, O'Brien SJ. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science* 273: 1856-1862

- Della-Porte AJ and Westaway EG. 1977. A multi-hit model for the neutralization of animal viruses. *J. Gen. Virol.* 38: 1-19
- Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rübsamen-Waigmann H, Mullins JI. 1993. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility analysis of HIV-1 env genes. *Science* 262: 1257-1261
- Delwart EL, Shpaer EG, Mullins JI. 1994. Heteroduplex Mobility Assays for phylogenetic analysis. PCR protocols. Academic Press, San Diego.
- Delwart EL, Sheppard HW, Walker BD, Goudsmit J, Mullins JI. 1994. HIV-1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assays. *J. Virol.* 68: 6672-6683
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, DiMarzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666
- Dietrich U, Gretz M, von Briesen H, Panhans B, Geibendorfer M, Kühnel H, Maniar J, Mahambre G, Becker WB, Becker MLB, Rübsamen-Waigmann H. 1992. HIV-1 strains from India are highly divergent from prototypic African and US/European strains but are linked to a South African isolate. *J. AIDS.* 7: 23-27
- Dietrich U, Ruppach H, Gehring S, Knechten H, Knickmann M, Jäger H, Wolf E, Husak R, Orfanos HD, Brede H, Rübsamen-Waigmann H, von Briesen H. 1997. Large proportion of non-B HIV-1 subtypes and presence of zidovudine resistance mutations among German seroconvertors. *AIDS* 11: 1532-1533
- Dimitrov DS, Hillman K, Manischewitz J, Blumenthal R, Golding H. 1992. Kinetics of sCD4 binding to cells expressing HIV-1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 66: 132-138
- Dimmock NJ. 1993. Neutralization of animal viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 183: 1-149
- Dimmock NJ. 1995. Update on the neutralization of animal viruses. *Rev. Med. Virol.* 5: 165-179
- Dittmar MT, Simmons G, Hibbitts S, O'Hare M, Louisirirothanakul S, Bedows S, Weber J, Clapham PR, Weiss RA. 1997. Langerhans cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 subtype A through F isolates derived from different transmission groups. *J. Virol.* 71: 8008-8013
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85: 1149-1158
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PF, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381: 667-673
- Dulbecco R, Freemann G. 1959. *Virology* 8: 396
- Dumitrescu O, Kalish ML, Kliks SSC, Bandea CI, Levy JA. 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolates from children in Romania: Identification of a new envelope subtype. *J. Infect. Dis.* 169: 281-288

- Eisert V, Kreutz M, Becker K, Königs C, Alex U, Rübsamen-Waigmann H, Andreesen R, von Briesen H. 2001. Analysis of cellular factors influencing the replication of human immunodeficiency virus type 1 in human macrophages derived from blood of differential healthy donors. *Virology* 286:31-44
- Erlich HA. 1989. PCR Technology. Stockton Press, New York.
- Escribano M. J. 1979. *Immunol. Lett.* 1:147
- Esser R, von Briesen H, Brugger W, Ceska M, Glienke W, Müller S, Rehm A, Rübsamen-Waigmann H, Andreesen R. 1991. Secretory repertoire of HIV-infected human monocytes/macrophages. *Pathobiology* 59: 219-222
- Eugen-Olsen J, Iversen AKN, Garred P, Koppelhus U, Pedersen C, Benfield TL, Sorensen AM, Katzenstein T, Dickmeiss E, Gerstoft J, Skinhøj, Svejgaard A, Nielsen JO, Hofmann B. 1997. Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS* 11: 305-310
- Fauci AS. 1993. Immunopathogenesis of HIV infection. *Ann. NY Acad. Sci.* 685: 409-419
- Feinberg MB, Baltimore D, Frankel AD. 1991. The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4045-4049
- Feng S, Holland EC. 1988. HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* 334: 165-167
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877
- Fenyö EM, Morfeldt-Månson L, Chiodi F, Lind B, von Gegerfelt A, Albert J, Olausson E, Asjö B. 1988. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J. Virol.* 62: 4414-4419
- Fortin JF, Cantin R, Bergeron MG, Tremblay MJ. 2000. Interaction between virion-bound host intercellular adhesion molecule-1 and the high-affinity state of lymphocyte function-associated antigen-1 on target cells renders R5 and C4 isolates of human immunodeficiency virus type 1 more refractory to neutralization. *Virology* 268: 493-503
- Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H. 1992. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 molecule. *J. Virol.* 66: 3183-3187
- Fouts TR, Binley JM, Trkola A, Robinson JE, Moore JP. 1997. Neutralization of the human immunodeficiency virus type 1 primary isolate JR-FL by human monoclonal antibodies correlates with antibody binding to the oligomeric form of the envelope glycoprotein complex. *J. Virol.* 71: 2779-2785
- Francis DP, Gregory T, McElrath MF, Belshe RB, Gorse GJ, Migasena S, Kitayaporn D, Pitisuttitham P, Matthews T, Schwartz DH, Berman PW. 1998. Advancing AIDSVAX to phase 3. Safety, immunogenicity, and plans for phase 3. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 3: 325-331

- Freed EO, Myers DJ, Risser R. 1991. Identification of the principal neutralizing determinant of human immunodeficiency virus type 1 as a fusion domain. *J. Virol.* 65: 190-194
- Gallay P, Swingler S, Song J, et al. 1995. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 83: 569-576
- Gallo RC. 1987. Das AIDS-Virus. *Spektrum der Wissenschaft* 3: 82-93
- Gao F, Yue L, Hill SC, Robertson DL, Graves AH, Saag MS, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. 1994. HIV-1 sequence subtype D in the United States. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 10: 625-627
- Garcia JV, Miller AD. 1992. Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res. Virol.* 143: 52-55
- Gartner S, Markovitz P, Markovitz DM. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233: 215-219
- Geijtenbeek TBH, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. 2000. Identification of DC-sign, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100: 575-585
- Gelderblom HR. 1985. Assembly and morphology of HIV: Potential effect of structure on function. *AIDS* 5: 617-638
- Gendelman HE, Orenstein JM, Baca LM, Weiser B, Burger H, Kalter DC, Meltzer MS. 1989. The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV-1 infection. *AIDS* 3: 475-495
- Goff S. 1990. Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 3: 817-831
- Gothlin G, Ericsson JLE. 1976. The osteoclast: review of ultrastructure, origin and structure-function relationship. *Clin. Orthop.* 120: 201-211
- Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5781-5785
- Goudsmit JC, Debrouck C, Melen RH et al. 1988. Human immunodeficiency virus neutralization epitope with conserved architecture elicits type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4478-4482
- Goulder PJ, Bunce M, Krausa P, McIntyre K, Crowley S, Morgan B, Edwards A, Giangrande P, Phillips RE, McMichael AJ. 1996. Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12: 1691-1698
- Granelli-Piperno A, Finkel V, Delgado E, Steinman RM. 1999. Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells. *Curr. Biol.* 9:21-29
- Gross PA, Asch S, Kitahata MM, Freedberg KA, Barr D, Melnick DA, Bozette SA. 2000. Performance measures for guidelines on preventing opportunistic infections in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 30: 85-93

- Gürtler L, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zenkeng L, Tsague JM, Kaptue L. 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MPV 5180) from Cameroon. *J. Virol.* 68: 1581-1585
- Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L. 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MPV-5180) from Cameroon. *J. Virol.* 68: 1581-1585
- Haas G, Hosmalin A, Hadida F, Duntze J, Debre P, Autran B. 1997. Dynamics of HIV variants and specific cytotoxic T-cell recognition in nonprogressors and progressors. *Immunol. Lett.* 57: 63-68
- Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N. 1985. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-1-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 229: 563-566
- Harrison GP, Lever AM. 1992. The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J. Virol.* 66: 4144-4153
- Haskill S, Johnson C, Eiermann D, Becker S, Warren K. 1988. Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and protooncogenes. *J. Immunol.* 140: 1690-1694
- Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, et al. 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7311-7315
- Helm EB. 1999. Die HIV-Krankheit. *Centers For Disease Control*. Folgelieferung 1999.
- Hickey WF, Kimura H. 1988. Perivascular microglia cells of CNS are bone marrow derived and present antigen in vivo. *Science* 239: 290-292
- Hirsch MS and Curran J. 1990. Human immunodeficiency viruses. *Virology* (edited by BN Fields, DM Knipe, RM Chaddock, MS Hirsch, JL Melnick, TP Monath, P Roizman), 2. Auflage, Raven Press Ltd. New York.
- Hooper KE, Wood PR, Nelson DS. 1979. Macrophage heterogeneity. *Vox. Sang.* 36: 257-274
- Housset C, Boucher O, Girard PM, Leibowitch J, Saimont AG, Brechot C, Marche C. 1990. Immunohistochemical evidence for human immunodeficiency virus-1 infection of liver Kupfer cells. *Hum. Pathol.* 21: 404-408
- Huang YX, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang LQ, He T, Kang S, Ceradini D, Jin ZQ, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA. 1996. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Med.* 2: 1240-1243
- Hughes RA, Macatonia A, Rowe IF, Keat ACS, Knight SC. 1990. The detection of human immunodeficiency virus DNA in dendritic cells from the joints of patients with aseptic arthritis. *Br. J. Rheum.* 29: 166-170
- Hume DA, Halpin D, Charlton H, Gordon S. 1984. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization antigen F4/80: Macrophages of endocrine organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4174-4177
- Innis MA., Gelfand DH., Sninsky A. 1994. Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion. G. Fischer, Stuttgart

- Jaffar S, Wilkins A, Ngom PT, Sabally S, Corrah T, Bangali JE, Rolfe M, Whittle HC. 1997. Rate of decline of percentage CD4+ cells is faster in HIV-1 than in HIV-2 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retroviral.* 16: 327-332
- Janeway CA, Travers P. 1996. Immunobiology. London and New York, Current Biology, Garland.
- Janssens W, Heyndryckx L, Fransen K, Motte J, Peeters M, Nkengasong JN, Ndumbe PM, Delaporte E, Perre J-L, Atende C, Piot P, Van der Groen G. 1994. Genetic and phylogenetic analyses of env subtypes G and H in Central Africa. *AIDS Res Hum Retro-viruses* 10: 877-879
- Javaherian J, Langlois AJ, McDanal C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL, Profy AT, Rusche JR, Bolognesi DP, Putney SD, Matthews TJ. 1989. Principle neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6768-6772
- Jowett JB, Planelles V, Poon B, et al. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J. Virol.* 69: 6304-6313
- Kao SY, Calman AJ, Luciw PA, et al. 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 330: 489-493
- Kaplan JE, Masur H, Golmes KK, et al. 2000. An overview of the 1999 US Public Health Service/Infectious Disease Society of American guidelines for preventing opportunistic infections in human immunodeficiency virus infected persons. *Clin. Infect. Dis.* 30: 15-28
- Karnovsky ML, Lazdins JK. 1978. Biochemical criteria for activated macrophages. *J. Immunol.* 121: 809-813
- Keay S, Wicksler W, Wasserman SS, Margolick J, Farzadegan. 1995. Association between anti-CD4 antibodies and a decline in CD4+ lymphocytes of human immunodeficiency virus type 1 seroconverters. *J. Infect. Dis.* 171: 312-319
- Khalife J, Guy B, Capron M, Kieny M-P, Ameisen J-C, Mantagnier L, Lecocq J-P, Capron A. 1988. Isotypic restriction of the antibody response to human immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 4: 3-9
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gurest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* 312: 767-771
- Klenerman P, Phillips RE, Rinaldo CR, Wahl LM, Ogg G, May RM, McMichael AJ, Nowak MA. 1996. Cytotoxic T lymphocytes and viral turnover in HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15323-15328
- Klietmann W. 1990. AIDS: Forschung, Klinik, Praxis, soziokulturelle Aspekte. Schattauer, Stuttgart
- Klimkait T, Strebel K, Hoggan MA, et al. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is require for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* 64: 621-629
- Knippers R, Philippsen P, Schäfer KP, Fanning E. 1990. Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag. Stuttgart

- Koch MG. 1987. AIDS - Vom Molekül zur Pandemie. Spektrum der Wissenschaft Verlag. Heidelberg
- Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, Janota R, Aksamed A, Martin MA, Fauci AS. 1986. Detection of AIDS virus in macrophage in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233:1089
- Koup RA, Safrit JT, Cao YZ, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* 68: 4650-4655
- Kreutz M, Eisert V, Rübsamen-Waigmann H, Andreesen R, von Briesen H. 1998. Restricted HIV type 1 replication under serum-free culture conditions in human monocyte-derived macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 14:1581-1588
- Kühnel H, von Briesen H, Dietrich U, Adamski M, Mix D, Bieser L, Kreutz R, Immelmann A, Henco K, Meichsner C, Andreesen R, Gelderblom H, Rübsamen-Waigmann H. 1989. Molecular cloning of two West African human immunodeficiency virus type 2 isolates that replicate well on macrophages: a Gambian isolate, from a patient with neurologic acquired immuno-deficiency syndrome and a highly divergent Ghanian isolate. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86:2383-2387
- Kusumi K, Conway B, Cunningham S, Berson A, Evans C, Iversen AKN, Colvin D, Gallo MV, Coutre S, Shpaer EG, Faulkner DV, de Ronde A, Volkman S, Williams C, Hirsch MS, Mullins JI. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 envelope gene structure and diversity in vivo and after cocultivation in vitro. *J. Virol.* 66: 875-885
- Laemmli UK, 1970. *Nature* 227: 680
- LÁge-Stehr J und Helm EB. 1995. AIDS und die Vorstadien - Ein Leitfaden für Klinik und Praxis. Springer Verlag
- LaRosa GJ, Davide JP, Weinhold K, Waterbury JA, Profy AT, Lewis JA, Langlois AJ, Dreesman GR, Boswell N, Shaddock P, Holley H, Karplus M, Bolognesi DP, Matthews TJ, Emini EA, Putney SD. 1990. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* 249: 923-935
- Lasser A. 1983. The mononuclear phagocytic system: A review. *Hum. Pathol.* 14: 108-126
- Laukkanen T, Carr JK, Janssens W, Liitsola K, Gotte D, McCutchan FE, Op de Coul E, Cornelissen M, Heyndrickx L, Van der Groen G, Salminen MO. 2000. Virtually full-length subtype F and F/D recombinant HIV-1 from Africa and South America. *Virology* 269: 95-104
- Luria S, Chambers I, Berg P. 1991. Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevent antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5326-5330
- Layne SP, Merges MJ, Dembo M, Spouge JL, Conley SR, Moore JP, Raina JL, Renz J, Gelderblom HR, Nara PL. 1992. Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology* 189: 695-714

- Leondios KG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitrioz D, Ho DD. 1995. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated I. *J. Virol.* 69: 6122-6130
- Levy JA. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* 57: 183-289
- Lewis P, Hensel M, Emerman M. 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J.* 11: 3053-3058
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Maritn SR, Horuk R, Macdonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86: 367-377
- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombinant. *J. Virol.* 73: 152-160
- Lori F, Scovassi AI, Zella S, Achilli LG, Cattaneo E, Casoli C, Berazzoni U. 1988. Enzymatically active forms of reverse transcriptase of the human immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 4: 393-398
- Louwagie J, McCutchan F, Peeters M, Brennan T, Sanders-Buell E, Eddy G, Van der Groen G, Fransen K, Gershy-Damet G, Deleys R. 1993. Phylogenetic analysis of gag gens from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* 7: 769-780
- Louwagie J, McCutchan F, Van der Groen G, Peeters M, Fransen K, Piot P, Gershy-Damet G-M, Roelants G, Van Heuverswyn H, Eddy G, Ungar B, Burke D. 1992. Genetic comparison of HIV-1 isolates from Africa, Europe, and North America. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 1467-1469
- Mackewicz CE, Yang LC, Lifson JD, Levy JA. 1994. Non cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary HIV-1 infection. *Lancet* 344: 1671-1673
- Mathijs JM, Hing MC, Grierson J, Dwyer DE, Goldschmidt C, Cooper DA, Cunningham AL. 1988. HIV infection of rectal mucosa. *Lancet* i: 1111
- McDougal JS, Kennedy MS, Orloff SL, Nicholson JK, Spira TJ. 1996. Mechanisms of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) neutralization: irreversible inactivation of infectivity by anti-HIV-1 antibody. *J. Virol.* 70: 5236-5245
- McInerney TL, McLain L, Armstrong SJ, Dimmock NJ. 1997. A human IgG1 (b12) specific for the CD4 binding site of HIV-1 neutralizes by inhibiting the virus fusion entry process, but b12 Fab neutralizes by inhibiting a post-fusion event. *Virology* 233: 313-326
- McKeating JA, Bennett J, Zolla-Pazner S, Schutten M, Ashelford S, Brown AL, Balfe P. 1993a. Resistance of a human serum-selected human immunodeficiency virus type 1 escape mutant to neutralization by CD4 binding site monoclonal antibodies is conferred by a single amino acid change in gp120. *J. Virol.* 67: 5216-5225
- McKeating JA, McKnight A, Moore JP. 1991. Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: Effects on infectivity and neutralization. *J. Virol.* 65: 852-860

- McKeating JA, Shotton C, Cordell J, Graham S, Balfe P, Sullivan N, Charles M, Page M, Bolmstedt A, Olofsson S, Dayman SC, Wu Z, Pinter A, Dean C, Sodroski J, Weiss RA. 1993b. Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to linear and conformation dependent epitopes within the first and second variable domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* 67(8): 4923-4944
- McLain L and Dimmock NJ. 1994. Single- and multi-hit kinetics of immunoglobulin G neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 75: 1457-1460
- McNearney T, Hornickova Z, Markham R, Birdwell A, Arens M, Saah A, Ratner L. 1992. Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10247-10251
- McPherson M J, Quirke P, Taylor GR. 1991. PCR: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford
- Mellors JW, Rinaldo CR jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272: 1167-1170
- Meyenhofer MF, Epstein FLG, Cho E-S, Sharer LR. 1987. Ultrastructural morphology and intracellular production of human immunodeficiency virus (HIV) in brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46: 474-484
- Meyer L, Magierowska M, Hubert JB, Rouzioux C, Deveau C, Sanson F, Debre P, Delfraissy JF, Theodorou I and the SEROCO Study Group. 1997. Early protective effect of CCR-5 Δ 32 heterozygosity on HIV-1 disease progression: relationship with viral load. *AIDS* 11: F73-F78
- Meyerhans A, Cheynier R, Albert J, Seth M, Kwok S, Sninsky J, Morfeldt-Månson L, Asjö B, Wain-Hobson S. 1989. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 58: 901-910
- Meyers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith RF, Pavlakis GN. 1998. Human Retroviruses and AIDS. Los Alamos National Laboratory: Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico.
- Michael NL, Chang G, Louie LG, Mascola JR, Dandero D, Birx DL, Sheppard HW. 1997. The role of viral phenotype and CCR5-gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Med.* 3: 338-340
- Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, et al. 1994. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: A positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 179: 101-113
- Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F, Wolf H. 1987. Computer-assisted analysis of envelope protein sequence of seven human immunodeficiency virus isolates: Prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol.* 61: 570-578
- Mohanty JG, Rosenthal KS. 1985. A micropreparation of fluorescein conjugates of immunoglobulin G and Fab from serum. *Analytical Biochemistry* 146: 361-365
- Moog C, Fleury HJA, Pellegrin I, Kirn A, Aubertin AM. 1997a. Autologous and heterologous neutralizing antibody response following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 71: 3734-3741

- Moore JP, Cao Y, Qing L, Sattentau QJ, Pyati J, Koduri R, Robinson J, Barbas CF, Burton DR, Ho DD. 1995. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp 120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. *J. Virol.* 69: 101-109
- Moore JP, Cao YZ, Ho DD, Koup RA. 1994. Development of the anti-gp 120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 68: 5142-5155
- Moore JP, McKeating JA, Weiss RA, Sattentau QJ. 1990. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* 250: 1139-1142
- Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo RC 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193: 1007-1008
- Mori K, Yasutomi Y, Sawada S, Villinger F, Sugama K, Rosenwith B, Heeney JL, Überla K, Yamazaki S, Ansari AA, Rübsamen-Waigmann H. 2000. Suppression of Acute Viremia by Short-Term Postexposure Prophylaxis of Simian/Human Immuno-deficiency Virus SHIV-RT-Infected Monkeys with a Novel Reverse Transcriptase Inhibitor (GW 420867) Allows for Development of Potent Antiviral Immune Responses Resulting in Efficient Containment of Infection. *J. Virol.* 74: 5747-5753
- Mossinger J. 1991. In vitro cultivation of adult *Litomosoides carinii*: evaluation of basic culture media, gas phases and supplement. *Parasitology* 103:85-95
- Muster T, Steindkl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Rümer F, Kainger H. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67: 6642-6647
- Muster TR, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A, Steindl F, Palese P. 1994. Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDK-WAS. *J. Virol.* 68: 4031-4034
- Nara PL, Fischinger PJ. 1988. Quantitative infectivity assay for HIV-1 and -2. *Nature* 332: 469-470
- Nara PL, Garrity RR, Goudsmit J. 1991. Neutralization of HIV-1: a paradox of humoral proportions. *FASEB J.* 5: 2437-2455
- Newton CR, Graham A. 1994. PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- North RJ. 1978. The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.* 121: 806-809
- Novitsky VA, Montano MA, McLane MF, Renjifo B, Vannberg F, Foley BT, Ndung'u TP, Rahman M, Makhema MJ, Marlink R, Essey M. 1999. Molecular cloning and phylogenetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C: a set of 23 full-length clones from Botswana. *J. Virol.* 73: 4427-4432
- Nyambi PN, Willema B, Janssens W, Fransen K, Nkengasong J, Peeters M, Vereecken K, Heyndrickx L, Piot, van der Groen G. 1997. The neutralization relationship of HIV type 1, HIV type 2, and SIVcpz is reflected in the genetic diversity that distinguishes them. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13: 7-17

- Pantaleo G, Demarest JF, Schacker T, Vaccarezza M, Cohen OF, Daucher M, Graziosi C, Schnittman SS, Quinn TC, Shaw GM, Perrin L, Tambussi G, Lazzarin LA, Sekaly RP, Soudeyns H, Corey L, Fauci AS. 1997. The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 254-258
- Parren P, Mondor I, Naniche D, Ditzel HJ, Klasse PJ, Burton DR, Sattentau QJ. 1998. Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by antibody to gp120 is determined primarily by occupancy of sites on the virion irrespective of epitope specificity. *J. Virol.* 72: 3512-3519
- Patterson BK, Landay A, Andersson J, Brown C, Behbahani H, Jiyamapa D, Burki Z, Stanlaslawski D, Czerniewski MA, Garcia P. 1998. Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission. *Am. J. Pathol.* 153: 481-490
- Paxton W, Connor RI, Landau NR. 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: Requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J. Virol.* 67: 7229-7237
- Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, Padian N, Braun JF, Kotler DP, Wolinsky SM, Koup RA. 1996. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposures. *Nature Med.* 2: 412-417
- Peeters M, Esu-Williams E, Vergne L, Montavon C, Mulanga-Kabeya C, Harry T, Ibranke A, Lesage D, Patre D, Delaporte E. 2000. Predominance of subtype A and G HIV type 1 in Nigeria, with geographical differences in their distribution. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16: 315-325
- Peeters M. 2000. Recombinant HIV Sequences: Their Role in the Global Epidemic. In: *Human Retroviruses and AIDS*. Edited by Los Alamos National Laboratory, Los Alamos NM
- Pinter A, Honnen WJ, Kayman SC, Trochev O, Wu Z. 1998. Potent neutralization of primary HIV-1 isolates by antibodies directed against epitopes present in the V1/V2 domain of HIV-1 gp120. *Vaccine* 16 (19): 1803-1811
- Planelles V, Jowett J, Chen ISY. 1995. HIV infection causes cell cycle arrest in CD4 cells. *Natl. Conf. Hum. Retroviruses Relat. Infect.* 2: 171
- Plata F, Garcia-Pons F, Ryter A, Lebargy F, Goodenow MM, Dat MHQ, Autran B, Mayaud C, 1990. HIV-1 infection of lung alveolar fibroblasts and macrophages in humans. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6: 979-986
- Pontesilli O, Carotenuto P, Kerkhof-Garde SR, Roos MT, Keet IO, Coutinho RA, Goudsmit J, Miedema F. 1999. Lymphoproliferative response to HIV type 1 p24 in long-term survivors of HIV type 1 infection is predictive of persistent AIDS-free infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15: 973-981
- Postlethwaite AE, Jackson BK, Beachey FH. 1982. Formation of multinucleated giant cells from human monocyte precursors: mediation by soluble protein from antigen and mitogen stimulated lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155: 168-178

- Poznansky M, Lever A, Bergeron L, et al. 1991. Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J. Virol.* 65: 532-536
- Pumaraola-Sune T, Navia BA, Cordon-Cardo C, Cho ES, Price RW. 1987. HIV antigen in the brains of patients with the AIDS dementia complex. *Ann. Neurol.* 21: 490-496
- Rana S, Besson G, Cook DG, Rucker J, Smyth RJ, Turner JD, Guo H-H, Du J-D, Peiper SC, Lavi E, Samson M, Libert F, Liesnard C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M, Collman RG. 1997. Role of CCR 5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from delta CCR5 mutation. *J. Virol.* 71: 3219-3227
- Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. 1996. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J. Biol. Chem.* 271: 17161-17166
- Rappersberger K, Gartner S, Schenk P, Stingl G, Groh V, Tschachler E, Mann DL, Wolff K, Konrad D, Popovic M. 1988. Langerhans's cells are an actual site of HIV-1 replication. *Intervirology* 29: 185-194
- Rasty S, Thatikunta P, Gordon J, et al. 1996. Human immunodeficiency virus tat gene transfer to the murine central nervous system using a replication-defective herpes simplex vector stimulates transforming growth factor beta 1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6073-6078
- Richetti M, Buc H. 1988. Reverse transcriptase and genomic variability: The accuracy of the reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242: 1171-1173
- Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads for development of AIDS. *Cell* 65: 651-662.
- Roberts JD, Bebenik K, Kunkel TA. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242: 1171-1173
- Rogel ME, Wu LI, Emerman M. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J. Virol.* 69: 882-888
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK. 1995. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Rottman JB, Ganley KP, Williams K, Wu L, Mackay CR, Ringler DJ. 1997. Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *Am. J. Pathol.* 151: 1341-1351
- Roy S, Delling U, Chen CH, et al. 1990. A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* 4: 1365
- Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M, Arthos J, Dybul M, Machado E, Cohn MA, Hoxie JA, Murphy PM, Fauci AS, Weissman D. 1998. Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J. Immunol.* 160: 3933-3941
- Ruben S, Perkins A, Purcell R, et al. 1989. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* 63: 1-8

- Rübsamen-Waigmann H, Becker WB, Knoth M, Helm EB, Brodt R, Brede HD. 1986a. Varianten in AIDS-assoziierten LAV/HTLV-III-Retroviren. *Münch. med. Wschr.* 128: 76-80
- Rübsamen-Waigmann H, Becker WB, Helm EB, Brodt R, Fischer H, Henco K, Brede HD. 1986b. Isolation of variants of lymphocytopathic retroviruses from the peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with ARC or AIDS. *J. Med. Virol.* 19:335-344
- Rübsamen-Waigmann H, Willems WR, Bertram V, von Briesen H. 1989. Reversal of HIV phenotype to fulminant replication on macrophages in perinatal transmission. *Lancet* II: 1155-1156
- Rübsamen-Waigmann H, von Briesen H, Holmes H, Björndal Å, Korber B, Esser R, Ranjbar S, Tomlinson P, Galvao-Gastro B, Karita E, Sempala S, Wasi C, Osmanov S, Fenyo EM and the WHO Network for HIV Isolation and Characterization. 1994. Standard conditions of virus isolation reveal biological variability of HIV type 1 in different regions of the world. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1401-1408
- Rübsamen-Waigmann H, Unger RE, Kreuter J. 2000. Antivirals Against AIDS. *Marcel Dekker Verlag.*
- Ruppach H, Knechten H, Jäger H, Rübsamen-Waigmann H, Dietrich U. 1996. Risk of HIV transmission on infected US military personnel. *Lancet* 347: 697-698
- Ruppach H, Nara P, Raudonat I, Elanjikal Z, Rübsamen-Waigmann H, Dietrich U. 2000. Human immunodeficiency virus (HIV)-positive sera obtained shortly after seroconversion neutralize autologous HIV type 1 isolates on primary macrophages but not on lymphocytes. *J. Virol.* 74: 5403-5411
- Sabin CA, Devereux H, Phillips AN, Hill A, Janossy G, Lee CA, Loveday C. 2000. Course of viral load throughout HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 23: 172-177
- Sabino E, Pan LZ, Cheng-Mayer C, Mayer A. 1994. Comparison of in vivo plasma and peripheral blood mononuclear cell HIV-1 quasi-species to short-term tissue culture isolates: an analysis of tat and C2-V3 env regions. *AIDS* 8: 901-909
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. 1988. *Science* 239, 487
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoume-roulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhostede C, Burtonbay G, Georges M, Imai T, Oana S, Yi YJ, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382: 722-725
- Sastry KJ, Marin MC, Nehete PN, et al. 1996. Expression of human immunodeficiency virus type 1 tat that results in down-regulation of bcl-2 and induction of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene* 13: 487-493
- Sato A, Igarashi H, Adachi A, et al. 1990. Identification and localization of vpr gene product of human immunodeficiency virus type 1. *Virus Genes* 4: 303-312
- Sattentau QJ. 1994. HIV-1 neutralization: antibody-gp120 interactions, p. 135-139. In M. Girard and B. Dodet (ed.), *Retroviruses of human AIDS and related animal diseases.* Fondation Marcel Merieux, Lyon, France

- Sattentau QJ. 1996. Neutralization of HIV-1 by antibody. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 540-545
- Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, Fredriksson R, Colognesi C, Dend HK, Malnati MS, Plebani A, Siccardi AG, Littman DR, Fenyö EM, Lusso P. 1997. In vivo evolution of HIV-1 coreceptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nature Med.* 3: 1259-1265
- Schmidtmayerova H, Nuovo GJ, Bukrinsky M. 1997. Cell proliferation is not required for productive HIV-1 infection of macrophages. *Virology* 232: 379-384
- Schreiber M, Petersen H, Wachsmuth C, Müller H, Hufert FT, Schmitz H. 1994. Antibodies of symptomatic human immunodeficiency virus type 1-infected individuals are directed to the V3 domain of noninfectious and not of infectious virions present in autologous serum. *J. Virol.* 68: 3908-3916
- Schreiner GF, Kiely J-M, Cotran RE, Unanue ER. 1981. Characterization of resident glomerular cells expressing Ia determinants and manifesting genetically restricted interactions with lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 68: 920-931
- Schuitmaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RY, van Steenwijk RP, Lange JMA, Eeftink Schattenkerk JKM, Miedema F, Tersmette M. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus populations. *J. Virol.* 66: 1354-1360
- Schwartz O, Marechal V, Danos O, et al. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J. Virol.* 69: 4053-4059
- Schwartz O, Marechal V, Le Hall S, et al. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine* 2: 338-342
- Shankarappa B, Nicholas HB, Gupta P, Rinaldo CR, Gorry MC, Nara PL, Ehrlich GD. 1995. Genotypic clustering of the infecting quasispecies and increased variability at later time points are associated with a more rapid decline of CD4+ cell numbers in HIV-1 infection. *Natl. Conf. Hum. Retroviruses Relat. Infect.* 2: 172
- Sharma V, Xu M, Ritter LM, et al. 1996. HIV-1 tat induces the expression of a new hematopoietic cell-specific transcription factor and downregulates MIP-1 alpha gene expression in activated T-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223: 526-533
- Shaw S, Luce GE, Quinones R, Gress RE, Springer TA, Sanders ME. 1986. Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T-cell clones. *Nature* 323: 262-264
- Simmons G, Wilkinson D, Reeves JD, Dittmar MT, Beddows S, Weber J, Carnegie G, Desselberger U, Gray PW, Weiss RA, Clapham PR. 1996. Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J. Virol.* 70: 8355-8360
- Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F. 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4: 1032-1037

- Smith PD, Meng G, Shaw GM, Li L. 1997. Infection of gastrointestinal tract macrophages by HIV-1. *J. Leukoc. Biol.* 62: 72-77
- Southgate CD, Green MR. 1991. The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: Implications for Tat function. *Genes. Dev.* 5: 2469-2507
- Spennleher C, Saragosti S, Fleury HJ, Kirn A, Aubertin AM, Moog C. 1998. Study of the V3 loop as a target epitope for antibodies involved in the neutralization of primary isolates versus T-cell-line-adapted strains of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72: 9855-9864
- Srinivasan LA, Anand R, York D, Ranganathan P, Feorino P, Schochetman G, Curran J, Kalyanaraman VS, Luciew PA, Sanchez-Pescador R. 1987. Molecular characterization of human immunodeficiency virus from Zaire: nucleotide sequence analysis identifies conserved and variable domains in the envelope gene. *Gene* 52: 71-82
- Stafford MA, Corey L, Cao Y, Daar ES, Ho DD, Perelson AS. 2000. Modeling plasma virus concentration during primary HIV infection. *J. Theor. Biol.* 203: 285-301
- Stahl-Hennig C, Steinman RM, Tenner-Racz K, Pope M, Stolte N, Matz-Rensing K, Grobshupff G, Raschdorff B, Hunsmann G, Racz P. 1999. Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. *Science* 285:1261-1265
- Stamatatos L, Wiskerchen M, Cheng-Mayer C. 1998. Effect of major deletions in the V1 and V2 loops of a macrophage-tropic HIV type 1 isolate on viral envelope structure, cell entry, and replication. *AIDS Res. and Hum. Retroviruses* 14 (13): 1129-1139
- Stapleton J, McCoy J, Wissels D, Klinzman D, Watkins K, Shutt DC, Soll DR. 1998. HIV infected CD4⁺ syncytia are commonly found in the peripheral blood of HIV infected individuals. *Int. Conf. AIDS* 12: 261
- Steinman RM, Pack M, Inaba K. 1997. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol. Rev.* 156:25-37
- Strebel K, Daugherty S, Clouse K, et al. 1987. The HIV "A" (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 328: 728-730
- Stricker RB, McHigh TM, Moody DJ, Morrow WJ, Stites SP, Shuman MA, Levy JA. 1987. An AIDS-related cytotoxic autoantibody reacts with a specific antigen on stimulated CD4⁺ T cells. *Nature* 327: 710-713
- Taha TE, Graham SM, Kumwenda MI, Broadhead RL, Hoover DR, Markakis D, van der Hoeven L, Liomba GN, Chipangwi JD, Miotte PG. 2000. Morbidity among human immunodeficiency virus-1-infected and -uninfected African children. *Pediatrics* 106: 77
- Temin HM, Mizutani S. 1970. RNA-directed DNA-polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211-1213
- Tersmette M, de Goede REY, Al BJM, Winkel IN, Coutinho RA, Cuypers HTM, Huisman JG, Miedema F. 1988. Differential syncytium-inducing capacity of HIV isolates. Frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with AIDS and ARC. *J. Virol.* 62: 2026-2032

- Tersmette M, Lange JMA, de Goede REY, de Wolfe F, Eeftink-Schattenkerk JKM, Schellekens PTA, Coutinho RA, Huisman HG, Goudsmit J, Miedema F. 1989. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* I: 983-985
- Toossi Z, Nicolacakis K, Xia L, Ferrari NA, Rich EA. 1997. Activation of latent HIV-1 by *Mycobacterium tuberculosis* and its purified protein derivative in alveolar macrophages from HIV-1 infected individuals in vitro. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. and Hum. Retrovirol.* 15: 325-331
- Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaport E, Peeters M. 2000. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16: 139-151
- Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP. 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384: 184-187
- Trkola A, Paxton WA, Monard SP, Hoxie JA, Siani MA, Thompson DA, Wu L, Machay CR, Horuk R, Moore J. 1998. Genetic subtype-independent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by CC and CXC chemokines. *J. Virol.* 72: 396-404
- Tscherning-Casper C, Dolcini G, Mauclere P, Fenyö EM, Barre-Sinoussi F, Albert J, Menu E. 2000. Evidence of the existence of a new circulating recombinant form of HIV type 1 subtype A/J in Cameroon. The European Network on the Study of In Utero Transmission of HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1313-1318
- Valitutti S, Müller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375:148-151
- Van Furth R, Diesselhoff-den Dulk MMC, Raeburn JA, van Zwt TL, Crofton RW, van Oud B, Alblas A. 1980. Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. In *Mononuclear Phagocytes-Functional Aspects* (edited by R. Van Furth) Martinus Nijhoff. Hague. pp 279-298
- Van Rompay KKA, Miller MD, Marthas ML, Margot NA, Dailey PJ, Canfield DR, Tarara RP, Cherrington JM, Aguirre ML, Bischofberger N, Pedersen NC. 1999. Prophylactic and Therapeutic Benefits of Short-Term 9-[2-(R)-(Phosphonometoxy)Prophyl] Adenine PMPA) Administration to Newborn Macaques following Oral Inoculation with SIV with Reduced Susceptibility to PMPA. *J. Virol.* 74: 1767-1774
- Vicente AC, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Pieniazek D, Rayfield MA, Bretas G, Tanuri A. 2000. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 23: 327-331
- Von Briesen H, Andreesen R, Esser R, Brugger W, Meichsner C, Becker K, Rübsamen-Waigmann H. 1990a. Infection of monocytes/macrophages by HIV in vitro. *Res. Virol.* 141: 225-231

- Von Briesen H, Andeesen R, Rübsamen-Waigmann H. 1990b. Systematic classification of HIV biological subtypes on lymphocytes and monocytes/macrophages. *Virology* 178: 597-602
- Von Briesen H, Becker WB, Henco K, Helm EB, Gelderblom HR, Brede HD, Rübsamen-Waigmann H. 1987. Isolation frequency and growth properties of HIV-variants: Multiple simultaneous variants in a patient demonstrated by molecular cloning. *J. Med. Virol.* 23: 51-66
- Von Briesen H, Grez M, Ruppach H, Raudonat I, Unger RE, Becker K, Panhans B, Dietrich U, Rübsamen-Waigmann H. 1999. Selection of HIV-1 genotypes by cultivation in different primary cells. *AIDS* 13: 307-315
- Von Schwedler U, Song J, Aiken C, et al. 1993. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* 67: 4945-4955
- Wain-Hobson S. 1993. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Curr Opin Genetics and Development* 3: 878-883
- Wain-Hobson S. 1996. One on one meets two. *Nature* 384: 117-118
- Weber J, Fenyö EM, Beddows S, Kaleebu P, Björndal A. 1996. Neutralization serotypes of human immunodeficiency virus type 1 field isolation are not predicted by genetic subtype. The WHO Network for HIV isolation and characterization. *J. Virol.* 70: 7827-7832
- Weniger BG, Limpakarnjanarat K, Ungchusak K, Thanprasertsuk S, Choopanya K, Vanichseni S, Uneklabh T, Thongcharoen P. 1991. The epidemiology of HIV infection and AIDS in Thailand. *AIDS* 5 (Suppl. 2): 71-85
- Wild A. 1991. Einfluß der HIV-Infektion auf die Expressioin von Protoonkogenen in humanen Monozyten/Makrophagen. Diplomarbeit im Studiengang Humanbiologie, Fachbereich Humanmedizin der Philips-Universität Marburg
- Wiskerchen M, Muesing MA. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 integrase: Effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells. *J. Virol.* 69: 376-386
- Wu L, Gerard N, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cordoso A, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384: 179-183
- Wu L, Larosa G, Kassam N, Gordon CK, Heath H, Ruffing N, Chen H, Humblis J, Samson M, Parmentier M, Moore JP, Mackay CR. 1997a. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp 120 binding and a single domain for chemokine binding. *J. Exp. Med.* 186: 1373-1381
- Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N, Choe H, Sodroski J, Newman W, Koup RA, Mackay CR. 1997b. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J. Exp. Med.* 185: 1681-1691
- Wyatt R, Sodroski J. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280: 1884-1888

- Xiao L, Rudolph DL, Owen SM, Spira TJ, Lal RB. 1998. Adaptation to promiscuous usage of CC and CXCR4-chemokine coreceptors in vivo correlates with HIV-1 disease progression. *AIDS* 12: 137-143
- Yarchoan R and Brdoder S. 1989. Immunology of HIV infection. *Fundamental Immunology* (edited by WE Paul). Second edition. Raven Press Ltd. New York
- Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, et al. 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: Molecular analysis reveal a labile, latent viral structure. *Cell* 61: 213-222
- Zagury D, Bernard J, Leonard R, Cheynier R, Feldman M, Sarin PS, Gallo RC. 1986. Long-term cultures of HTLV-III-infected T-cells: A model of cytopathology of T-cell depletion in AIDS. *Science* 231: 850-853
- Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H. 1997. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature Med.* 3: 1369-1375
- Zapp ML, Green MR. 1989. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* 342: 714-716
- Zhang LQ, MacKenzie P, Cleland A, Holmes EC, Leigh Brown AJ, Simmonds P. 1993. Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J. Virol.* 67: 3345-3356
- Zhang L, Huang Y, He T, Cao Y, Ho DD. 1996. HIV-1 subtype and second-receptor use. *Nature* 383: 768
- Zhang YJ, Fracasso C; Fiore JR, Bjorndal A, Angarano G, Gringeri A, Fenyö EM. 1997. Augmented serum neutralizing activity against primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in two groups of HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J. Infect. Dis.* 176: 1180-1187
- Zhang LQ, He T, Talal A, Wang G, Frankel SS, Ho DD. 1998. In vivo distribution of the human immunodeficiency virus simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J. Virol.* 72: 5035-5045
- Zhang PF, Chen X, Fu DW, Margolick JB, Quinnan GV Jr. 1999. Primary virus envelope cross-reactivity of the broadening neutralizing antibody response during early chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 73: 5225-5230
- Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 261: 1179-1181
- Zhuge W, Jia F, Adany I, Narayan O, Stephens EB. 1997. Plasmas from lymphocyte- and macrophage-tropic SIV_{mac}-infected macaques have antibodies with a broader spectrum of virus neutralization activity in macrophage versus lymphocyte cultures. *Virology* 227: 24-33
- Zolla-Pazner S, Gorny MK, Nyambi PN, vanCott TC, Nádes A. 1999. Immunotyping of human immunodeficiency virus type 1 (HIV): an approach to immunologic classification of HIV. *J. Virol.* 73: 4042-4051

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ina Raudonat
Adresse: Schützenhüttenweg 26
60598 Frankfurt
Geburtsdatum: 05. September 1966
Geburtsort: Frankfurt am Main

Schulausbildung

1972-1976: Besuch der Wilhelm Arnoul Grundschule in Walldorf
1976-1985: Besuch des Justus Liebig Gymnasiums in Darmstadt
14. Juni 1985 Abitur

Berufsausbildung

1985-1988: Ausbildung als MTA an der Lehranstalt für technische Assistenten an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Studium

WS 1988 Biologiestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
22. Oktober 1990 Diplomvorprüfung (Fächer: Zoologie; Botanik; Chemie; Physik)
24. November 1993 Mündliche Diplomhauptprüfung in Biologie (Hauptfach: Zoologie; Nebenfächer: Mikrobiologie, Pharmazeutische Biologie)
01. Januar 1994 Beginn der praktischen Diplomarbeit mit dem Thema: Organismische und molekulargenetische Untersuchungen der Metagenese des Hydrozoen *Eleutheria dichotoma*
05. Januar 1995 Diplom der Biologie

Promotion

1995-1998 Promotionsarbeit am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main

Berufliche Tätigkeit

Ab 01. Februar 2000 Betreuung Klinischer Studien in Festanstellung bei der Firma Ecron GmbH in Frankfurt am Main.