

**Entwicklung und Charakterisierung einer CXCR4-tropen
Variante des Simianen Immundefizienzvirus der
Afrikanischen Grünen Meerkatze**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich für
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Renate König
aus Marktredwitz

Frankfurt am Main 2002
DF1

vom Fachbereich für Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Walter E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig
Prof. Dr. Klaus Cichutek

Datum der Disputation: 01.07.2002

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	ENTDECKUNG DER IMMUNDEFIZIENZVIREN.....	1
1.2	CHARAKTERISTIKA DER IMMUNDEFIZIENZVIREN.....	2
1.3	INTERAKTION DES VIRUS MIT DER WIRTSZELLE.....	6
1.4	CHEMOKINREZEPTOREN UND HIV / SIV-INFEKTION.....	8
1.5	PATHOGENESE VON HIV – ROLLE DER CHEMOKINREZEPTOREN.....	10
1.6	SIVAGM ALS TIERMODELL.....	13
1.7	ZIELSETZUNG.....	14
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	15
2.1	MATERIALIEN UND METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE.....	15
2.1.1	<i>Plasmide und Bakterienstämme.....</i>	<i>15</i>
2.1.1.1	Restriktion, Dephosphorylierung, Einfügen eines Linkers und Ligation von Plasmid-DNA.....	16
2.1.2	<i>Agarose-Gelelektrophorese.....</i>	<i>16</i>
2.1.3	<i>Reinigung von DNA-Fragmenten.....</i>	<i>17</i>
2.1.3.1	Reinigung von PCR-Produkten oder Plasmidfragmenten.....	17
2.1.3.2	Reinigung von Fragmenten nach einer Sequenzierreaktion.....	17
2.1.4	<i>Plasmid-Präparation.....</i>	<i>17</i>
2.1.5	<i>Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation.....</i>	<i>18</i>
2.1.6	<i>Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen.....</i>	<i>18</i>
2.1.7	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</i>	<i>19</i>
2.1.8	<i>Fusions-PCR.....</i>	<i>20</i>
2.1.9	<i>Nukleotidsequenzbestimmung.....</i>	<i>21</i>
2.1.10	<i>Oligonukleotide.....</i>	<i>22</i>
2.1.10.1	Oligonukleotide zur Herstellung chimärer Proviren zwischen dem SIVagm3mc und dem HIV-1-Isolat BH10 (Austausch der variablen Domäne V3 im env-Gen).....	22
2.1.10.2	Oligonukleotide zur Einfügung eines Linkers zur Klonierung des Volllängenplasmides SIVagm3-X4.....	23
2.1.10.3	Oligonukleotide zur Nachweis der variablen Domäne im env-Gen ausgehend von genomischer DNA.....	23
2.1.10.4	Oligonukleotide zur Nukleotidsequenzbestimmung:.....	23
2.1.10.5	Oligonukleotide für die Taqman-PCR.....	24
2.2	MATERIALIEN UND METHODEN DER ZELLKULTUR.....	25
2.2.1	<i>Zellen und Medien.....</i>	<i>25</i>
2.2.2	<i>Präparation und Kultivierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und mononukleären Blutzellen der Lymphknoten (LNMC).....</i>	<i>26</i>

2.2.3	<i>Plasma- und Serumgewinnung</i>	27
2.2.4	<i>Transfektion</i>	27
2.3	METHODEN DER VIROLOGIE	28
2.3.1	<i>Virusnachweisverfahren</i>	28
2.3.1.1	Immunperoxidase-Test (IPA)	28
2.3.1.2	Test auf Aktivität viraler Reverser Transkriptase.....	29
2.3.1.3	Test auf Virusantigen (p27).....	29
2.3.2	<i>Infektionen</i>	30
2.3.2.1	Infektionen von C8166-Zellen.....	30
2.3.2.2	Infektionen von PBMC.....	31
2.3.2.3	Infektionen von GHOST-Zellen	31
2.3.2.4	Hemmung des Viruseintritts	31
2.3.3	<i>Bestimmung des Virustiter</i>	32
2.3.4	<i>Bestimmung virologischer Parameter in-vivo nach Infektion von Schweinsaffen</i>	32
2.3.4.1	Infektion von Schweinsaffen	32
2.3.4.2	Virusreisolierung	32
2.3.4.3	Messung der zellassozierten Virusbelastung	33
2.3.4.4	Messung der Provirusbelastung.....	33
2.3.4.5	Messung der Plasmavirämie	35
2.4	METHODEN DER IMMUNOLOGIE	37
2.4.1	<i>Magnetische Zell-Sortierung (MACS, „Magnetic Cell Sorting“)</i>	37
2.4.2	<i>Analytische Durchflußzytometrie (FACS, „Fluorescence Activated Cell Sorting“)</i>	37
2.4.3	<i>Bestimmung immunologischer Parameter in-vivo nach Infektion von Schweinsaffen</i>	38
2.4.3.1	Bestimmung des Differentialblutbildes.....	38
2.4.3.2	Bestimmung des Antikörpertiters mittels ELISA.....	39
2.4.3.3	Bestimmung von HIV-spezifischen Antikörpern.....	39
2.4.3.4	Messung von neutralisierenden Antikörpern gegen SIV	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	VERÄNDERUNG DER KOREZEPTORNUTZUNG VON SIVAGM3MC	41
3.1.1	<i>Konstruktion des Hybridvirus SIVagm3-X4mc</i>	41
3.1.2	<i>Darstellung der Replikationskompetenz von SIVagm3-X4mc</i>	45
3.2	UNTERSUCHUNG ZUR KOREZEPTORNUTZUNG VON SIV.....	48
3.2.1	<i>Reisolierung</i>	48
3.2.1.1	Reisolierung aus PBMC von Schweinsaffen	48
3.2.1.2	Reisolierung aus PBMC und LNMC von AGM.....	50
3.2.2	<i>Korezeptornutzung eines Isolates aus einer natürlich infizierten AGM im Vergleich zu pathogenen SIV</i>	52
3.3	EIGENSCHAFTEN VON SIVAGM3-X4MC <i>IN-VITRO</i>	54
3.3.1	<i>Korezeptornutzung von SIVagm3-X4mc</i>	54

3.3.2	Korezeptorverteilung in PBMC von AGM und NEM.....	59
3.3.3	Replikation von SIVagm3-X4mc in PBMC von AGM und NEM.....	61
3.4	EINFLUß DER VERÄNDERTEN KOREZEPTORNUTZUNG VON SIVAGM3-X4MC <i>IN-VIVO</i>	64
3.4.1	Infektion von Schweinsaffen.....	64
3.4.1.1	Charakterisierung der Virusparameter.....	65
3.4.1.1.1	Virusbelastung der infizierten Schweinsaffen.....	65
3.4.1.2	Charakterisierung der Wirtsparemeter.....	67
3.4.1.2.1	Bestimmung der CD4+/CD8+-Zellzahl.....	67
3.4.1.2.2	Induktion von SIV und HIV-spezifischen Antikörpern.....	68
3.4.1.2.3	Induktion von SIV-neutralisierenden Antikörpern.....	70
3.4.1.3	Eigenschaften von SIVagm3-X4mc <i>in-vivo</i>	72
3.4.1.3.1	Korezeptornutzung von SIVagm3-X4mc nach <i>in- vivo</i> Replikation.....	72
3.4.1.3.2	Sequenzierung von SIVagm3-X4mc nach <i>in-vivo</i> Replikation.....	73
4	DISKUSSION.....	74
4.1	VERÄNDERUNG DER KOREZEPTORNUTZUNG VON SIVAGM3MC ZU CXCR4.....	74
4.2	KOREZEPTORNUTZUNG VON SIVAGM.....	76
4.3	REPLIKATION VON SIVAGM3-X4MC IN PBMC.....	78
4.4	REPLIKATION UND APATHOGENITÄT VON SIVAGM3-X4MC <i>IN-VIVO</i>	81
4.5	IMMUNANTWORT.....	84
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	86
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	87
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	103
8	DANKSAGUNG.....	105
	LEBENS LAUF.....	106

1. EINLEITUNG

Die weltweite Epidemie des humanen Immundefizienzvirus (HIV) hat sich zu einem der größten Gesundheitsprobleme entwickelt. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) lebten Ende 2001 weltweit 40 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion oder AIDS. Die Zahl der Neuinfektionen für 2001 wurde auf 5 Millionen geschätzt. Allein im letzten Jahr sind 3 Millionen Menschen an den Folgen einer HIV-Infektion verstorben (UNAIDS und WHO, 2001).

1.1 Entdeckung der Immundefizienzviren

In den USA wurde 1981 eine bis dahin unbekannte Erkrankung des Immunsystems erstmals bei jungen amerikanischen Homosexuellen dokumentiert (Gottlieb *et al.*, 1981; Masur *et al.*, 1981). Die Patienten litten an einem Immundefizienz-Syndrom, assoziiert mit schweren opportunistischen Infektionen, wie z. B. *Pneumocystis carinii*, neurologischen Ausfällen, dem Auftreten maligner Tumore (u. a. Karposi Sarkome und Lymphome) sowie einer stetigen Abnahme der CD4+ T-Zellen (Shaw *et al.*, 1985; Falk *et al.*, 1986; Ho *et al.*, 1995). Die beschriebenen Krankheitssymptome wurden 1982 vom *Center for Disease Control* unter dem Namen *Acquired Immunodeficiency Syndrom* (AIDS) zusammengefaßt. Da ähnliche Krankheitssymptome auch bei intravenös Drogenabhängigen, Empfängern von Blutprodukten, Sexualpartnern der Angehörigen der Risikogruppen und Kindern erkrankter Mütter beobachtet wurden, vermutete man eine Übertragung des infektiösen Agens über Blut und Blutprodukte, perinatal sowie durch sexuelle Kontakte.

Der Verursacher dieser erworbenen Immunschwäche konnte aus Blutlymphozyten eines AIDS-Patienten isoliert werden: ein neues Retrovirus (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983), welches später der Unterfamilie der Lentiviren zugeordnet und als humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) bezeichnet wurde (Coffin *et al.*, 1986). Ein zweiter HIV-Typ (HIV-2) wurde in Blutlymphozyten eines west-afrikanischen AIDS-Patienten entdeckt (Clavel *et al.*, 1986).

Bald nach der Entdeckung von HIV-1 konnte ein simianes Immundefizienz-Syndrom (SAIDS) bei Affen entdeckt werden (Letvin *et al.*, 1985). Die Isolierung des ersten simianen Immundefizienzvirus (SIV) gelang aus Rhesusaffen (*Macaca mulatta*, SIVmac), die in Gefangenschaft zusammen mit Halsbandmangaben (*Cercocebus atys*) gehalten wurden (Daniel *et al.*, 1985). Mittlerweile sind aus weiteren Affenarten simiane Immundefizienzviren isoliert worden, die in ihrem natürlichen Wirt keine Erkrankung hervorrufen: u. a. aus

Halsbandmangaben (SIVsm) (Fultz *et al.*, 1986), Mandrillen (*Papio sphinx*, SIVmnd) (Tsujimoto *et al.*, 1988), Schimpansen (*Pan troglodytes*, SIVcpz) (Peeters *et al.*, 1989), Diademmeerkatzen (*Cercopithecus mitis albobularis*, SIVsyk), (Hirsch *et al.*, 1993), Weißschopfmangaben (*Cercocebus torquatus torquatus*, SIVrcm) (Tomonaga *et al.*, 1993) und aus Afrikanischen Grünen Meerkatzen (*Chlorocebus aethiops*, SIVagm) (Ohta *et al.*, 1988). Im Gegensatz dazu konnte man aus natürlicherweise nicht infizierten asiatischen Affenarten (Hirsch und Johnson, 1994) simiane Immundefizienzviren isolieren, die in ihren Wirten SAIDS induzieren. Dazu zählen Isolate aus Rhesusaffen (Daniel *et al.*, 1985), Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*, SIVmne) (Benveniste *et al.*, 1986), und Stumpfschwanzmakaken (*Macaca arctoides*, SIVstm) (Lowenstine *et al.*, 1992). Diese Isolate sind das wahrscheinliche Ergebnis einer Transmission von SIVsm in Gefangenschaft (Hirsch und Johnson, 1994).

Mittlerweile gilt es als gesichert, daß der natürliche Wirt von SIVmac/SIVmne/SIVstm und HIV-2 die afrikanische Halsbandmangabe ist (Hirsch *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 2000). Für HIV-1 wird eine SIVspz-Transmission von der Schimpansenart *Pan troglodytes troglodytes* zum Menschen angenommen (Gao *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 2000). Retrospektiv zeigte sich, daß das erste eindeutig HIV-positive Blutserum der Gruppe M aus Zentralafrika aus dem Jahre 1959 stammt (Zhu *et al.*, 1998). Durch phylogenetische Analysen wird der Zeitpunkt des „Vorfahr“ der HIV-1 M-Gruppe auf die frühen 30er Jahre des 20. Jahrhunderts geschätzt (Korber *et al.*, 2000). Sozioökonomische und politische Veränderungen in Afrika in den 1950er und 1960er Jahren begründeten daraufhin die AIDS Pandemie (Hillis, 2000; Hahn *et al.*, 2000).

1.2 Charakteristika der Immundefizienzviren

Humane und simiane Immundefizienzviren werden der Gattung der Lentiviren zugeordnet, die zur Familie der *Retroviridae* gehört. Derzeit teilt man Primaten-Lentiviren in fünf phylogenetische Abstammungsgruppen ein. Diese Gruppen werden repräsentiert von SIVcpz zusammen mit HIV-1, SIVsm zusammen mit HIV-2 und SIVmac, SIVagm, SIVsyk und SIV l'hoest von Vollbartmeerkatzen (*Cercopithecus l'hoesti*) zusammen mit SIVsun von Gabunmeerkatzen (*Cercopithecus solatus*) und SIVmnd (Hahn *et al.*, 2000).

Wie alle Retroviren besitzen sie ein pseudo-diploides einzel-strängiges (+)-RNA-Genom. Das Genom der SIV weist eine Länge von ca. 9,5 Kilobasen (kb), eine CAP-Struktur am 5'-Ende und ein polyadenyliertes 3'-Ende auf. Damit besitzt es die Struktur einer eukaryotischen Messenger-RNA (mRNA). Im 5' Bereich des Genoms befindet sich eine als Primer-Bindungsstelle bezeichnete Sequenz, an die eine zelluläre tRNA gebunden ist. Die

kodierenden Regionen werden von regulatorischen Sequenzwiederholungen flankiert („Long Terminal Repeat“, LTR), die für die Reverse Transkription, die Integration der viralen Erbinformation in die zelluläre DNA und die Transkription essentiell sind. Von den Leserahmen *gag*, *pol* und *env* werden Polyproteine translatiert, welche anschließend proteolytisch gespalten werden. Die *gag*-Proteine Matrix (MA), Kapsid (CA), Nukleokapsid (NC) und p6 sowie die *env*-Proteine SU (gp120, *surface*) und TM (gp41, *transmembrane*) sind strukturelle Komponenten des Virions und der Membranhülle, wohingegen das *pol*-Gen für drei essentielle Enzyme kodiert: Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN). (Frankel und Young, 1998).

Zusätzlich enthalten die Genome der Primaten-Immundefizienzviren noch fünf oder mehr offene Leserahmen (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpx* oder *vpu*) (Cullen, 1998). Nur das Genom der Viren der SIVcpz/HIV-1-Gruppe enthält das *vpu*-Gen statt des *vpx*-Gens. Im Genom der Viren der SIVagm-Gruppe kommt das *vpr*-Gen nicht vor. Die Identität des *vpx*-Gens des SIVagm wird kontrovers diskutiert, daher wird es manchmal auch als *vpr* bezeichnet (Tristem *et al.*, 1990; Tristem *et al.*, 1992; Hirsch und Johnson, 1994) (Abb. 1).

Tat ermöglicht die Synthese vollständiger viraler Transkripte durch Bindung an eine gefaltete mRNA-Struktur (TAR, Trans-Activation Region) in der Nähe des Transkriptionsstarts und wirkt somit als „Transaktivator“ der viralen Genexpression. Rev-Proteine binden als Multimere an eine als RRE (REV-Responsive Element) bezeichnete RNA-Sequenz im Bereich des *env*-Gens in allen einfach gespleißten und ungespleißten viralen mRNAs und ermöglichen den effizienten Transport dieser RNAs aus den Kern und somit deren Translation. Damit reguliert Rev die virale Genexpression. Vif spielt eine wichtige Rolle bei der Produktion infektiöser Viruspartikel. Postuliert wird eine Beteiligung von Vif beim Zusammenbau des Virions und der Reifung. Für das Vpr-Protein wurden *in-vitro* mehrere Funktionen beschrieben. Zum einen ist Vpr am aktiven Kerntransport des viralen Präintegrationskomplexes in ruhenden Zellen beteiligt. Zum anderen ist das Protein durch Inhibition der p43^{cdc2} Kinase-Aktivität in der Lage, einen Arrest in der G₂-Phase des Zellzyklus zu induzieren, was indirekt auch zu einer höheren Aktivität des viralen Promotors führt. Das Vpu-Protein stimuliert die Freisetzung von Virionen und ist für die Degradation des neu-synthetisierten CD4-Rezeptors im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verantwortlich. Dadurch wird eine Komplexbildung gleichzeitig synthetisierter Env und CD4-Proteine verhindert und die Freisetzung von Env aus dem ER erleichtert.

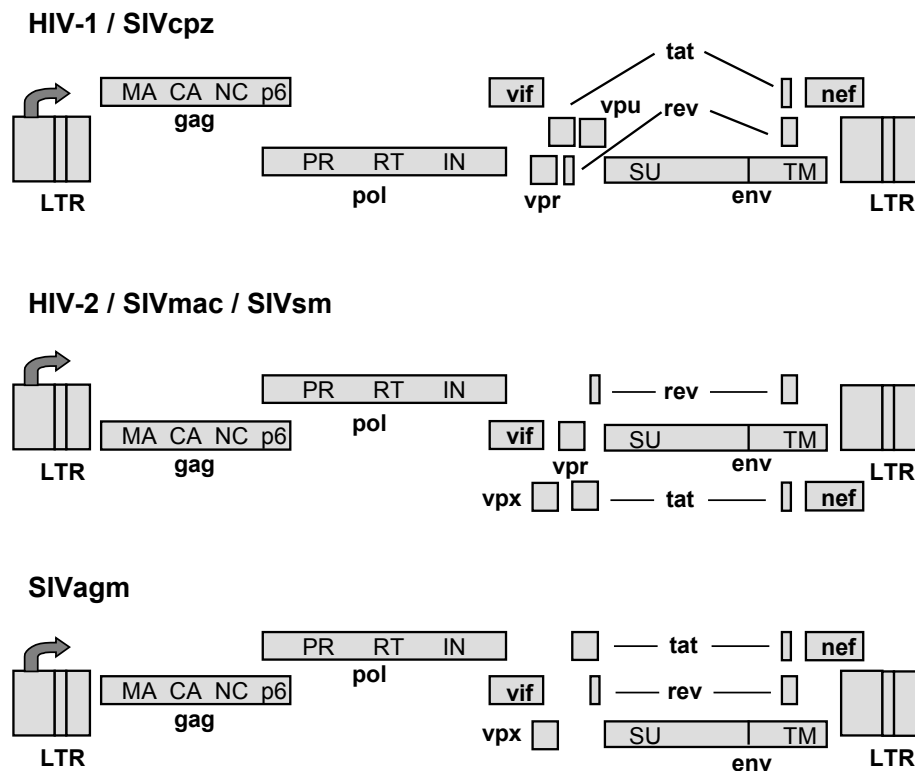


Abb. 1: Genomaufbau der Immundefizienzviren

Die provirale Struktur der drei großen Gruppen der Immundefizienzviren ist dargestellt. Die offenen Leserahmen sind von langen Sequenzwiederholungen (LTR) flankiert, deren Dreiteilung (U3-R-U5) schematisch gezeigt ist.

Dem Nef-Protein werden viele *in-vitro* Eigenschaften mit potentieller Bedeutung für die AIDS-Pathogenese zugeschrieben: zum einen die Herabregulierung des CD4-Rezeptors von der Oberfläche, was die Freisetzung von Partikeln erleichtert. Zum anderen wird die Herabregulierung von MHC-1-Molekülen durch Nef induziert, wodurch eine CTL-vermittelte Lyse von HIV-infizierten Zellen inhibiert wird. Desweiteren wird durch Nef eine Steigerung der Replikationseffizienz beobachtet und eine CD4-unabhängige Erhöhung der viralen Infektiosität, deren Mechanismen noch Spekulation sind (Cullen, 1998).

Reife HIV und SIV-Partikel haben einen Durchmesser von 100 nm. Sie sind von einer zellulären Phospholipid-Doppelmembran umgeben, in der das virale Transmembranprotein gp41 in Trimeren eingelagert ist. Über nicht-kovalente Bindungen ist das Hüllprotein mit dem gp41 assoziiert. Die Innenseite der Membran ist mit einer Schicht Matrixproteine ausgekleidet, die mit dem konischen Kapsid (bestehend aus den Kapsidproteinen) verbunden ist. Im Inneren des Kapsids befinden sich das virale Genom in Form von zwei RNA-Molekülen komplexiert mit Nukleokapsid-Proteinen, die viralen Enzyme sowie die zelluläre

tRNA (Abb. 2). Außerdem befinden sich neben zellulären Proteinen, wie z. B. Cyclophilin A (Franke *et al.*, 1994) auch einige virale, akzessorische Proteine (Gelderblom, 1991).

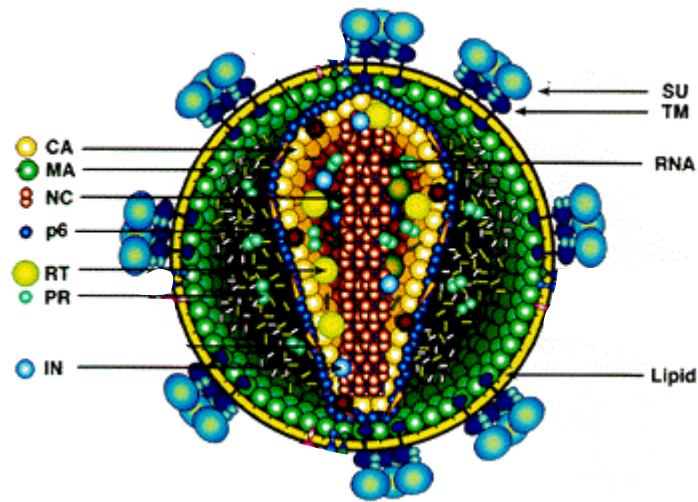


Abb. 2: Die Morphologie des HIV-Partikels

HIV ist ein umhülltes Retrovirus. Die äußere Phospholipid-Doppelmembran stammt von der Wirtszelle (Lipid). Darin eingebettet befindet sich das virale gp41 Protein (TM), welches mit dem Oberflächenprotein gp120 (SU) assoziiert ist. Das Matrixprotein (MA) bildet eine weitere Hülle innerhalb der Membran. Im Inneren befindet sich das konische Kernpartikel. Es besteht aus dem Kapsidprotein (CA) und enthält das virale Genom (RNA) assoziiert mit dem Nucleocapsid (NC), dem p6-Protein (p6), der Integrase (IN), der Reverse Transkriptase (RT) und der Protease (PR).

Nach der Infektion der Wirtszelle gelangt das Viruskapsid ins Zytoplasma der Zelle, wo die mit dem Ribonukleoprotein-Komplex assoziierte Reverse Transkriptase beginnt, in mehreren Schritten die virale RNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Da das virale Enzym keine „proof reading“-Aktivität besitzt, kommt es zum Einbau falscher Nukleotide und damit zur Variabilität des Virus. Aus Integrase, Reverser Transkriptase, viraler DNA, Matrixproteinen und Vpr-Molekülen bildet sich der Präintegrationskomplex, der aktiv in den Zellkern transportiert wird. Die Integrase katalysiert die Integration der proviralen DNA ins Wirtszellgenom. Die virale Genexpression erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Während der frühen Phase werden Rev, Tat sowie Nef translatiert. Danach erfolgt die Translation der viralen Struktur- und Vorläuferproteine. An der Zellmembran findet die Selbstassoziation der viralen Vorläufer-Proteine Gag und Gag-Pol und der Einbau der ungespleißten Vollängen-RNA in die neuen Viruspartikel statt (*assembly*). Während des Ausknospens (*budding*) des Virus aus der Wirtszelle kommt es zur Einlagerung der Env-Proteine und zur Generierung von reifen Viruspartikeln durch Spaltung der Vorläufer-Proteine durch die mitgeführte virale Protease (Freed, 1998) (Abb. 3).

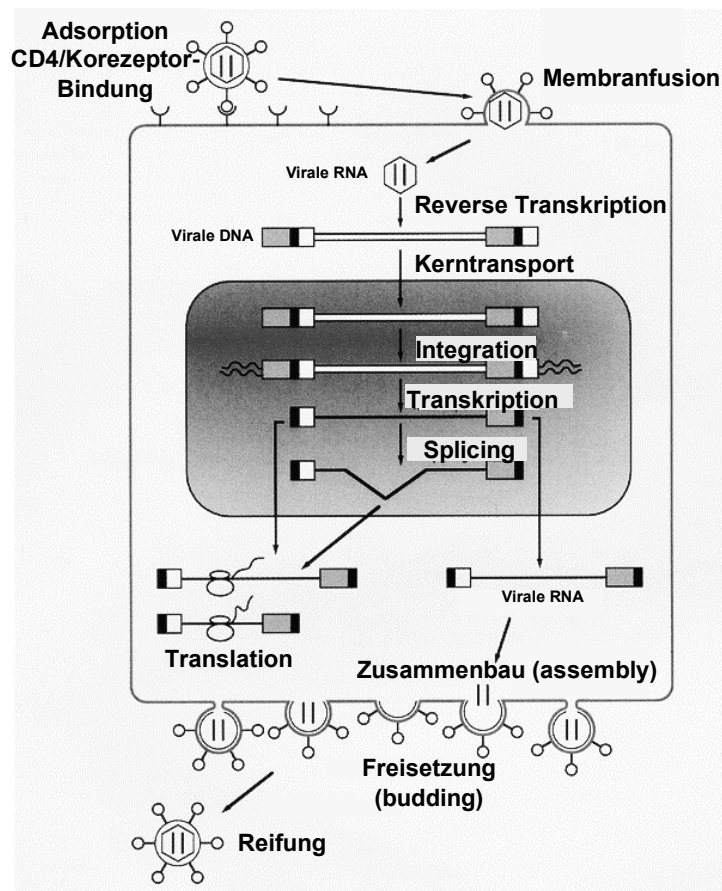


Abb. 3: Viraler Replikationszyklus

Schematische Darstellung der wichtigsten Ereignisse, die bei der Infektion der CD4+-Zellen ablaufen.

1.3 Interaktion des Virus mit der Wirtszelle

Der Zelleintritt von HIV und SIV wird vermittelt durch die Interaktion des trimerisierten viralen Glykoproteins gp120 mit den Wirtszellrezeptoren. Schon kurz nach der Isolierung von HIV wurde das CD4-Molekül als primärer Rezeptor für das Virus nachgewiesen (Maddon *et al.*, 1986). Es gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und besteht aus einer zytoplasmatischen Domäne, einer Membran-spannenden Region und vier extrazellulären immunglobulin-ähnlichen Domänen, an deren erste HIV bindet (Landau *et al.*, 1988; Clayton *et al.*, 1988; Jameson *et al.*, 1988). Durch vergleichende Sequenzanalysen konnten im gp120-Hüllprotein vier konservierte und fünf variable Regionen, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken als Schleifen ("loop") vorliegen, definiert werden (Modrow *et al.*, 1987). Aufgrund kristallographischer Untersuchungen konnte man ein Modell einer monomeren gp120-

Kernstruktur erstellen, die aus drei strukturellen Elementen besteht: der äußeren und der inneren Domäne verbunden durch eine Brücke (Wyatt *et al.*, 1998; Kwong *et al.*, 1998). Die CD4-Bindungsstelle befindet sich dabei in einer Vertiefung an der Innenseite aller drei Domänen. Die Interaktion von env mit dem CD4-Molekül reicht allerdings nicht aus für eine Infektion. Nagerzellen, stabil mit humanem CD4 transfiziert, waren durch HIV nicht infizierbar (Page *et al.*, 1990). Deswegen mußten noch weitere Faktoren zum Eintritt des Virus in die Zielzelle beitragen. Im Jahre 1996 gelang schließlich die Identifizierung zweier solcher sogenannter Korezeptoren, CXCR4 (Feng *et al.*, 1996) und CCR5 (Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996). Eine Peptid-schleife ("Peptid-loop") in der dritten variablen Domäne im gp120, der sogenannte V3-Loop, ist die hauptsächliche Korezeptor-Bindungsstelle (Cocchi *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996). CD4-Bindung induziert Veränderungen in der Konformation im gp120, die in einer Bewegung des V1-V2-Loops resultieren, so daß der V3-Loop als kritische Determinante für den Virus-Tropismus zugänglich ist für Bindung des Korezeptors. Krystallographische Untersuchungen (Kwong *et al.*, 1998) in Verbindung mit Mutagenese-Experimenten (Rizzuto *et al.*, 1998) und antigenen Analysen (Wyatt *et al.*, 1998) führten zu der Modellvorstellung, daß der Korezeptor mit dem V3-Loop und einer konservierten „Brücke“ zusammengesetzt aus dem V1-V2-„Stamm“ und einer antiparallelen 4-Strang-Struktur aus der C4-Region interagiert (Abb. 4).

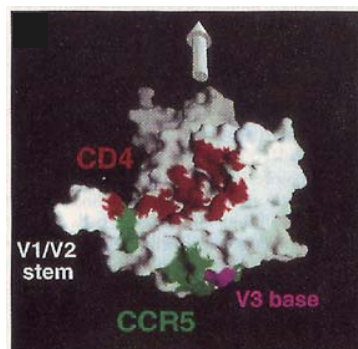


Abb. 4: Räumliche Darstellung der Oberfläche von HIV-1 gp120-SU

Die CD4-Bindungsstelle ist in Rot gekennzeichnet. Die mit der Chemokinrezeptorbindung (hier CCR5) in Verbindung gebrachten Regionen sind Grün eingefärbt. Die Basis des ansonsten exponierten V3-Loops ist Pink gekennzeichnet. Der Pfeil gibt die Orientierung des gp120-SU in Richtung zur Virushülle an (Abbildung modifiziert nach Wyatt *et al.*, 1998).

Die Korezeptorbindung löst zusätzliche Konformationsänderungen im Hüllprotein Env aus, die zur Exposition der gp41-Ektodomäne inklusive des N-terminalen Fusionspeptids führen.

Es kommt zur Formierung einer 3-Strang-„coiled-coil“-Struktur des gp41, die dem hydrophoben Fusionspeptid ermöglicht, in die Zielzellmembran zu inserieren. Diese Struktur krümmt sich zurück und formiert sich selbst zu einem Bündel aus 6 Helices, so daß sich das Fusionspeptid und die Transmembrandomäne am selben Ende befinden (Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997). Der Übergang von der „coiled-coil“-Struktur zum „6-Helix-Bündel“ führt zum engen Kontakt der viralen und zellulären Membran und induziert die Membranfusion (Melikyan *et al.*, 2000) (Abb. 5).

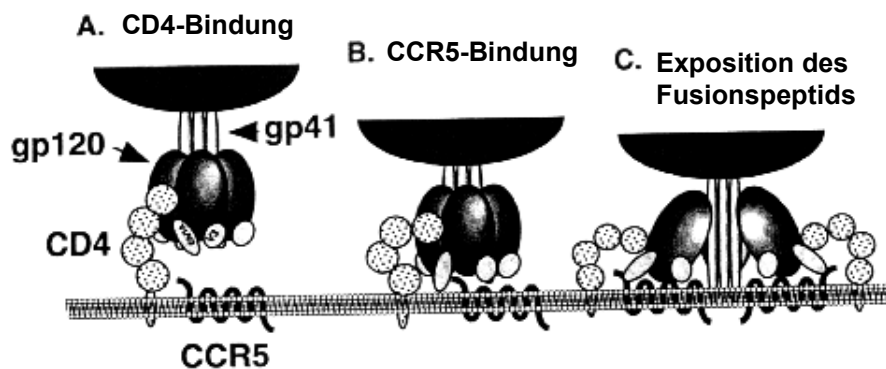


Abb. 5: Modell einer CD4 und Korezeptor-abhängigen Membranfusion
Schematisch dargestellt ist ein Ausschnitt der Virushülle mit dem trimerisierten Glycoprotein (gp41 / gp120). Nach Bindung an den CD4-Rezeptor der Zielzelle (A) kommt es zur ersten Konformationsänderung. Nach Bindung des Korezeptors, hier CCR5, (B) erfolgt die zweite Konformationsänderung und damit die Exposition des Fusionspeptids (C).

1.4 Chemokinrezeptoren und HIV / SIV-Infektion

Die Korezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten "Sieben-Transmembran-Chemokin-Rezeptoren". Diese binden chemotaktisch wirksame Zytokine (Chemokine, „Chemoattractant Cytokine“), die von verschiedenen Zellen bei Entzündungsreaktionen freigesetzt werden, um Zellen des Immunsystems anzulocken (Baggiolini *et al.*, 1997). Außerdem konnten auch konstitutiv exprimierte Chemokine identifiziert werden, die in das „trafficking“ und „homing“ von Lymphozyten involviert sind (Rossi und Zlotnik, 2000). Chemokine sind kleine Proteine (70 – 90 Aminosäuren) mit vier konservierten Cysteinen verbunden durch Disulfidbrücken. Zwei Haupt-Klassen und zwei Neben-Klassen können aufgrund der Anordnung der ersten zwei Cysteine unterschieden werden: CXC-, CC-Chemokine und C-, CX₃C-Chemokin (mit je einem Vertreter). Dementsprechend korrelierend werden die zugehörigen Rezeptoren bezeichnet.

Der erste direkte Zusammenhang zwischen HIV und Chemokinen wurde 1995 entdeckt mit der Darlegung, daß die CC-Chemokine RANTES (*Regulated Upon Activation, Normal T Cell Expressen and Secreted*), MIP-1 α und MIP-1 β (*Macrophage Inhibiting Protein*) von CD8+-Zellen produzierte, HIV suppressierende Faktoren darstellen (Cocchi *et al.*, 1995). Diese Chemokine sind Inhibitoren von HIV-Stämmen, die bevorzugt Makrophagen, aber keine T-Zelllinien infizieren können, sog. makrophagentrope (M-trope) HIV-Stämme. Dagegen inhibiert das CXC-Chemokin SDF-1 α (*Stromal Derived Factor*) HIV-Stämme, die hoch permissiv für T-Zelllinien sind und generell im Gegensatz zu M-tropen Stämmen Synzytien (Riesenzellen) induzieren, sog. T-Zell-trope (T-trope) HIV-Stämme (Oberlin *et al.*, 1996; Bleul *et al.*, 1996). Letztendlich führte die Entdeckung der M-tropen Inhibitoren zur Entdeckung des Chemokinrezeptors CCR5 als Korezeptor für M-trope HIV-Stämme (Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996). Der zweite bis dahin entdeckte Korezeptor, der aufgrund seiner fusogenen Eigenschaften mit dem CD4-Molekül T-troper HIV-Stämme als „Fusin“ bezeichnet wurde (Feng *et al.*, 1996), konnte nun als Chemokinrezeptor dem Liganden SDF-1 zugeordnet werden, und wurde umbenannt zu CXCR4 („vierter Rezeptor für CXC Chemokin“).

Als Wirtszelltropismus bezeichnet man das Phänomen, daß verschiedene HIV-Isolate verschiedene Zelltypen infizieren. Bis zur Entdeckung der Korezeptoren unterteilte man die HIV-Isolate nach dem Zielzelltropismus oder der Eigenschaft Synzytien zu induzieren (d.h. die starke Tendenz zur Zell-Zell-Fusion, was die Bildung sogenannter Riesenzellen [„Synzytien“] induziert). Nach einer neuen Nomenklatur werden Viren nach ihrer Korezeptornutzung unterteilt in X4-Varianten (CXCR4-spezifisch, generell aber nicht zwingend korrespondierend T-trop und Synzytien induzierend), R5-Varianten (CCR5-spezifisch, generell aber nicht zwingend korrespondierend M-trop und keine Synzytien induzierend) und R5X4-Varianten (CCR5 und CXCR4 nutzend und generell aber nicht zwingend korrespondierend dual-trop, d.h. permissiv für Makrophagen und T-Zelllinien) (Berger *et al.*, 1998). Wenn auch das Spektrum der Chemokinrezeptoren und das Ausmaß ihrer Expression im wesentlichen zum Wirtszelltropismus beitragen, gibt es doch Hinweise, daß noch andere zelluläre Faktoren den Wirtszelltropismus beeinflussen. So sind HIV-Stämme, welche die Rezeptoren CCR5, CXCR4 und CCR3 benutzen, nicht in der Lage, Makrophagen, die diese Rezeptoren exprimieren, zu infizieren (Dittmar *et al.*, 1997).

Eine Peptidschleife in der dritten variablen Region von gp120-SU, der sogenannte V3-Loop, ist involviert in Korezeptorbindung für HIV-1 und damit hauptsächlich verantwortlich für den Tropismus des Virus (Cocchi *et al.*, 1996). Auch für HIV-2 und SIVmac wurde gezeigt, daß der V3-Loop die Korezeptorspezifität beeinflusst (Albert *et al.*, 1996; Isaka *et al.*, 1999; Kirchhoff *et al.*, 1994a). In SIVagm konnten die variablen Domänen im Hüllprotein Env

ähnlich wie bei HIV-1 lokalisiert werden bis auf die V3-Region, die weiter C-terminal zu finden ist. Allerdings existiert korrespondierend zu dem HIV-1 V3-loop eine Region, die nicht hypervariabel ist, aber aufgrund ihrer flankierenden Cysteine auch eine Schleife bilden könnte und als "V3-Loop-Äquivalent" bezeichnet wird (Muller *et al.*, 1993). Ob allerdings diese korrespondierende V3-Region in SIVagm auch in Korezeptorspezifität involviert ist, wurde noch nicht gezeigt.

Neben CXCR4 und CCR5 werden von HIV eine Reihe von alternativen Korezeptoren benutzt: die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR8, CCR9, CXCR5 (BLR1), CX₃CR1 (V28), die Chemokinrezeptor-ähnlichen Rezeptoren APJ, ChemR23, GPR1, GPR15 (BOB), STRL33 (BONZO) und das virale Chemokinrezeptor-Homolog US28 (Kanbe *et al.*, 1999; Unutmaz *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 1999; Edinger *et al.*, 1999). Jedoch ist eine effiziente Nutzung dieser alternativen Rezeptoren selten und bei HIV-1 scheint eine Replikation in primären Zellen vor allem durch CCR5 oder CXCR4 vermittelt zu sein (Zhang *et al.*, 2000). HIV-2 ist indes mehr promiskuös und verwendet häufiger alternative Korezeptoren zum Zelleintritt (Owen *et al.*, 1998; Edinger *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu nutzen SIV hauptsächlich den Korezeptor CCR5, häufig die Chemokinrezeptor-ähnlichen Rezeptoren BOB und BONZO, aber normalerweise nicht CXCR4 (Chen *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 1997; Edinger *et al.*, 1998; Broder und Jones-Trower, 1999). Die Relevanz der alternativen Rezeptoren neben CCR5 für eine SIV Replikation und Pathogenese *in-vivo* bleibt noch zu prüfen. Allerdings wurde für SIVmac gezeigt, daß die Nutzung von BOB und BONZO *in-vivo* kaum Bedeutung findet (Pohlmann *et al.*, 1999). Ein SIV-Isolat aus einem Mandrill-Affen SIVmnd(GB-1) zeigt sich als Ausnahme unter den SIV-Stämmen: es verwendet hauptsächlich CXCR4 als Korezeptor (Schols und De Clercq, 1998).

1.5 Pathogenese von HIV – Rolle der Chemokinrezeptoren

Die HIV-Infektion ist durch drei Phasen gekennzeichnet: die akute Phase der primären Infektion, die asymptomatische und die symptomatische Phase, in der AIDS ausbricht. Die initiale Infektion ist gekennzeichnet durch eine starke Virusvermehrung (bis zu 10^7 virale RNA Kopien / ml Plasma) und eine Serokonversion innerhalb von 8 – 10 Wochen. Klinisch verläuft diese akute Phase häufig inapparent oder ist mit grippeähnlichen Symptomen und Lymphknoten-Schwellungen verbunden. Vorübergehend findet man ein Absinken der CD4+ Lymphozyten, der viralen Zielzellen, die sich nach der primären Virämie leicht erholen (Cooper *et al.*, 1985; Gaines *et al.*, 1990; Tindall und Cooper, 1991). Gleichzeitig mit Auftreten der antiviralen Immunantwort sinkt die Virusbelastung im Plasma auf ein konstant niedriges Niveau von etwa 10^3 - 10^6 RNA-Kopien / ml Plasma ab (Finzi und Siliciano, 1998). Dieses individuell unterschiedliche Niveau pendelt sich 6 – 12 Monate nach Infektion ein und

kann als Marker für die Prognose der Dauer der asymptomatischen Phase und des Krankheitsverlaufs gelten (Mellors *et al.*, 1996). Das Ende der im Schnitt 6-8 jährigen Latenzzeit ist charakterisiert durch einen Abfall der CD4+-Zellzahl unter 200 Zellen / μ l Blut und einem drastischen Anstieg der Viruslast parallel zu einem Versagen der Immunantwort. Das AIDS-Vollstadium geht einher mit Lymphadenopathie, neurologischen Symptomen und opportunistischen Infektionen, die letztendlich zum Tod führen (Pantaleo *et al.*, 1993a; Miedema *et al.*, 1990).

Die Lymphknoten stellen ein wichtiges Reservoir für das Virus dar. Hier findet man während der asymptomatischen Phase eine hochgradige Anreicherung HIV-infizierter Zellen sowie mit Antikörpern komplexierte Viren, die von einem Netzwerk aus folliculären dendritischen Zellen absorbiert und somit am Verlassen der Lymphknoten gehindert werden (Pantaleo *et al.*, 1993b). Pro Tag werden etwa 10^{10} infektiöse Viruspartikel freigesetzt und vom Immunsystem eliminiert. Mehr als 99% der Viren werden von neu infizierten CD4+ T-Zellen produziert, deren Halbwertszeit 1,6 Tage beträgt. Daraus resultiert eine Erhöhung des gesamten CD4+ Zellumsatzes um den Faktor 25. (Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995). Das Gleichgewicht aus massiver Virusproduktion und Immunabwehr bricht beim Übergang in die symptomatische Phase zusammen. Das Auftreten von hochvirulenten Virusvarianten, die sich in den lymphatischen Organen explosionsartig vermehren führt im AIDS-Stadium zur Zerstörung der Lymphknotenarchitektur und damit zur Ausschwemmung der produzierten Viren in das periphere Blut (Finzi und Siliciano, 1998). Der Abfall der CD4+ T-Zellen kann nicht alleine durch die beschleunigte Zerstörung der reifen CD4+ T-Zellen und damit durch eine Ausschöpfung des Immunsystems erklärt werden ((Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995), sondern man sollte auch eine beeinträchtigte Produktion der T-Zellen im Knochenmark, Thymus und Lymphknoten in Betracht ziehen (McCune, 2001). Die Mechanismen, die zur Zerstörung reifer CD4+ T-Zellen führen, schließen neben der direkten zytolytischen Wirkung durch das Virus auch Apoptose-Mechanismen oder Elimination der infizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen mit ein. Eine beeinträchtigte T-Zellproduktion begründet sich auf direkte mit dem Virus assoziierte Effekte, wie Infektionsvermittelter Tod der Vorläuferzellen und Zerstörung des unterstützenden, für die Hämatopoese nötigen, stromalen Netzwerkes, oder auf indirekte Viruseffekte. Dazu gehören z. B. opportunistische Infektionen des Knochenmarks und eine Zytokin-Dysfunktion (McCune, 2001). Außerdem kommt es während der Infektion zu einer Verschiebung des Th1-Zytokinprofils zum Th2-Profil, wodurch die zelluläre Immunabwehr geschwächt wird (Shearer und Clerici, 1998; Clerici und Shearer, 1993). Trotz zahlreicher Erkenntnisse seit der Entdeckung des Erregers ist die HIV-Pathogenese noch nicht vollständig verstanden.

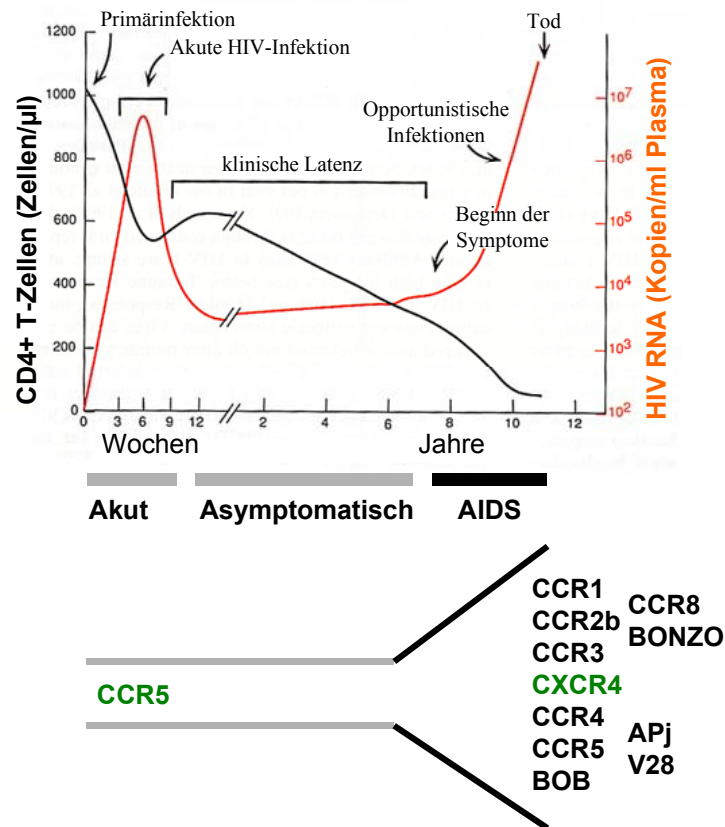


Abb. 6: Infektionsverlauf von HIV-1 in Korrelation mit Virustropismus
 Dargestellt ist der klinische Verlauf der CD4-Zellzahl (schwarze Kurve) und der Viruslast (rote Kurve) im Verlauf der HIV-1 Infektion. Die Balken unter der Graphik geben die Stadien der Erkrankung an. Schematisch dargestellt in der unteren Hälfte der Abbildung ist die Korezeptornutzung der Virusisolate im Infektionsverlauf. Das Korezeptorspektrum erweitert sich von CCR5 zu vielen verschiedenen Korezeptoren einschließlich CXCR4 und diese Erweiterung ist assoziiert mit dem Beginn des AIDS-Stadiums.

Eine für die HIV-Pathogenese wichtige Determinante ist die Rolle der Chemokinrezeptoren im Laufe der Infektion. Die initiale Transmission von HIV-1 wird durch M-trope Stämme verursacht, die den Rezeptor CCR5 benutzen. Dabei sind Langerhans'sche Zellen zugehörig zur dendritischen Zellfamilie im Epithelium der Mucosa sowie Makrophagen im submucosalem Gewebe die initialen Zielzellen für HIV-1 (van't Wout *et al.*, 1994; Zaitseva *et al.*, 1997). Obwohl auch beschrieben wurde, daß der Chemokinrezeptor CXCR4 auf beiden Zielzellen funktionell ist (Tchou *et al.*, 2001; Valentin *et al.*, 2000), treten initial nur R5-Virusvarianten auf. Im Verlauf der Infektion finden sich Virusvarianten, die ein erweitertes Korezeptorspektrum und u. a. auch CXCR4 nutzen, was mit dem Beginn der AIDS-Phase korreliert (Xiao *et al.*, 1998). In einer Studie über vertikale HIV-1 Transmission war die Krankheitsprogression von Kindern assoziiert mit dem Verlust der viralen Sensitivität

gegenüber CC-Chemokinen und dem Auftreten von CXCR4-tropen Varianten (Scarlati *et al.*, 1997). Auch in einer weiteren Studie wurde gezeigt, daß ein erweitertes Korezeptorspektrum und ein Wechsel der Korezeptornutzung von CCR5 zu CXCR4 assoziiert ist mit der Progression zu AIDS (Connor *et al.*, 1997) (Abb. 6).

1.6 SIVagm als Tiermodell

Neben *in-vitro* Untersuchungen sind Tiermodelle von großer Bedeutung für das Verständnis der AIDS-Pathogenese. Simiane Immundefizienzviren, wie z. B. SIVagm, sind in ihren natürlichen Wirten nicht pathogen (Cichutek und Norley, 1993). In der Natur sind 30 bis 40 % der adulten Afrikanischen Grünen Meerkatzen (AGM) mit SIVagm infiziert (Kanki *et al.*, 1985), sie weisen keine Symptome des SAIDS auf und zeigen keinen Abfall der CD4-positiven Lymphozyten (Cichutek und Norley, 1993). Mit SIVagm3mc steht ein molekularer, apathogener SIV-Klon, isoliert aus einer AGM äthiopischen Ursprungs, zur Verfügung, der hinsichtlich seiner biologischen Eigenschaften gut charakterisiert ist (Baier *et al.*, 1990). Die biologische Aktivität *in-vivo* wurde durch eine Serokonversion nach Infektion von AGM und Schweinsaffen überprüft. Auch im Verlauf der experimentellen Infektion zeigten die Tiere keine Krankheitssymptome (Baier *et al.*, 1989). Die Korezeptorspezifität molekularer apathogener SIVagm-Klone, wie z. B. SIVagmSab1.4 und SIVagmTYO, zeigten eine starke Präferenz für die Chemokinrezeptoren CCR5, Bob und Bonzo (Edinger *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 1996) und auch für SIVagm3mc gab es erste Hinweise auf die Nutzung des Korezeptors CCR5 (Holtkamp, 1999). Da SIV normalerweise nicht den Korezeptor CXCR4 zum Zelleintritt nutzen (Edinger *et al.*, 1999; Marx und Chen, 1998), erschien es interessant zu untersuchen, welchen Einfluß ein Korezeptorwechsel zu CXCR4 auf die apathogene SIVagm-Infektion hervorrufen kann. Bei HIV-1, wie auch bei HIV-2 wurde gezeigt, daß ein Anstieg der Nettoladung im V3-Loop die Korezeptorspezifität von CCR5 zu CXCR4 verändert (Shioda *et al.*, 1992; Isaka *et al.*, 1999). Allerdings führten einzelne Aminosäureaustausche im V3-Loop des SIVmac, die eine höhere Nettoladung zur Folge hatten, nicht zu einer effizienten Nutzung von CXCR4 (Meister *et al.*, 2001). Auch ein kompletter Austausch des V3-Loops von SIVmac durch den von HIV-1 zeigte keinen Erfolg: entsprechende Virusvarianten waren nicht replikationskompetent (Kirchhoff *et al.*, 1994b). Eine Untersuchung des Wechsels der Chemokinrezeptoren von CCR5 zu CXCR4 beim apathogenem SIVagm könnte neue Erkenntnisse bringen über den Einfluß der Korezeptornutzung auf Replikation und Pathogenese von SIV.

1.7 Zielsetzung

Beim Infektionsverlauf mit HIV-1 ist die Krankheitsprogression mit dem Auftreten von Virusvarianten assoziiert, die den Chemokinrezeptor CXCR4 zum Zelleintritt nutzen. Im Gegensatz dazu wird bei der SIV-Infektion ein breiteres Korezeptorspektrum als bei HIV-1 verwendet und es kommt nicht zu einem Korezeptorwechsel von CCR5 zu CXCR4. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluß eines solchen Korezeptorwechsels auf Replikation und Pathogenese einer apathogenen SIV-Infektion untersucht. Dabei sollte eine replikative Variante des SIVagm3mc hergestellt werden, die den Korezeptor CXCR4 verwendet. Anschließend wurden *in-vitro* Experimente durchgeführt, um die Replikation des neuen CD4/CXCR4-nutzenden Virus mit der des Wildtyp-Virus zu vergleichen. Nach Infektion von Schweinsaffen mit SIVagm3mc oder mit dem CXCR4-tropen Virus sollten die *in-vivo* Eigenschaften beider Viren verglichen und der Einfluß der geänderten Korezeptornutzung auf den Infektionsverlauf geklärt werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien und Methoden der Molekularbiologie

2.1.1 Plasmide und Bakterienstämme

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide wurde der Vektor pGEM-7Zf(+) (Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg) eingesetzt. Das TOPO-TA-Cloning®-Vektorsystem (Invitrogen, Leek, Niederlande) fand Verwendung bei der direkten Klonierung von PCR-Produkten, die durch die Synthese mit der Taq-Polymerase 3'-endständig ungepaarte Desoxyadenosine enthielten.

Für die Herstellung chimärer Proviren wurden die nachfolgend beschriebenen Plasmide verwendet. Der Molekularklon pSIVMB2, sowie seine Vorläuferplasmide pSIVMB1 und pEX2.4, enthalten provirale Sequenzen des Simianen Immundefizienzvirus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (SIVagm3mc), welche aus dem Isolat SIVagm3 aus einer langzeitinfizierten gesunden AGM isoliert und kloniert wurden (Baier *et al.*, 1990). pSIVMB2 enthält zusätzlich zu der vollständigen proviralen Struktur Sequenzen des *env*-, *tat*-, *rev*-, und *nef*-Gens. Dieses Plasmid wurde durch Kombination von pSIVMB1, das ein zirkulär permutiertes Provirus des SIVagm3 mit nur einer LTR trägt, mit pEX2.4 kloniert, welches ein Teil des *env*-Gens, *nef* und die 3'-LTR enthält. Das Konstrukt pTr712 enthält die trunkierten proviralen Sequenzen des HIV-1-Glycoproteins *env* des HIV-1-Isolats BH10, wobei darin der Peptidloop der dritten variablen Domäne (V3-Loop) enthalten ist (Wilk *et al.*, 1992).

Die im folgenden genannten Nukleotidpositionen beziehen sich auf die in der EMBL/DDBJ/Genbank dargestellte Sequenz des SIVagm3 (M30931), beginnend mit Nukleotid 1 (A1) der R-Region der 5'-LTR. Das Plasmid pSN3.9 (Dittmar *et al.*, 1995) repräsentiert die 3'-Hälfte des SIVagm3-Provirus. Zu dessen Konstruktion wurde die subgenomische Region, beginnend ab der Erkennungsstelle für die Endonuklease *SpeI* (A5382) im *pol*-Gen bis zur Erkennungsstelle für *NarI* (A9317) nach der 3'-LTR, in den Vektor pBluescript inseriert.

Zur Klonierung wurde der Bakterienstamm TOP10F' (Invitrogen, Leek, Niederlande) verwendet und zur TOPO-TA-Cloning-Reaktion die Bakterienzellen OneShot™ (Invitrogen, Leek, Niederlande).

2.1.1.1 Restriktion, Dephosphorylierung, Einfügen eines Linkers und Ligation von Plasmid-DNA

Restriktionen von Plasmid-DNA wurden mit Endonukleasen der Firma NEB (Schwalbach) durchgeführt. Mittels der alkalischen Phosphatase (calf intestinal alkaline phosphatase / CIP; NEB, Schwalbach) wurde die Möglichkeit einer Religation von Plasmid-DNA reduziert, falls Vektoren nur mit einer Endonuklease linearisiert wurden. Dieses Enzym entfernt die für eine effiziente Ligation nötigen 5'-Phosphatgruppen der DNA. Eingesetzt wurden 10 Units CIP für eine Stunde bei 37° C mit anschließender Hitzeinaktivierung (10 min / 75° C).

Um noch nicht vorhandene Restriktionsschnittstellen in Plasmide einzuführen, wurde ein Linker eingesetzt. Dieser bestand aus zwei komplementären, 5'-phosphorylierten, sich überlappenden Nukleotiden mit der Erkennungssequenz für eine Endonuklease. Die Nukleotide wurden in äquimolaren Mengen 5 min gekocht und langsam auf RTemp abgekühlt. Danach konnte das entstandene Fragment zur Ligation eingesetzt werden.

Die Ligation von Restriktionsfragmenten oder PCR-Produkten mit entsprechend geschnittener Vektor-DNA erfolgte im molaren Verhältnis 2 : 1 und fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl statt, wobei über Nacht bei 4° C mit 200 U T4-Ligase (NEB, Schwalbach) inkubiert wurde. Außerdem wurden auch Ligationen mit dem „Rapid-DNA“-Ligations-Kit (Boehringer, Mannheim) für 5 min bei RTemp nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels einer horizontal Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Länge der zu trennenden Fragmente wurden 1 - 3 %ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 1 - 3 g Agarose (Gibco/BRL, Eggenstein) in 100 ml 1 × TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) gekocht, auf ca. 60° C abgekühlt und 0,1 µg / ml Ethidiumbromid zugegeben. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 1 × TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6 × Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol FF, 30 % Glycerol in Aqua bidest) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und 1 - 2 Stunden bei 80 - 120 Volt aufgetrennt. Die verwendete Spannung richtete sich nach der Gelkonzentration. Als DNA-Größenstandard wurde 1 kb DNA-Leiter (Gibco/BRL, Eggenstein), Hae III restringierte φX174 DNA (Pharmacia, Freiburg) und 100 bp DNA-Leiter (NEB, Schwalbach) verwendet. Die aufgetrennten Banden konnten auf einem UV-Transilluminator (302 nm) sichtbar gemacht und photographiert werden.

Die Fragmentlängen der Größenstandards in bp:

1 kb DNA-Leiter:	134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506/517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216
φX174 DNA-Hae III:	72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 8723, 1078, 1353
100 bp DNA-Leiter:	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1517

2.1.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

2.1.3.1 Reinigung von PCR-Produkten oder Plasmidfragmenten

PCR-Produkte und Plasmidfragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels des QIAEX II-Gelextraktions-Kits der Firma Qiagen (Hilden) aus der Gelmatrix nach Angaben des Herstellers extrahiert. Das Prinzip dieser Reinigungsmethode beruht auf der Adsorption von DNA an die QIAEX-Glaskügelchen-Emulsion. Die Fragmente wurden auch mit Hilfe des QIAquick PCR-Purifikations-Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.1.3.2 Reinigung von Fragmenten nach einer Sequenzierreaktion

Zur Entfernung von überschüssigen Dye-Terminatoren nach einer Sequenzierreaktion wurde entweder das DyeEx Spin-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet oder die Sequenzierproben wurden mit Hilfe einer Na-Acetat / Ethanol-Fällung aufgereinigt. Dabei wurde ein Probenvolumen von 100 µl mit 1/10 Vol 3M Na-Acetat und 2,5 Vol 100%igem Ethanol bei RTemp für 30 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert (Mikrozentrifuge, Eppendorf, Köln). Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen (13000 rpm, 30 min, RTemp), getrocknet und danach für den Auftrag auf das Sequenziergel vorbereitet.

2.1.4 Plasmid-Präparation

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien erfolgte mit den Plasmid-Kits der Firma Qiagen (Hilden). Zur Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer 5 ml Übernachtskultur (LB-Medium [10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; ad 1 Liter A. dest., autoklaviert] supplementiert mit 50 µg / ml Ampicillin zunächst für 10 Minuten bei 3.000 Upm in einer Zentrifuge (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) pelletiert. Anschließend wurde das Sediment mit vom Hersteller beigefügten Puffern lysiert, pelletiert und die Plasmid-DNA aus dem Überstand über eine Anionenaustauschersäule isoliert. Zur Präparation einer großen Anzahl unterschiedlicher Klone wurde das QIAprep-8-Kit verwendet und zur Präparation von DNA für eine spätere Sequenzierung das QIAprep-Spin-Kit.

Große Mengen an Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) wurden aus 300 ml Übernachtskulturen gewonnen. Die Bakterienzellen wurden für 15 Minuten bei 5.000 Upm in einem JA14-Rotor (Beckman, München) pelletiert und mit Hilfe der dem Präparationskit beigefügten Puffer lysiert. Die anschließende Isolierung und Reinigung der DNA erfolgte mit tip-500-Säulen nach den Angaben des Herstellers. Die erhaltene Menge an DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.1.5 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurde der Bakterienstamm TOP10F' mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode kompetent gemacht. Nach dem Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtskultur wurde die Bakteriensuspension bei 37° C bis zu einer Dichte (OD_{550}) von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, bei 6.000 rpm und 4° C pelletiert (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) und in 40 ml TFB1 (30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, danach sterilfiltriert) resuspendiert. Nach einer Inkubationzeit von 15 Minuten auf Eis und einer Zentrifugation bei 6.000 Upm und 4° C resuspendierte man das Bakterienpellet in 4 ml TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15 % Glycerin, pH 6,5 mit KOH-Lösung eingestellt, danach sterilfiltriert). Die Bakteriensuspension wurde dann in Aliquots à 100 µl aufgeteilt und auf Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1 - 2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Temperaturschock (45 s / 42° C; 2 min / Eis) wurden die Bakterien mit 500 µl SOC-Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein) versetzt und entweder bei 37° C für eine Stunde oder bei 25 °C für 4 Stunden (zur Klonierung großer Plasmide über 12 kbp) in einem Bakterienschüttler kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agaroseplatten, die mit dem jeweiligen Antibiotikum supplementiert waren, ausgestrichen und entweder bei 37° C über Nacht oder bei Raumtemperatur 2 - 3 Tage inkubiert.

2.1.6 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Die Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAamp-Blood-Kits der Firma QIAGEN (Hilden). Hierzu wurden 5×10^5 Zellen verwendet, die in 200 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄) resuspendiert worden waren. Die Isolierung der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die DNA in 50 µl Aqua bidest gelöst und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Pharmacia-UV-Spektrometer (Gene Quant II, RNA/DNA-Calculator, Pharmacia Biotech), welches die Messung kleiner Volumina erlaubte.

2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können spezifische Nukleotidsequenzbereiche amplifiziert werden (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987), entweder direkt ausgehend von genomischer DNA, cDNA oder Plasmid-DNA. Im Anschluß an die PCR kann das amplifizierte Fragment in weiteren molekularbiologischen Techniken eingesetzt werden. Mit Hilfe der Taq-Polymerase, einer thermostabilen, aus dem Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus* stammenden, DNA-abhängigen DNA-Polymerase, kann ein ausgewählter Nukleotidsequenzbereich synthetisiert werden, falls entsprechende Pufferbedingungen vorliegen und zwei Start-Oligonukleotide (Primer) sowie Desoxynukleotide vorhanden sind. Außerdem müssen die Zyklusbedingungen, abhängig von den Schmelztemperaturen der Primer, richtig gewählt sein.

Eine 100 µl-Standard-PCR enthält 10 x PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % Gelatine), 10 µM (+)-Primer, 10 µM (-)-Primer, 200 µM je Desoxynukleotid, 2,5 Einheiten Polymerase und DNA mit der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz. Pro Reaktion wurden ausgehend von Plasmid-DNA 100 ng und bei genomischer DNA 600 ng eingesetzt. Ein typischer PCR-Zyklus besteht aus einem ersten Schritt, in dem die DNA bei 94°C zu Einzelsträngen denaturiert, gefolgt von einer Hybridisierungsphase, in der strangspezifische Primer bei 50° C - 60° C (je nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide) hybridisieren können. Daraufhin folgt die Polymerase-Reaktion bei 72° C bzw 68°C, dem Temperaturoptimum der jeweiligen Polymerase. Durch Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte (Denaturierung, Hybridisierung der Primer, Polymerisation zum Doppelstrang) kommt es zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung des gewählten DNA-Bereiches. Bei jeder PCR-Reaktion wurde vor dem ersten Reaktionszyklus noch eine 3-minütige (bzw 15-minütig bei Verwendung der Taq-Gold-Polymerase) Denaturierungsphase bei 94° C vorgeschaltet, um eine vollständige Denaturierung der DNA-Stränge zu erreichen. Außerdem wurde nach den Zyklen eine 10-minütige Phase bei 72° C bzw 68° C angeschlossen, in der die Polymerisation noch nicht fertig synthetisierter Stränge vervollständigt werden konnte.

Zur Klonierung von chimären Plasmiden wurde das „Expand High Fidelity PCR System“ von Boehringer, Mannheim verwendet. Es enthält eine Mixtur aus Taq und Pwo Polymerase mit „proofreading Aktivität“ zur Vermeidung von Falscheinbauten von Nukleotiden in den wachsenden PCR-Strang. Das Temperaturoptimum zur Polymerisation liegt bei diesem System bei 68° C. Zum Nachweis von einer spezifischen Sequenz als auch zur Amplifikation ausgehend von genomischer DNA wurde AmpliTaq-GoldTM-DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Vaterstetten) eingesetzt. Ihr Temperaturoptimum befindet sich bei 72° C. Sie wird erst durch eine Hitzebehandlung (15 min / 94° C) vor den eigentlichen PCR-Zyklen aktiviert. Durch diesen sogenannten „Hot-start“ werden unspezifische Primeranlagerungen und damit

verbundene unspezifische Polymerisation vermieden und der spezifische Produktertrag wird maximiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in den Kapiteln 2.1.10.1 – 2.1.10.4 aufgeführt. Die angegebenen Nukleotidnummern beziehen sich auf die Numerierung der Genome des SIVagm3mc (M30931) und des HIV-1-Isolates BH10 (M15654) wie sie in der EMBL/DDBJ/Genbank vorliegen. Ein vorangestelltes „A“ vor einer Nukleotidposition weist darauf hin, daß diese Nukleotidposition innerhalb der SIVagm3mc-Genomsequenz zu finden ist. Ein vorangestelltes „B“ zeigt an, daß sich das Nukleotid, dessen Position angegeben wurde, innerhalb der Sequenz des BH10 befindet.

2.1.8 Fusions-PCR

Zur Klonierung chimärer proviraler Plasmide wurde die rekombinante oder Fusions-PCR eingesetzt. Diese nach Horton *et al.* (Horton *et al.*, 1989) modifizierte Methode ermöglicht die Rekombination zweier oder mehrerer DNA-Fragmente an einer beliebigen Stelle ohne Restriktionsendonucleasen zu verwenden. Dies war notwendig, da die Genome beider Immundefizienzviren SIVagm3mc und HIV-1 (BH10) genetisch zu sehr divergierten. Um spezifische Gene innerhalb der Virusgenome auszutauschen, wurden zunächst drei Fragmente mit Hilfe der PCR (siehe Kap. 2.1.7) amplifiziert (siehe Abb. 7).

Der Überhang des 5'-Oligonucleotidprimers B1 ist homolog zur 3'-Sequenz des ersten PCR-Fragmentes und entspricht in der Abbildung 1 der Primersequenz A2. Der Überhang des 3'-Oligonucleotidprimers B2 ist homolog zur 5'-Sequenz des dritten PCR-Fragmentes und entspricht in der Abbildung 1 der Primersequenz C1. Alle drei Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, gereinigt (siehe Kap. 2.1.3.1) und anschließend in äquimolaren Mengen (50 - 100 ng) in der Fusions-PCR eingesetzt. Dabei wurden zunächst in den ersten 10 Amplifikationsrunden keine Primer zugegeben, um das Fusionsfragment zu generieren. Die Amplifikation des fusionierten PCR-Fragmentes erfolgte in den folgenden PCR-Cyclen mit Hilfe der äußeren Primer A1 und C2. Das rekombinierte PCR-Fragment konnte mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen (zugehörige Erkennungsstellen : R) geschnitten und mit einem Vektor, der mit denselben Endonucleasen geöffnet worden war, ligiert werden.

Die Herstellung der Fusions-PCR für den Austausch der variablen Domäne 3 (V3-Loops) innerhalb des *env*-Gens des SIVagm3mc wurde in Zusammenarbeit mit Stefanie Steidl durchgeführt.

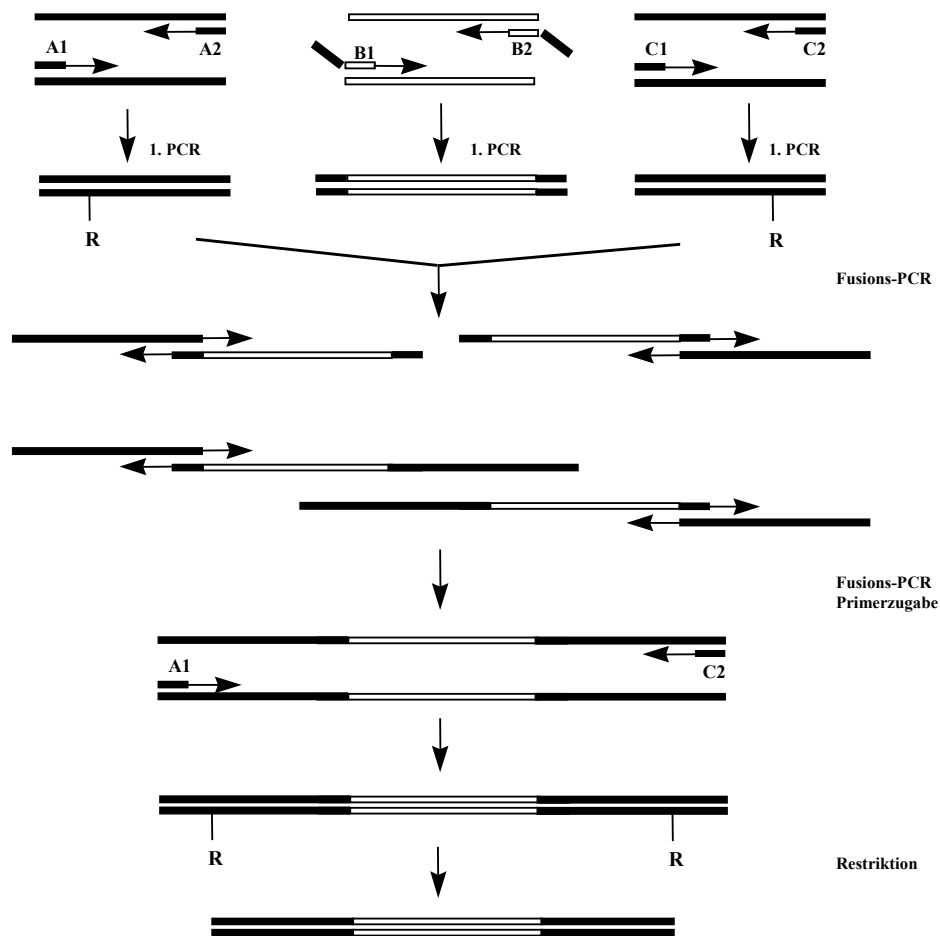


Abb. 7: Schematische Darstellung der Fusions-PCR

A1, A2, B1, B2, C1 und C2 repräsentieren die verwendeten Oligonukleotidprimer.
R ist gleichbedeutend mit der Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease

2.1.9 Nukleotidsequenzbestimmung

Die Sequenzierungen erfolgten mit dem Dye-Desoxy-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt). Eingesetzt wurden pro 8 μl Ansatz 2 μl des von der Firma mitgelieferten Premix, 0,5 μg DNA und 1 μl eines 10 μM Primers (10 pmol). Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler der Fa. Biometra:

PCR-Reaktion: 96° C, 15 sec; 50° C 15 sec; 60° C, 4 min; 39 Zyklen.

Danach wurden die Proben aufgereinigt (siehe Kap. 2.1.3.2), getrocknet, in 2 μl Auftragspuffer (0,5 μl Formamid, 0,5 μl Agarose-Ladepuffer, 25 mM EDTA [pH 8,0]) aufgenommen, 2 min bei 90° C denaturiert und auf das Sequenziergel aufgetragen.

Die Auswertung wurde mit dem automatischen DNA-Sequenzer Modell 373A durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Prinzip, daß fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (jeweils vier verschiedene Farbstoffe für jedes Didesoxynukleotid) als Terminatoren eingebaut werden, da ihnen das für das weitere Wachstum der DNA-Kette nötige 3'-Hydroxylende fehlt zur Knüpfung der Phosphodiesterbindung. Mittels eines Argonlasers werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und ihre Emission kann gemessen werden. Die Auswertung führte Dipl. Ing. M. Selbert in der Abtlg. für Medizinische Biotechnologie am Paul-Ehrlich-Institut durch.

2.1.10 Oligonukleotide

Die benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma ARK (Darmstadt) bezogen mit Ausnahme der Oligonukleotide für die Taqman-PCR (Applied-Biosystems, Weiterstadt). Nach Bestimmung der optischen Dichte konnte eine Standardkonzentration von 10 µM eingestellt werden. Die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind durch Unterstreichung gekennzeichnet.

2.1.10.1 Oligonukleotide zur Herstellung chimärer Proviren zwischen dem SIVagm3mc und dem HIV-1-Isolat BH10 (Austausch der variablen Domäne V3 im *env*-Gen)

Oligonukleotide zur Amplifizierung des 5'-env-Genfragmentes im SIVagm3mc:

A6199(+):

5'-CCACTTTGCCGTGTGTCCAGAACAAG-3'

A6724(-):

5'-GTAAGTGTAGATTGTAATG-3'

PCR-Bedingungen: 94° C / 45 sec, 55° C / 45 sec, 68° C / 50 sec; 35 Zyklen

Oligonukleotide zur Amplifizierung des 3'-env-Genfragmentes im SIVagm3mc:

A6828(+):

5'-CACTTCCAGGGCAACTGGAG-3'

A7427(-):

5'-GCCTAGGAACCCTAGCACGAACGGG-3'

PCR-Bedingungen: 94° C / 45 sec, 55° C / 45 sec, 68° C / 50 sec; 35 Zyklen

Oligonukleotide zur Amplifizierung der variablen Domäne (V3-Loop) im HIV-1-Isolat BH10:

Die kursiv dargestellten Nukleotide stellen den homologen Überhang zu der entsprechenden Sequenz des SIVagm3mc dar.

A6705/B6464(+):

5'-CATTACAATCTAACAGTTACTTGCACAAGACCCAACAACAATAC-3'

A6847/B6572(-):

5'-CTCCAGTTGCCCTGGAAGTGACAATGTGCTTGTCTCATATTTCC-3'

PCR-Bedingungen: 94° C / 45 sec; 55° C / 45 sec; 68° C / 30 sec; 40 Zyklen

*Fusions-PCR:*PCR-Bedingungen für die ersten 10 Zyklen ohne Primer: 94° C / 45 sec; 55° C / 45 sec;
68° C / 60 sec;Zugabe der Primer **A6199(+)** und **A7427(-)**PCR-Bedingungen für die nächsten 25 Zyklen mit Primer: 94° C / 45 sec; 57° C / 45 sec;
68° C / 60 sec + 2 sec pro Zyklus;**2.1.10.2 Oligonukleotide zur Einfügung eines Linkers zur Klonierung des Vollängenplasmides SIVagm3-X4****AatII/HindIII/AatII(+):**5'-P-[∨]CCCGGAAGCTTCGCTAGGACGT[∨]-3' ([∨]AatII-HindIII-AatII[∨])**AatII/HindIII/AatII(-):**5'-P-_∧CCTAGCGAAGCTTCCGGGACGT_∧-3' (_∧AatII-HindIII-AatII_∧)**2.1.10.3 Oligonukleotide zur Nachweis der variablen Domäne im env-Gen ausgehend von genomischer DNA****A6646(+):**

5'-CCCAGATATGGCAGAAACATAGAG-3'

A7079(-):

5'-CTTCGTACCATTACACGGATTATGG-3'

PCR-Bedingungen: 94° C / 60 sec; 57° C / 45 sec; 72° C / 45 sec; 34 Zyklen

2.1.10.4 Oligonukleotide zur Nukleotidsequenzbestimmung:**A6646(+):**

5'-CCCAGATATGGCAGAAACATAGAG-3'

A6926(-):

5'-CTCTTCAGTATCATTGGTTCCTTGG-3'

2.1.10.5 Oligonukleotide für die Taqman-PCR

AVFOR1:

5'-CAGATGCTCGCTGGCTTGTA-3'

AVREV1:

5'-GCCAACCAGGTTAGGCTAACC-3'

AVSo1:

5'-F-AACACCCAGGCTCAAGCTGGTCTCCTAGT-Q-P-3'

Reporter: FAM, Quencher: TAMRA; am 3'-Ende phosphoryliert, um eine Extension zu verhindern;

PCR-Bedingungen für die Messung der Provirusbelastung: 95° C / 10 min; 95° C / 15 sec; 60° C / 1 min; 45 Zyklen

PCR-Bedingungen für die Plasmavirämie-messung: RT-Reaktion: 50° C / 30 min; PCR: 95° C / 15 min; 95° C / 15 sec; 60° C / 2 min; 45 Zyklen

2.2 Materialien und Methoden der Zellkultur

2.2.1 Zellen und Medien

Die Suspensions-Zelllinien C8166 (Clapham *et al.*, 1987), eine T-Lymphozyten-Zelllinie, ebenso wie Molt4.8 (Kikukawa *et al.*, 1986) wurden in RPMI 1640 (nach GIBCO/BRL, Eggenstein) gehalten, zweimal wöchentlich im Verhältnis 1 : 15 passagiert und mit frischem Medium versetzt.

Die adhärennten GHOSTcl.34-Zellen (Cecilia *et al.*, 1998) wurden in DMEM (nach GIBCO/BRL, Eggenstein) gehalten und zusätzlich mit unten aufgeführten Antibiotika kultiviert. Zur Zellpassage wurden die Zellen mit einer 1 mM EDTA/PBS-Lösung aus den Kulturgefäßen gelöst und zweimal wöchentlich 1:15 umgesetzt und mit frischem Medium versetzt. Die Zellen wurden aus der humanen Osteosarkomzelllinie HOS entwickelt und enthalten ein von einer HIV-2-LTR getriebenes Reporterkonstrukt, welches ein Gen kodierend für das humane „Green-Fluorescent-Protein“ (hGFP) enthält. Nach Infektion von HIV oder SIV wird durch das Tat-Protein die GFP-Proteinsynthese induziert und die Zellen können unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Außerdem exprimieren die Zellen neben humanem CD4 auch einer der folgenden Korezeptoren: CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, V28, BOB, BONZO und CXCR4. Eine der GHOSTcl.34-Zelllinien enthält keinen Korezeptor und wird deshalb als GHOST-Parental bezeichnet. Das komplette Set, bestehend aus 11 Zelllinien werden im folgenden als GHOST-Zelllinien bezeichnet. Zur Erhaltung der Expression des CD4-Rezeptors und des hGFP wurden die Ghost-Zelllinien mit 500 µg / ml G418 und 100 µg / ml Hygromycin supplementiert und zur Erhaltung der Korezeptorexpression wurden alle Zelllinien bis auf die parentale mit 1 µg / ml Puromycin versetzt.

Zum Waschen der Zellen wurde PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄) verwendet. Alle Kulturmedien wurden supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (Biochrom KG, Berlin), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin), und Antibiotika (100 Einheiten / ml Penicillin, 50 mg / ml Streptomycin, [Biochrom KG, Berlin]). Das fötale Kälberserum (FKS oder BSA) wurde vor Gebrauch zur Inaktivierung von Komplementkomponenten 30 min bei 56° C inkubiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus, Hanau) bei 37° C, 5 % CO₂ und gesättigter Wasserdampfatmosfera.

2.2.2 Präparation und Kultivierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und mononukleären Blutzellen der Lymphknoten (LNMC).

Zur Isolierung von peripheren Blutlymphozyten und Monozyten aus heparinisiertem Vollblut von Schweinsaffen, Rhesusaffen oder Afrikanischen Grünen Meerkatzen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation in Ficoll (Histopaque 1077, Sigma, Deisenhofen), einer Polysaccharose der Dichte 1.077 g / l, durchgeführt. Hierzu wurden 15 ml heparinisiertes Vollblut auf die Membran eines mit 15 ml Ficoll gefüllten Leucosep-Röhrchens (Greiner, Solingen) pipettiert und für 30 min bei 200 g bei RTemp ohne Bremse zentrifugiert (2200 rpm, Minifuge T, Heraeus, Hanau). Aufgrund ihrer höheren Dichte wandern dabei die Erythrozyten und Granulozyten durch die Membran nach unten, während die PBMC oberhalb der Membran einen weißen Ring im Plasma bilden. Mit einer Pipette wurden die PBMC aus der Interphase abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 Minuten bei RTemp). Durch die anschließende Aufnahme in hypotone 0,86%ige Ammoniumchlorid-Lösung für 10 bis 30 min bei 37° C im Wasserbad werden verbleibende Erythrozyten entfernt. Anschließend wurden die PBMC noch zweimal mit PBS gewaschen. Entweder wurde mit einem automatischen Zellzähler (Coulter Counter ZM, Krefeld) oder mit einer Neubauer-Zählkammer die Zahl der isolierten PBMC bestimmt. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Medium mit 20 % FKS, 2 mM L-Glutamin und den unter Punkt 2.2.1 aufgeführten Antibiotika. Die Zellzahl wurde dabei auf ca 2×10^6 PBMC / ml Medium eingestellt. Die PBMC wurden mit 10 µg / ml Phytohämagglutinin (PHA) (Wellcome, Dartford, Großbritannien) und 200 Units IL-2 (Eurocetus, Frankfurt) pro Milliliter zur Proliferation angeregt.

Bei Blutentnahmen zur *in-vivo*-Studie der SIVagm3mc und SIVagm3-X4 infizierten Schweinsaffen wurden die PBMC folgendermaßen aufgeteilt:

- 5×10^6 Zellen für die Bestimmung der zellassozierten Virusbelastung
- $1,5 \times 10^6$ Zellen für die Virusreisolierung
- 5 Proben á 5×10^5 Zellen für die Messung der Provirusbelastung
- 1×10^6 Zellen für die FACS-Messung.

Der Rest der Zellen wurden in vorgekühltem Einfriermedium, d.h. 90 % FKS, 10 % DMSO (Merck, Darmstadt), aufgenommen und sofort bei -70° C über Nacht (ÜN) eingefroren. Die permanente Lagerung erfolgte in Stickstoffphase. Die Blutpräparationen zur oben genannten Studie übernahmen zum Teil N. Norley und M. Schütze.

Zur Präparation von LNMC wurden Lymphknoten mit Hilfe eines Siebes und eines Glasmörsers zerrieben, so daß die den Lymphknoten umhüllende Bindegewebeschicht zerstört wurde und die LNMC in das umgebende PBS freigesetzt wurden. Die Zellsuspension wurde nach der oben beschriebenen Vorgehensweise aufbereitet.

2.2.3 Plasma- und Serumgewinnung

Das Plasma, das aus der PBMC-Isolierung gewonnen wurde, wurde für verschiedene Nachweisverfahren weiter aufbereitet. Nach der ersten Zentrifugation des Vollbluts (siehe 2.2.2) befindet es sich oberhalb des Lymphozytenringes und kann mit einer Pipette abgenommen werden. Um noch eventuell vorhandene Zellen abzutrennen, wurde das Plasma für 30 min bei 500 g bei 4°C zentrifugiert und anschließend bei -70° C gelagert. Zur Bestimmung der Plasmavirämie infizierter Affen wurde das Plasma in je 1,5 ml Sarstedt-Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) zu je 0,5 ml aliquotiert und für 2 Stunden bei 4° C und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Viruspellet bei -70° C gelagert.

Das Serum wurde nach Abschluß der Blutgerinnung durch Zentrifugation bei 450 g für 20 min aus 2 ml nicht-heparinisiertem Vollblut gewonnen. Zur Virusinaktivierung wurde das Serum infizierter Affen für 30 min bei 56° C im Wasserbad inaktiviert.

2.2.4 Transfektion

Die Transfektion der Suspensionszelllinien C8166 oder Molt4.8 erfolgte mit dem Transfektionsreagenz DMRIE-C (Gibco-BRL, Life Technologies, Eggenstein). Dieses beinhaltet ein kationisches Liposomengemisch aus 1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxy-ethyl-ammonium-bromid und Cholesterin im Verhältnis 1 : 1 (M / M), welches Komplexe mit der DNA bilden kann. Diese DNA/Lipid-Komplexe fusionieren mit der Zellmembran der Rezipientenzelle und setzen ihren Inhalt durch Endocytose ins Zellinnere frei.

In einer 6-Loch-Platte (Nunc, Wiesbaden) wurden 6 µl DMRIE-C in 500 µl serum- und antibiotikafreiem RPMI-Medium verdünnt. Parallel dazu wurden 10 µg der jeweiligen Volllängenplasmid-DNA in 500 µl serum- und antibiotikafreiem RPMI-Medium in einem extra Reaktionsgefäß resuspendiert. Nach dem Mischen beider Lösungen in der 6-Loch-Platte folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei RTemp. Daraufhin wurden 2×10^6 mit serumfreiem Medium gewaschene Zellen zugegeben und für 4 Stunden bei 37° C inkubiert, was zu einer effizienteren Aufnahme der DNA-Liposomen-Komplexe durch die Zellen führt. Anschließend wurde 2 ml Medium zugegeben, das die 1,5-fache Konzentration an Serum enthielt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.3 Methoden der Virologie

2.3.1 Virusnachweisverfahren

2.3.1.1 Immunperoxidase-Test (IPA)

Um die Expression von viralen Proteinen in infizierten oder transfizierten Zellen nachzuweisen, wurde ein Immunperoxidase-Test durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden am Vortag in eine 96- oder 48-Loch-Platte überführt. Adhärenz wachsende Zellen hafteten bis zum darauffolgenden Tag an der Kunststoffoberfläche der Platte. Suspensionszellen mußten auf eine mit Poly-L-Lysin (50 µg / ml, 1 h bei 37° C) beschichtete Platte überführt werden und hafteten an der Unterlage nach einer Inkubation ÜN bei 37° C. Fixierung und Aufschluß der Zellen erfolgte nach einer 45 minütigen Behandlung mit Methanol bei -20° C. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Blockierungspuffer (2 % Milchpulver in PBS) für eine Stunde bei RTemp blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem spezifischen Antiserum in einer zuvor getesteten Verdünnung in Blockierungspuffer für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Auf 2 weitere Waschschrte mit PBS folgte die 1-stündige Inkubation bei 37° C des mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten-Sekundärantikörpers, der gegen den Fc-Teil der spezifischen Immunglobuline in den zuvor verwendeten Antisera gerichtet war, eingesetzt in der jeweils ausgetesteten optimalen Verdünnung in Blockierungspuffer. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit der Substratlösung (4 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol in 1 ml Dimethylformamid gelöst, 19 ml 20 mM NaOAc-Puffer, pH 5,0 und 20 µl H₂O₂; 45µm-filtriert) kommt es zur enzymatischen Umsetzung des Chromogens und damit zur Färbung der transfizierten oder infizierten Zellen. Diese konnten lichtmikroskopisch anhand ihrer Rotfärbung von den nicht-transfizierten oder -infizierten Zellen unterschieden werden.

Poly-L-Lysin, 3-Amino-9-ethylcarbazol, Dimethylformamid, H₂O₂ sowie der mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper (α -human-IgG A-6029 [eingesetzt 1 : 1000]) wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. Das α -SIVagm-Serum (Nem170), das α -HIV-2-Serum (A675) und das α -HIV-1-Serum (456) wurden von Dr. S. Norley (Paul-Ehrlich-Institut) zur Verfügung gestellt. Das α -SIVagm-Serum (Nem170) stammt aus einem mit SIVagm3 infizierten Schweinsaffen. Das α -HIV-2 (A675) reagiert kreuz mit den Antigenen des SIVagm3mc und des SIVsmmPBj1.9. Der α -human-IgG-Sekundärantikörper reagiert mit den oben genannten Seren.

2.3.1.2 Test auf Aktivität viraler Reverser Transkriptase

Als Marker für die Präsenz von Viruspartikeln diente der Nachweis von Reverser Transkriptase-Aktivität (RT) im Kulturmedium infizierter Zellen. Er wurde entweder mit dem Lenti-RT Activity Assay (Cavidi Tech, Uppsala, Schweden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 10 µl Zellkulturüberstand eingesetzt. Oder der Nachweis erfolgte mit Hilfe des nicht-radioaktiven Reverse-Transkriptase-Testkits der Firma Boehringer (Mannheim). Dazu wurde je 1 ml filtrierter (0,45 µm) Zellkulturüberstand in 1,5 ml Sarstedtreaktionsgefäßen mit Sicherheitsverschluß (Sarstedt, Nümbrecht) bei 13000 rpm für 90 min bei 4° C zentrifugiert (Mikrozentrifuge, Eppendorf, Köln). Das Medium wurde abgesaugt und die sedimentierten freien Viruspartikel wurden anschließend in 20 µl von der Firma beigefügten Lysepuffer aufgenommen und für 30 Minuten bei RTemp lysiert. Die Inkubationsdauer für die Reverse Transkription wurde auf eine Stunde standardisiert, die übrigen Reaktionsschritte wurden gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt. Die umgesetzte Substratmenge wurde photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Photometers (SLT Labinstruments, Crailsheim) bestimmt. Nachweise mit dem Lenti-RT Activity Assay wurden von R. Wenig oder S. Raupp durchgeführt.

2.3.1.3 Test auf Virusantigen (p27)

Bei diesem sensitiven, quantifizierbaren Virusnachweis, entwickelt von Dr. S. Norley am Paul-Ehrlich-Institut, handelt es sich um einen sog. „Sandwich-ELISA“, der auf der hochaffinen Bindung eines monoklonalen Antikörpers (AG3.0) gerichtet gegen das virale p27-Kapsidprotein beruht. Dieser Antikörper ist sowohl gegen SIVagm, als auch SIVmac, HIV-1 und HIV-2 gerichtet und wurde freundlicherweise von Dr. S. Norley zur Verfügung gestellt.

Die virusenthaltenden Überstände wurden zunächst inaktiviert mit entweder 0,1 % NP40 oder 0,2 % Tween 20 und über 8 Stufen zu je 1 : 3 verdünnt. Die Verdünnungen wurden in 96-Loch-Rundbodenplatten durchgeführt, wobei pro Loch 140 µl Verdünnungspuffer (2 % Milchpulver, 0,05 % Tween 20 in PBS) vorgelegt wurde und jeweils 70 µl des inaktivierten Virusüberstandes übertragen wurde.

Zur Vorbereitung der Test-Platten wurden zunächst spezielle 96-Loch-Flachbodenplatten („Probind“-Platten, Falcon / Becton Dickinson, Heidelberg) mit dem monoklonalen Antikörper (Verdünnung 1 : 300 in Aqua bidest, 50 µl / Loch) beschichtet und durch Trocknung an die Platte geheftet. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Platten für 30 min bei 37° C mit 2 % Milchpulver (Marvel Fat Free Milk Powder) in PBS (100 µl / Loch) inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal gewaschen (Waschpuffer: 0,05 % Tween 20 in PBS; je 250 µl / Loch).

Daraufhin erfolgte der Transfer der vorverdünnten, virushaltigen Proben in Duplikaten zu je 50 µl auf die Test-Platten. In der 60-minütigen Inkubationszeit bei 37° C wurde im Überstand befindliches p27-Virusantigen spezifisch an die Platte gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden spezifische Antiseren (Nem170 gerichtet gegen SIVagm oder A675 gerichtet gegen SIVagm, SIVsmm und HIV-2; in der Verdünnung 1 : 1000), 1 : 1 gemischt mit dem Plasma eines SIVmac-infizierten Rhesusaffen (polyklonaler Antikörper Rh 41, 1 : 3000) in einer einstündigen Inkubation bei 37° C eingesetzt (je 50 µl / Loch). Mit dem Rh 41-Serum wurde als Positivkontrolle verdünnter SIVmac Virusüberstand nachgewiesen. Die Platten wurden dreimal gewaschen, bevor ein gegen humanes IgG gerichtetes Peroxidase-Konjugat (α -human-IgG A-6029, Sigma, Deisenhofen; in der Verdünnung 1 : 1000; 50 µl / Loch) hinzugegeben und für 60 min bei 37° C inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde je 50 µl / Loch Substratlösung hinzupipettiert (1 mg / ml O-phenylendiamin (OPD), 1,5 µl / ml H₂O₂ in PBS pH 6; Sigma, Deisenhofen). Das Abstoppen der katalytischen Farbreaktion erfolgte mit 5 N H₂SO₄ (Merck) (je 20 µl / Loch). Die Auswertung erfolgte photometrisch im ELISA Reader (Spektra, SLT) bei 492 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Aus den negativen Kontrollwerten wurde ein Grenzwert errechnet (Mittelwert plus dreifache Standardabweichung), oberhalb dessen die Proben als positiv (d.h. Virusinfiziert) angesehen werden.

2.3.2 Infektionen

2.3.2.1 Infektionen von C8166-Zellen

Die Transfektionen von C8166-Zellen mit proviraler Vollängen-DNA (siehe Kap. 2.2.4) führte nach 48 Stunden zur Sezernierung von Viruspartikeln, die mittels IPA (siehe Kap. 2.3.1.1) nachgewiesen wurden. Daraufhin konnte der Zellkulturüberstand zur Infektion von T-Lymphozytenzelllinien verwendet werden. Hierzu wurden 5 - 10 ml virushaltiger, filtrierter (0,45 µm Filter) Überstand mit 5×10^6 - 1×10^7 Zellen (Molt4.8 oder C8166) in eine mittlere Zellkulturflasche mit 15 ml frischem Kulturmedium versetzt. Zum Test auf Reverse-Transkriptase-Aktivität (siehe Kap. 2.3.1.2) wurde einmal wöchentlich 1 ml Überstand entnommen. Virusüberstände, die im RT-Test hohe RT-Werte erzielten, wurden filtriert und in 1 ml Aliquots bei -80° C eingefroren. Diese Aliquots werden als Virusstock bezeichnet. Bei jeweils einem Aliquot, welches als repräsentativ für alle Aliquots eines Virusstocks gilt, wurde der Virustiter durch Titration (siehe Kap. 2.3.3) bestimmt.

2.3.2.2 Infektionen von PBMC

Gepoolte PBMC aus SIV-seronegativen Affen wurden entweder direkt nach der Präparation infiziert oder für zwei Tage mit 10 mg / ml PHA und 200 Einheiten IL2 stimuliert und dann infiziert. Jeweils 5×10^6 oder 1×10^7 Zellen wurden mit einer moi von 0,1 infiziert, ÜN in einer 6-Loch-Platte mit 2 ml Medium inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Danach wurden die nicht-stimulierten Zellen in 10 ml Medium in einer kleinen Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) aufgenommen. Die stimulierten Zellen wurden dagegen in IL2-haltigem Medium kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden jeweils 3 ml filtrierter ($0,45 \mu\text{m}$ Filter) Überstand entnommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Der abgenommene Überstand wurde durch frisches Medium ersetzt. Die gesammelten Überstände wurden am Ende des Infektionsversuchs auf Replikation getestet. Entweder wurde auf RT-Aktivität getestet (siehe Kap. 2.3.1.2), d.h. alle Viruspartikel im Überstand wurden nachgewiesen, und/oder es wurde eine Titration auf C8166-Zellen (siehe Kap. 2.3.3) durchgeführt, um nur replikationsfähige Viruspartikel nachzuweisen und defekte Partikel auszuschließen.

2.3.2.3 Infektionen von GHOST-Zellen

GHOST-Zellen wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen in 48-Loch-Platten (Nunc, Wiesbaden) in Medium ohne Antibiotika ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit einer moi von 0,1, 1, oder 10 in einem Volumen von 200 μl . Nach 12 Stunden erfolgte ein Waschen und Mediumwechsel (500 μl) der Zellen. Nach 3 - 4 Tagen wurden die Überstände abgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren zum Test auf RT-Aktivität und/oder zum Nachweis des p27-Antigens. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Induktion der Synthese des GFP-Proteins analysiert und photographiert. Entweder wurden danach die Zellen mit Methanol fixiert und es wurde ein IPA durchgeführt. Oder die Zellen wurden mit einer 1 mM EDTA/PBS-Lösung abgelöst, einmal mit PBS gewaschen, in 200 μl FACS-Fixierer aufgenommen (siehe Kap. 2.4.2) und im FACS auf Expression des GFP-Proteins analysiert.

2.3.2.4 Hemmung des Viruseintritts

Um den Korezeptor CXCR4 zu blockieren, wurden C8166 T-Zellen oder PBMC von Schweinsaffen mit dem natürlichen Liganden des Chemokinrezeptors SDF-1 α (R&D Systems, Wiesbaden) zwei Stunden vor Infektion inkubiert. Die eingesetzte Inhibitor-Konzentration von SDF-1 α betrug zwischen 0,5 und 6 μg / ml SDF-1 α und dieselbe Konzentration wurde während der gesamten Kulturdauer erhalten. Die Zellen wurden in 96-well Platten mit einer Zelldichte von 2×10^5 C8166 T-Zellen bzw 3×10^5 PBMC pro Loch kultiviert und mit einer moi von 0,1 oder 1 infiziert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden

jeweils 100 µl Überstand eingefroren zum Test auf RT-Aktivität. Einige Replikationsstudien wurden von S. Raupp durchgeführt.

2.3.3 Bestimmung des Virustiter

Der Virustiter wird durch Titration des Virusüberstands auf suszeptiblen Zielzellen, hier C8166-Zellen, durchgeführt und dient zur Bestimmung der Anzahl infektiöser Viruspartikel und zum Ausschluß der Anzahl von defekten Viruspartikeln, die in Tests zur Bestimmung des RT-Wertes oder zum quantitativen Nachweis des p27-Antigens mit eingeschlossen sind. Daher sind bei Infektionsstudien Titer von Virusstocks, die mit der Methode der Virustitration zur Bestimmung des Virustiters gemessen wurden, vergleichbar.

Der virushaltige Überstand wurde in elf aufeinanderfolgenden Verdünnungsschritten (erste Verdünnung 1:10, danach jeweils 1:3) in acht Replikaten mit je 2000 C8166-Zellen für 14 Tage in einer 96-Loch-Rundbodenplatte kultiviert (50 µl Virusverdünnung mit 150 µl Zellen enthaltendes Medium). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 50 µl auf eine Poly-L-Lysin beschichtete 96-Loch-Flachbodenplatte überführt und ein IPA durchgeführt. Anhand der Zahl der Löcher, die Virus-infizierte Zellen enthielten, erfolgte mittels einer nach Spearman-Kärber modifizierten Methode die Berechnung der Titer (TCID₅₀ / ml) (Kärber, 1931; Spearman, 1908) TCID₅₀ („Tissue Culture Infection Dosis“) bedeutet dabei die Dosis, die nötig ist, um 50 % der Zellen zu infizieren.

2.3.4 Bestimmung virologischer Parameter *in-vivo* nach Infektion von Schweinsaffen

2.3.4.1 Infektion von Schweinsaffen

Seronegative Schweinsaffen wurden intravenös infiziert: Virus mit einem Titer von 1×10^6 TCID₅₀ in einem Volumen von 2 ml (verdünnt mit PBS). Im wöchentlichen Abstand bis Woche 4, dann Woche 6 und 8 nach Infektion und danach monatlich wurden Blutentnahmen vorgenommen.

2.3.4.2 Virusreisolierung

Die Virusreisolierung aus PBMC stellt ein sehr sensitives Nachweisverfahren für produktiv infizierte Zellen dar. Außerdem können dann die Eigenschaften des Virusschwarms, die sich nach *in-vivo* Propagierung ergeben, analysiert werden. Bei jeder Blutentnahme wurden $1,5 \times 10^6$ PBMC mit 5×10^6 C8166-Zellen kokultiviert in RPMI-Medium mit 10 % FKS. Die Zellen wurden bis 2 Monate in Kultur gehalten, wobei ein wöchentlicher Mediumwechsel

erfolgte, und sie wurden regelmäßig im RT-Test oder im IPA auf Virusreplikation getestet. War die Reisolierung erfolgreich, wurde der filtrierte (0,45 µm) virushaltige Überstand in Aliquots bei -80° C eingefroren für spätere Untersuchungen.

Zur direkten Reisolierung aus PBMC wurden die Zellen zum Teil mittels MACS-Separierung CD8+-depletiert. Sie wurden entweder mit 10 µg / ml PHA / 200 U / ml IL2 48 Stunden oder mit 25 ng / ml TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) / 0,5 µM Ionomycin 1,5 Stunden stimuliert und teils mit nicht-infizierten PBMC kokultiviert.

2.3.4.3 Messung der zellassozierten Virusbelastung

Die Bestimmung der Anzahl von aus Primaten isolierten, infizierten PBMC, die noch in der Lage sind, Virus zu produzieren, erfolgte in einer gemeinsamen Kokultivierung mit permissiven C8166-Zellen. Als Ausgangskonzentration lagen 5×10^6 PBMC in 500 µl Medium vor. Diese wurden zunächst in Micronics-Röhrchen (Invitrogen / Life Technologies, Karlsruhe) in 8 Stufen jeweils im Verhältnis 1 : 5 verdünnt. In einer 24-Loch Platte wurden 1×10^6 C8166-Zellen in 1 ml Medium vorgelegt und jeweils 100 µl der vorverdünnten PBMC in drei Replikaten hinzupipettiert, so daß 8 Verdünnungsstufen ($1 \times 10^6 - 1,28 \times 10^1$ PBMC / Loch) vorlagen. Nach zweiwöchiger Kultivierung wurde eine SIV-Infektion der Indikatorzellen durch p27-Virusantigen-Test oder mittels IPA nachgewiesen, wobei jeweils in Duplikaten 100 µl der Zellsuspension pro Loch entnommen wurden. Aus der Anzahl der Kavitäten, die positive Zellen oder Virusantigen beinhalten, wurde die zellassozierte Virusbelastung als infizierte Zellen pro Million PBMC mit einem Poisson-Verteilungsmodell berechnet.

2.3.4.4 Messung der Provirusbelastung

Um die provirale Virusbelastung zu ermitteln, wurde eine quantitative Taqman-PCR, entwickelt von S. Holzammer am Paul-Ehrlich-Institut, durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine sog. „Real-time PCR“, d.h. die akkumulierenden PCR-Produkte werden während des Laufs der PCR detektiert. Möglich wird dies durch den Einsatz einer fluoreszenzmarkierten Sonde in Kombination mit der 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase. Am 5'-Ende der Sonde befindet sich der Reporterfarbstoff Fluoreszein (6-Fam) und am 3'-Ende der als Quencher fungierende Fluoreszenzfarbstoff Tamra, ein Rhodaminabkömmling. Ist die Sonde intakt, d.h. liegen diese beiden in direkter Nachbarschaft zueinander, emittiert der Reporter keine Fluoreszenz, d.h. es findet ein Fluoreszenz-Resonanz-Emissions-Transfer (FRET) statt. Während der PCR-Reaktion kommt es zur Bindung der Primer bzw zur Extension, wobei die Sonde beim Auftreffen der Taq-Polymerase durch deren Exonuklease-Aktivität hydrolysiert wird. Der FRET-Effekt wird aufgehoben und FAM emittiert Fluoreszenz. Dabei ist die Emission proportional zur Anzahl der Amplikons.

Zur Durchführung wurde der ABI PRISM 7700 Sequenz-Detektor (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve aus SIVagm3mc-Plasmid-DNA eingesetzt. Die Konzentration des Plasmids wurde photometrisch bestimmt und anschließend durch Verdünnung eine Standardreihe hergestellt ($10^7 - 10^1$ Kopien pro ml).

Aus 5×10^5 PBMC wurde wie im Kap.2.1.6 beschrieben die DNA präpariert und in 50 μ l Aqua bidest eluiert. Eingesetzt wurden pro Reaktion jeweils 10 μ l, also DNA aus 1×10^5 PBMC. Für die PCR-Reaktion wurden 40 μ l des folgenden Reaktionsmixes (alle Reagenzien, Primer und Sonde: Applied Biosystems / Weiterstadt) zugegeben:

10 x PCR-Puffer II	1 x
Primer AVFOR1	1,5 μ M
Primer AVREV1	1,5 μ M
Sonde AVSo1	1 μ M
dNTP Mix (10 mM)	jeweils 400 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM
GoldTaq-Polymerase (5 U / μ l)	0,025 U / μ l
Rox-Referenzfarbstoff (100 μ M)	0,5 μ M
Aqua bidest	ad 40 μ l

Über 45 Zyklen wurde die PCR durchgeführt. Der erste Denaturierungsschritt erfolgte bei 95° C für 10 min, die weiteren Denaturierungsschritte nur für 15 sec. Annealing und Extension liefen bei 60° C für 1 min.

Während der PCR-Reaktion kommt es durch einen Laser zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs. Die Emission zwischen 500 nm und 600 nm wird alle sieben Sekunden gemessen. das normalisierte Reportersignal (R_n) repräsentiert dabei das Fluoreszenzsignal des Reporters geteilt durch das Fluoreszenzsignal des passiven Referenzfarbstoffs. Der passive Referenzfarbstoff (Rox) ist ein Farbstoff, der die PCR-Reaktion nicht beeinflusst, sondern dient als interne Referenz, anhand derer das Signal des Reporterfarbstoffs normalisiert werden kann. Diese Normalisierung ist wichtig, um die Loch-zu-Loch Fluoreszenz-Fluktuationen zu korrigieren. R_n steigt proportional zur Anzahl der Amplikons während der PCR-Reaktion an, bis die Reaktion ein Plateau erreicht.

ΔR_n repräsentiert das normalisierte Reportersignal minus des Basissignals, welches in den ersten 15 Zyklen der PCR ermittelt wird. Wie R_n steigt auch ΔR_n während der PCR-Reaktion bis zum Erreichen des Plateaus an.

Die initiale Kopienzahl des Templates wird durch Analyse der sich aufgrund der stattfindenden Amplifikation von Zyklus zu Zyklus verändernden Fluoreszenzsignale detektiert. Je weniger Zyklen dabei notwendig sind, um ein Fluoreszenzsignal zu generieren, desto größer ist die initiale Kopienzahl. Der Threshold Cycle (C_t) gibt den PCR-Zyklus an, bei dem zum ersten Mal ein über der Baseline liegendes Fluoreszenzsignal gemessen wurde. Die Sequence Detection Software (Applied Biosystems, Weiterstadt) generiert eine Standardkurve anhand der C_t versus der Start-Kopienzahlen aller Standards und bestimmt anhand dessen die Start-Kopienzahlen der unbekanntenen Proben durch Interpolieren. In einem PCR-System mit 100 %iger Effizienz steigt der C_t -Wert mit Verdopplung des Templates um eins an.

2.3.4.5 Messung der Plasmavirämie

Um die periphere Plasmaviruslast zu messen, wurde eine quantitative TaqMan-RT-PCR durchgeführt. Diese wurde von Silke Holzammer, Paul-Ehrlich-Institut, etabliert und vorgenommen. Zum Prinzip der TaqMan-PCR siehe Kap 2.3.4.4. Zur Durchführung der RT-PCR wurde der ABI PRISM 7700 Sequenz-Detektor (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet.

Zur Herstellung der RNA-Standards wurde vorab SIVagm in großem Maßstab produziert. Für einen Zeitraum von drei Wochen wurden 5×10^6 C8166-Zellen mit jeweils 1000 μ l Zellkulturüberstand des Klons SIVagm3mc in einer 50-ml-Zellkulturflasche kokultiviert. Die Infektion der C8166-Zellen konnte nach dieser Zeit mittels IPA demonstriert werden. Den infizierten Zellen wurden dann weitere 5×10^8 C8166-Zellen zugeführt und es erfolgte eine weitere Inkubation von drei Wochen. Im Abstand von drei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden gesplittet, bis sie insgesamt in acht 750 cm^2 Zellkulturflaschen gehalten wurden. Die Überstände wurden alle zwei Tage gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren. Etwa 3 l Zellkulturüberstand wurden, um Zelltrümmer abzutrennen, in einer Ultrazentrifuge (Beckmann, Rotor 19) bei 4°C für 30 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Aus diesen Überständen wurden durch eine weitere Ultrazentrifugation für 2,5 h bei 18000 rpm und 4°C (Beckmann, Rotor 19) Viruspartikel pelletiert. Das Viruspellet wurde über Nacht auf Eis gestellt und am nächsten Tag gesammelt. Um noch vorhandene Zellproteinverunreinigungen zu entfernen, wurde das resuspendierte Viruspellet auf ein Sucrosekissen, dessen Dichte mit 1,13 g / ml etwas unter der Viruspartikeldichte liegt, geschichtet. Erneut wurde für 1 h zentrifugiert (100000 g in Beckmann Rotor SW28 bei 4°C). Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Zur Isolierung retroviraler RNA wurde der „High Pure Viral RNA Kit“ (Roche, Mannheim) laut Protokoll des Herstellers verwendet. Es wurden 200 μ l in PBS resuspendiertes Viruspellet (bzw 200 μ l Heparinplasma zur Untersuchung der Proben) eingesetzt und mit 50 μ l RNase freiem Wasser eluiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration im Photometer bei

Wellenlänge 280 nm bestimmt und aus der Ratio zwischen A_{260}/A_{280} die Reinheit ermittelt. Die Titration zur Herstellung der RNA-Standardreihe erfolgte in RNase-freiem Wasser von 10^2 - 10^8 RNA-Kopien pro Milliliter. Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

Durchgeführt wurde eine Ein-Schritt-RT-PCR unter zu Hilfenahme eines OneStep-RT-PCR Kit (Quiagen, Hilden). Der dabei eingesetzte Enzymmix enthält zwei verschiedene rekombinante Reverse Transkriptasen, eine Moloney Murine Leukemia Virus RT, die besonders effizient bei der Umschreibung großer Mengen RNA arbeitet und eine Avian Myeloblastosis Virus RT, die optimiert wurde für sehr kleine Mengen RNA. Bei der für die PCR-Reaktion notwendigen HotStarTaq DNA Polymerase handelt es sich um ein Enzym, welches bei Temperaturen unter 95°C inaktiv voliegt und erst nach Erhitzen mit der Amplifikation beginnt.

Für die RT-PCR-Reaktion wurden pro Reaktionsgefäß $10\ \mu\text{l}$ RNA-Probe und $40\ \mu\text{l}$ des folgenden Reaktionsmix zugegeben:

5 x Quiagen OneStep RT-PCR Puffer	1 x
Primer AVFOR1	$1,5\ \mu\text{M}$
Primer AVREV1	$1,5\ \mu\text{M}$
Sonde AVSo1	$1\ \mu\text{M}$
dNTP Mix (10 mM)	jeweils $400\ \mu\text{M}$
MgCl ₂	3 mM
rRNasin	20 U
Quiagen Enzymmix	$2\ \mu\text{l}$
Rox Farbstoff	$0,5\ \mu\text{M}$
RNase freies Wasser	ad $40\ \mu\text{l}$

Die RT-Reaktion wurde für 30 min bei 50°C durchgeführt. Anschließend erfolgten 45 Zyklen für die PCR-Reaktion. der erste Denaturierungsschritt dauerte 15 min bei 95°C , die folgenden Denaturierungsschritte dauerten nur 15 sec. Annealing und Extension liefen bei 60°C für 2 min.

2.4 Methoden der Immunologie

2.4.1 Magnetische Zell-Sortierung (MACS, „Magnetic Cell Sorting“)

Zur Depletion von CD4⁺ oder CD8⁺-Zellen aus der Gesamtpopulation von PBMC wurde das MACS-Zellisolationssystem der Fa. Miltenyi Biotec (Gergisch Gladbach) verwendet. Das Prinzip beruht auf der Anbindung CD4 bzw CD8-positiver Zellen an spezifische monoklonale Antikörper und anschließender Bindung eines mit Metallkügelchen gekoppelten Zweitantikörpers („Microbeads“). Die auf diese Weise markierten Zellen werden beim Durchfließen einer Säule in einem Magnetfeld zurückgehalten.

Bis zu 5×10^6 PBMC in 300 μ l MACS-Puffer wurden zuerst mit 30 μ l α -CD8-Antikörper (Leu-2a; Becton Dickinson, Heidelberg), der ungekoppelt oder mit FITC-gekoppelt war, für 15 min bei 4°C geschwenkt. Danach wurden die Zellen zweimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und mit 30 μ l Sekundärantikörper für 15 min bei 4° C inkubiert in gesamt 300 μ l Volumen (auf dem Schüttler). Der Sekundärantikörper bestand entweder aus α -Maus-IgG₁ gekoppelten MicroBeads oder aus α -FITC-MicroBeads (beide von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Nach weiteren 2 Waschschritten mit 3 ml MACS-Puffer wurden die Zellen auf eine mit 500 μ l MACS-Puffer vorequilibrierte MiniMACS-Säule gegeben und dreimal mit je 500 μ l gewaschen. Das Eluat enthielt die gewünschte CD8⁺-depletierte PBMC-Subpopulation.

Zur Depletion CD4-positiver Zellen wurden bis zu 1×10^8 PBMC in 500 μ l MACS-Puffer mit 2 μ l α -CD4-Antikörper (SK3; Becton Dickinson, Heidelberg) pro 10^6 Zellen inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden entweder 20 μ l α -Maus-IgG₁-MicroBeads pro 10^7 Zellen oder 10 μ l α -FITC-MicroBeads pro 10^7 Zellen verwendet und wie oben beschrieben verfahren. Die gebundenen PBMC wurden aus der Säule gelöst, indem die Säule aus dem magnetischen Bereich genommen wurde und die Zellen mit 1 ml Puffer aus der Säule gespült wurden.

2.4.2 Analytische Durchflußzytometrie (FACS, „Fluorescence Activated Cell Sorting“)

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellpopulationen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Zellen. Es wurden entweder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zellen oder GHOST-Zellen, die intrazellulär GFP exprimierten, im FACS-Gerät (FACStar plus, Becton Dickinson, Heidelberg [BD]) gemessen. Mit Hilfe eines Argon-Laser wurden sie bei 488 nm angeregt und emittierten Signale bei unterschiedlichen Wellenlängen je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff, die eine numerische Erfassung ermöglichten. Gleichzeitig wurde im Streulicht die Größe und Granularität der Zellen dargestellt.

Die Anfärbung der Zellen wurde in Micronic-Reaktionsgefäßen der Fa Invitrogen / Life Technologies (Karlsruhe) durchgeführt. Je 2×10^5 Zellen wurden in 100 µl FACS-Puffer (0,2 % BSA, 0,1 % Natriumazid in PBS) resuspendiert und mit 10 µl eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpers inkubiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4° C im Dunklen, wurden die Proben einmal mit 500 µl Wasch-Puffer (FACS-Puffer mit 10 % FKS) gewaschen (1200 rpm, 10 min, 4° C, Minifuge T, Heraeus, Hanau; Überstand absaugen) und anschließend durch Zugabe von 200 µl 1%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Bei einer Anfärbung mit nicht-fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde nach Inkubation mit dem spezifischen Antikörper zweimal mit Waschpuffer gewaschen und danach mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper 20 min bei 4° C inkubiert. Danach wurde gewaschen und fixiert wie oben beschrieben.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Antikörper	Klon	Firma
α-CD4 (IgG1)	SK3	BectonDickinson
α-CD4 (IgG2a)	M-T477	Pharmingen
α-CD8 (IgG1)	SK1	BectonDickinson
α-CXCR4 (IgG2a)	12G5	Pharmingen
α-CCR5 (IgG2b)	45549, FAB183F	R&D-Systems
α-CD69 (IgG1)	L78	BectonDickinson
α-CD25 (IgG1)	2A3	BectonDickinson
Isotyp: IgG1	X40	BectonDickinson
Isotyp: IgG2b	20116	R&D-Systems
Isotyp: IgG2a	G-155178	Pharmingen
Isotyp: IgG2a	X39	BectonDickinson

2.4.3 Bestimmung immunologischer Parameter *in-vivo* nach Infektion von Schweinsaffen

2.4.3.1 Bestimmung des Differentialblutbildes

Anhand 1 ml EDTA-Blutes wurde mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (Coulter counter JT, Krefeld) das Differentialblutbild bestimmt. Daraus konnte der Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten / µl Blut ermittelt werden. Anhand des in der FACS-Analyse (siehe Kap. 2.4.2) ermittelten prozentualen Anteils der CD4+- bzw CD8+-T-Lymphozyten konnten daraufhin die Absolutwerte der jeweiligen Subpopulation ermittelt werden.

2.4.3.2 Bestimmung des Antikörpertiters mittels ELISA

Dieser Test dient der qualitativen und quantitativen Bestimmung spezifischer Antikörper gegen retrovirale Proteine im Serum. Die Methode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung, die mittels enzymgekoppeltem Sekundär-Antikörper, der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers richtet, nachgewiesen wird. Das Antigen, retrovirales Protein, ist an einen Träger adsorbiert. In diesem Test wurden 96-Loch-Platten (Falcon, Micro test III Probind Plate, Becton Dickinson, Heidelberg) mit 50 µl des Antigens (Gesamtvirusantigen aus lysiertem SIVagm3mc: 0,56 µg Protein / Loch) beschichtet und diese durch Trocknung über Nacht bei 37° C im Trockenschrank an den Boden der Platte geheftet. Die dafür optimale Menge wurde vorab mittels „Checkerboard“, d.h. Titration des Antigens im ELISA, ermittelt. Nach Waschen der beschichteten Platten mit Waschpuffer (0,05 % Tween 20 und 0,01 % NaAzid in PBS) wurden unspezifische Bindungsstellen mit 50 µl / Loch 2 % Milchpulver in PBS abgesättigt bei einer 60 minütigen Inkubation bei 37° C im Brutschrank. Zur Titration der Hitze-inaktivierten Seren wurde eine Ausgangsverdünnung von 1 : 50 in Inkubationspuffer (2 % Milchpulver in PBS mit 0,05 % Tween 20) hergestellt und in Zweierstufen bis 1 : 102400 ausverdünnt. Die titrierten Seren wurden in Duplikaten á 50 µl für 60 min auf den beschichteten Platten inkubiert und danach dreimal gewaschen. Als Zweitantikörper wurde 50 µl / Loch eines anti-human-IgG-Peroxidase-Konjugates (Sigma, Deisenhofen) in der Verdünnung 1 : 1000 eingesetzt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Substratlösung (5 ml PBS, pH 6,0; 5 mg OPD, Sigma, 7,5 µl H₂O₂) in einem Volumen von 50 µl pro Loch zugegeben. Die Farbreaktion wurde mit 25 µl 2.5 N H₂SO₄ abgestoppt. Die Intensität der Farbreaktion, die sich proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper verhält, wurde photometrisch bei 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im ELISA Reader (Spektra, SLT) bestimmt. Für den linearen Teil der Verdünnungskurven wurde mit Hilfe der linearen Regression eine Gerade ermittelt. Der Titer des entsprechenden Serums (entsprechend der reziproken Serumverdünnung) errechnet sich aus dem Schnittpunkt dieser Gerade mit dem für jeden Test festzulegenden Grenzwert (Cut off).

2.4.3.3 Bestimmung von HIV-spezifischen Antikörpern

Zur Bestimmung von HIV-spezifischen Antikörpern wurde ein Western-Blot durchgeführt nach Angaben des Herstellers (INNO-LIA; Innogenetics, Gent, Belgien).

2.4.3.4 Messung von neutralisierenden Antikörpern gegen SIV

Im Neutralisationstest werden Virus-spezifische Antikörper nachgewiesen, die in der Lage sind, die virale Infektion von Indikatorzellen zu verhindern. Zunächst wurden die Seren über 12 Verdünnungsstufen mit einer Ausgangsverdünnung von 1 : 25 und nachfolgenden 1 : 2 Schritten austitriert (RPMI-Medium mit 10 % FKS). Danach wurden die Serumverdünnungen in vier Replikaten pro Virus á 25 µl / Loch in 96-U-well-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) übertragen. Danach wurden pro vier Replikate je 2×10^3 TCID₅₀ in 25 µl / Loch des Virusstocks SIVagm3mc bzw des Virusstocks SIVagm3-X4 zugegeben. Die Mischung aus Seren und Viren inkubierte für 60 min bei 37° C im Brutschrank. Danach wurden die Indikatorzellen C8166 zugegeben (2×10^3 Zellen / Loch in 150 µl) und für 1 Woche bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Als Positivkontrolle wurden ebenfalls 2×10^3 TCID₅₀ des jeweiligen Virusstocks zu den Zellen pipettiert, allerdings ohne Zugabe von Serum. Als Negativkontrolle wurde weder Serum, noch Virus zugegeben. Nach einer Woche wurden die Neutralisations-Platten inaktiviert mit 2 % Tween 20 je 20 µl / Loch und nach 15 min Inkubation Proben für den Virusantigen (p27)-Nachweis entnommen (je 50 µl). Anhand der Anzahl der Kavitäten pro Titrationsstufe, die eine vollständige Neutralisation zeigten, wurde mittels einer Computer-gestützten Adaptation der Spearman-Kärber-Methode (Kärber, 1931; Spearman, 1908) der ND₅₀-Wert (50 % neutralisierende Dosis) ermittelt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Veränderung der Korezeptornutzung von SIVagm3mc

3.1.1 Konstruktion des Hybridvirus SIVagm3-X4mc

Um einen Wechsel der Korezeptornutzung des SIVagm3mc von CCR5 zu CXCR4 zu induzieren, wurde ein zu HIV-1 homologer Peptidloop (V3-Loop) im *env*-Gen, der vermutlich verantwortlich ist für die Korezeptorerkenkung, ausgetauscht durch den V3-Loop des CXCR4-gängigen HIV-1-Stammes BH10. Das resultierende Virus wurde als SIVagm3-X4mc bezeichnet.

Zunächst wurde eine einzelne 3'-Genomhälfte von SIVagm3mc konstruiert, in welcher der Austausch des relevanten Genomabschnittes, des V3-Loops, vorgenommen wurde. Dieser Austausch erfolgte mit Hilfe einer gerichteten Fusions-PCR, wie im folgenden beschrieben. Als Ausgangsmaterial für das Provirus SIVagm3-X4mc wurden die Plasmide pSN3.9 und pSIVMB2 verwandt. Das Konstrukt pSN3.9 enthält die 3'-Genomhälfte von SIVagm3mc ausgehend von der Erkennungsstelle für die Endonuklease *SpeI* im *pol*-Gen bis zur Erkennungsstelle für *NarI* nach der 3'-LRT (Dittmar *et al.*, 1995). Das von Baier *et al.* (1990) klonierte Plasmid pSIVMB2 enthält das vollständige Provirus inklusive zweier LTR des SIVagm3mc. Die im folgenden genannten Nukleotidpositionen beziehen sich auf die in der EMBL/DDBJ/Genbank dargestellte Sequenz des SIVagm3mc (M30931) und des HIV-1-Isolates BH10 (M15654). Ein vorangestelltes „A“ vor einer Nukleotidposition weist darauf hin, daß diese Nukleotidposition innerhalb der SIVagm3mc-Genomsequenz zu finden ist. Ein vorangestelltes „B“ zeigt an, daß sich das Nukleotid, dessen Position angegeben wurde, innerhalb der Sequenz des HIV-1-BH10 befindet.

Zunächst wurde die Fusions-PCR durchgeführt. Dazu wurden die drei Genfragmente, die verknüpft werden sollten, in einer PCR amplifiziert, aufgereinigt und anschließend in einer Fusions-PCR miteinander verbunden. Mit Hilfe des Oligonukleotidprimerpaars A6199(+) und A6724(-) wurde ein 5'-*env*-Genfragment des SIVagm3mc in einer PCR amplifiziert, wobei das Plasmid pSIVMB2 als Matrize benutzt wurde. Der A6724(-)-Primer wurde dabei so gewählt, das er bis auf ein Nukleotid an den V3-Loop heranreicht. Mit Hilfe des (+)-Überhangprimers [A6705/B6464(+)] für das V3-Loop-Fragment, der das fehlende Nukleotid enthält, konnte der korrekte Leserahmen sichergestellt werden. Ausgehend ebenfalls von der DNA des Moleklarklons pSIVMB2 wurde das 3'-*env*-Genfragment mit Hilfe der Primer

A6828(+) und A7427(-) in einer PCR hergestellt. Dieses Fragment beinhaltet die DNA ab dem ersten Nukleotid nach dem V3-Loop. Die Länge der PCR-Produkte wurde so gewählt, dass im 5'-Fragment eine Einzel-Schnittstelle für die Endonuklease *BsrGI* und im 3'-Fragment eine Einzel-Schnittstelle für *Bst1107* enthalten war, so dass später das Fusions-Produkt über diese Erkennungsstellen in das Plasmid zurückgesetzt werden konnte. Der HIV-1-V3-Loop wurde ausgehend von dem Plasmid pTr712 als Matrize mit den Primern A6705/B6464(+) und A6847/B6572(-) amplifiziert, wobei mit Hilfe der zur 5'- und 3'-Hälfte des SIVagm3mc homologen Primerüberhänge eine Fusion möglich war. Die stille Mutation (TGCACA), die in den (+)-Primer eingebaut wurde, ermöglichte eine spätere Klonierung des Fusions-Produktes über *BsrGI*, weil dadurch die Restriktionsschnittstelle (TGTACA) für dieses Enzyms vermieden wurde. In einer Fusions-PCR konnten alle drei Amplifikate mit Hilfe der homologen Primerüberhänge in den Primern des V3-Loop-Fragmentes miteinander verknüpft werden.

Als 3'-Genomhälfte wurde das Plasmid pSN3.9 verwendet (Abb. 8). Damit der Austausch des V3-Loops vorgenommen werden konnte, musste das Plasmid in einen anderen Vektor, nämlich pGEM-7Zf(+), umkloniert werden. Dazu wurde pSN3.9 mit der Endonuklease *KpnI* (A5972, A8736) verdaut. Durch Insertion des die 3'-Hälfte des SIVagm3mc-Provirus enthaltenden Fragmentes in das mit *KpnI* geöffnete und mit Hilfe der alkalischen Phosphatase dephosphorylierte Plasmid pGEM-7Zf(+) entstand das Konstrukt pSN3.9Kpn. Im nachfolgenden Schritt wurde der V3-Loop des SIVagm3mc gegen den V3-Loop des HIV-1-BH10 ausgetauscht. Dazu wurde das Plasmid pSN3.9Kpn mit den Endonukleasen *BsrGI* und *Bst1107* (A6297, A7376) restringiert und der den V3-Loop enthaltenden Anteil entfernt. Das mit den gleichen Enzymen geschnittene chimäre Fusions-Amplifikat konnte in den so geöffneten Vektor inseriert werden. Das entstandene Plasmid, das nun einen Teil der 3'-Genomhälfte des SIVagm3mc sowie einen HIV-1-V3-Loop enthielt, erhielt die Bezeichnung pG7SN3.9V3. Um eine vollständige 3'-Genomhälfte zu erhalten, wurde das nun chimäre Plasmid wieder in den Ausgangsvektor pSN3.9 zurückgesetzt. Dazu wurde pG7SN3.9V3 mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *KpnI* geschnitten und das einen Teil der 3'-Genomhälte enthaltene Fragment in das ebenfalls mit *KpnI* geöffnete und dephosphorylierte Plasmid pSN3.9 inseriert. Dieses Konstrukt wurde pSN3.9V3 genannt und enthielt die vollständige 3'-Hälfte von SIVagm3mc inclusive des HIV-1-V3-Loops (Abb. 8).

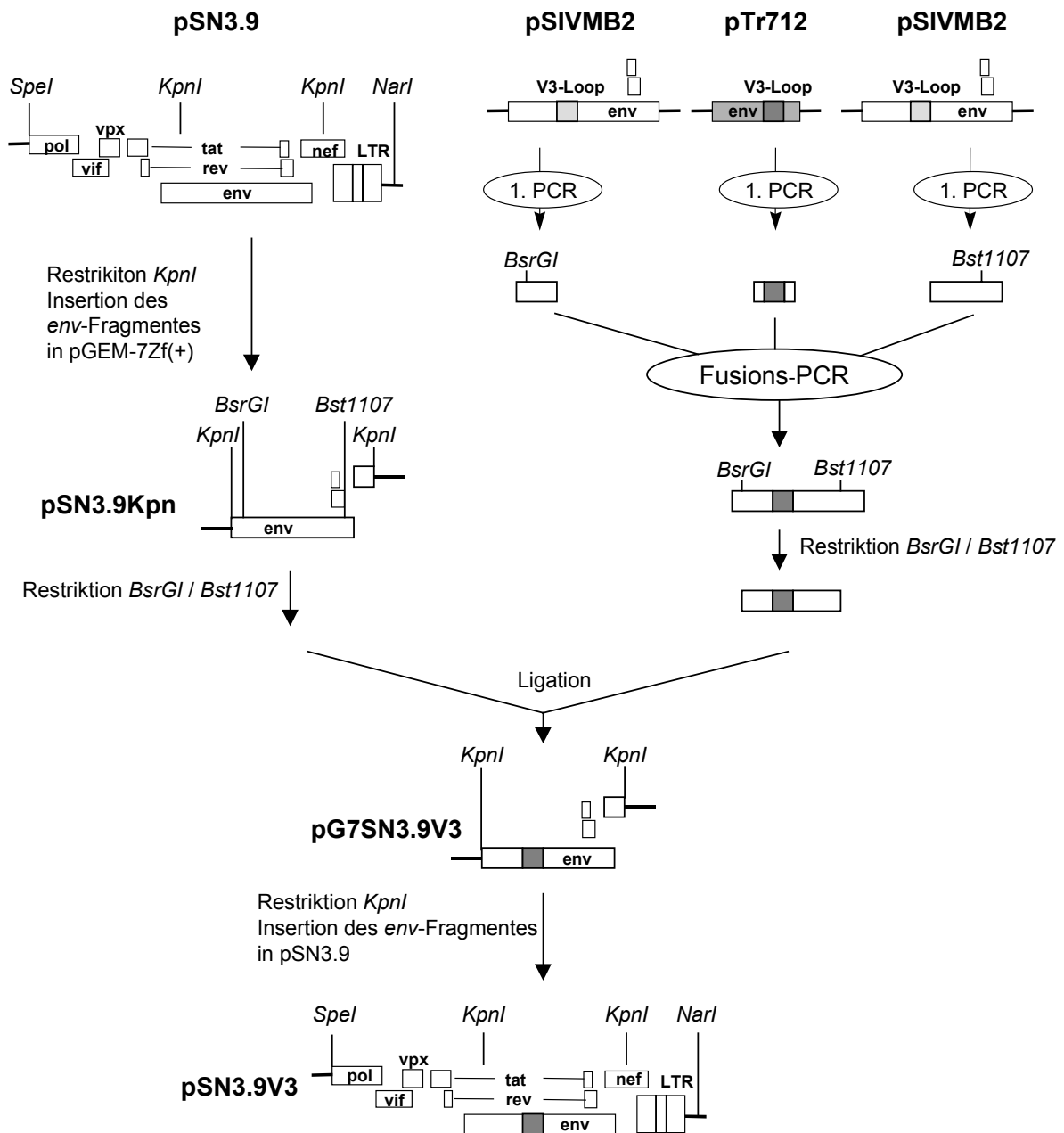


Abb. 8: Konstruktion der 3'-Hälfte von pSIVagm3-X4mc

Zur Konstruktion des Volllängenplasmides (Abb. 9) mußte zuerst in das Konstrukt pSN3.9V3 eine zusätzliche Schnittstelle mit Hilfe eines Linkers eingefügt werden. Die Oligonukleotide AatII/HindIII/AatII(+) und AatII/HindIII/AatII(-), welche die Erkennungsstelle *HindIII* und an den Enden die Nukleotide der geöffneten Schnittstelle für *AatII* enthielten, wurden hybridisiert. Das entstandene Fragment konnte danach mit dem Vektor pSN3.9V3, der mit dem Enzym *AatII* (außerhalb der proviralen Sequenz, 3' der 3'-LTR) restringiert und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert wurde, ligiert werden. Das mit der zusätzlichen

*Hind*III-Schnittstelle versehene Plasmid wurde pSN3.9V3Li genannt. Das chimäre Volllängenplasmid SIVagm3-X4mc entstand nach Ligation der Plasmide pSN3.9V3Li und pSIVMB2, die zuvor mit den Endonukleasen *Sac*I (A5382) und *Hind*III (außerhalb der proviralen Sequenz, 3' der 3'-LTR) restringiert worden waren. Die isolierte 3'-Hälfte des Plasmidklons pSN3.9V3Li wurde dabei in die *Sac*I / *Hind*III geöffnete 5'-Hälfte von pSIVMB2 inseriert.

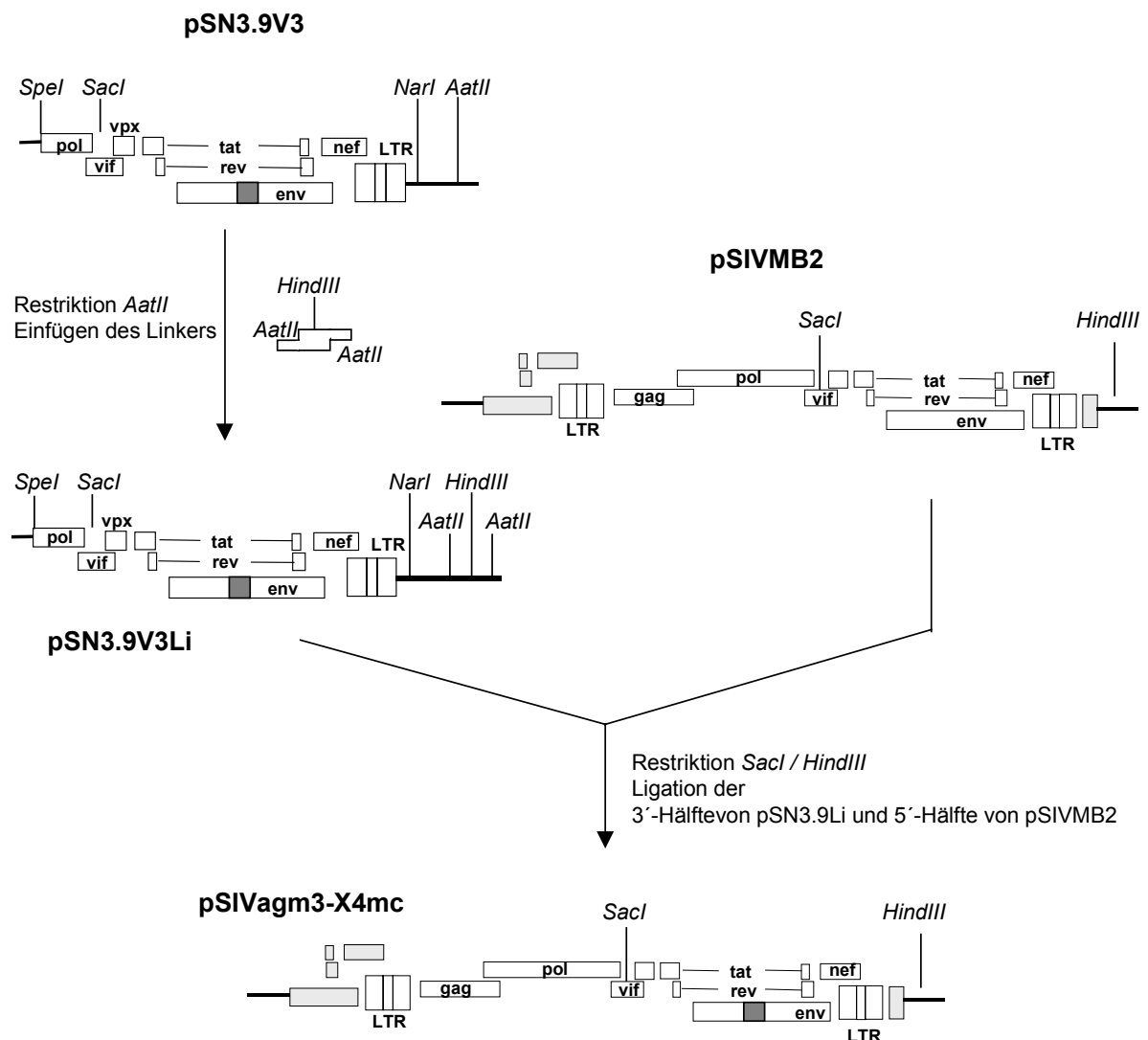


Abb. 9: Konstruktion des Volllängenplasmids pSIVagm3-X4mc

3.1.2 Darstellung der Replikationskompetenz von SIVagm3-X4mc

Zur Überprüfung des neu konstruierten Provirus pSIVagm3-X4mc (Abb. 10) wurden eine Restriktionsanalyse und eine Sequenzanalyse durchgeführt. Zuerst wurde geprüft, ob der Austausch des rekombinanten Fragmentes korrekt vollzogen wurde. Zum Vergleich wurde das Plasmid pSIVMB2 herangezogen, das sich nur bezüglich der Nukleotide im Bereich des V3-Loops unterscheidet. Im Plasmid pSIVagm3mc befindet sich neben der Erkennungsstelle für die Endonuklease *Hind*III 3' der 3'-LTR (A9444) eine zusätzliche *Hind*III Schnittstelle im V3-Loop (A6817), wohingegen im Konstrukt pSIVagm3-X4mc durch den Austausch zum HIV-1-V3-Loops diese wegfällt. Das erwartete korrekte Fragment in der Vollständigengröße von 14411 bp, das durch Restriktion des Hybrides pSIVagm3-X4mc mit *Hind*III erhalten worden war, und die Vergleichsgrößen des mit *Hind*III restringierten Konstrukts pSIVagm3mc (2627 bp und 11539 bp) konnte nach Auftrennung auf einem 1%igem Agarosegel gezeigt werden. Um sicherzustellen, daß der Leserahmen des chimären *env*-Gens im Konstrukt pSIVagm3-X4mc mittels der Fusions-PCR korrekt fusioniert worden war, wurde eine DNA-Sequenzanalyse über den Bereich des V3-Loops mit Hilfe der Primer A6646(+) und A6926(-) durchgeführt. Es ergab sich über den sequenzierten Bereich ein durchgehendes Leseraster und einen korrekten Austausch zum HIV-1-V3-Loop. Der Sequenzausschnitt des sequenzierten V3-Loops ist im Vergleich zum Nukleotidbereich des pSIVagm3mc mit der zusätzlichen Erkennungsstelle für *Hind*III in Abb. 11 gezeigt.

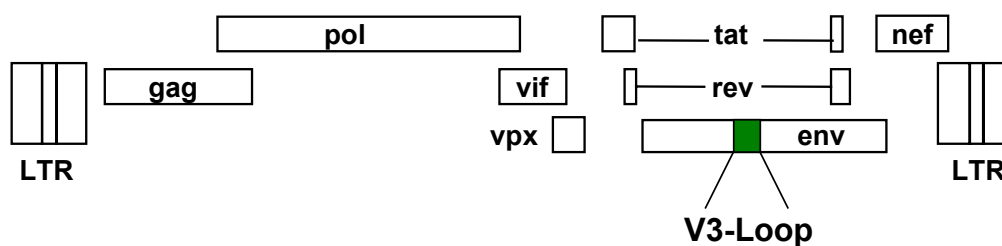


Abb. 10: Das Hybridvirus SIVagm3-X4mc
Genomstruktur von SIVagm3-X4mc; grün dargestellt ist der ausgetauschte V3-Loop

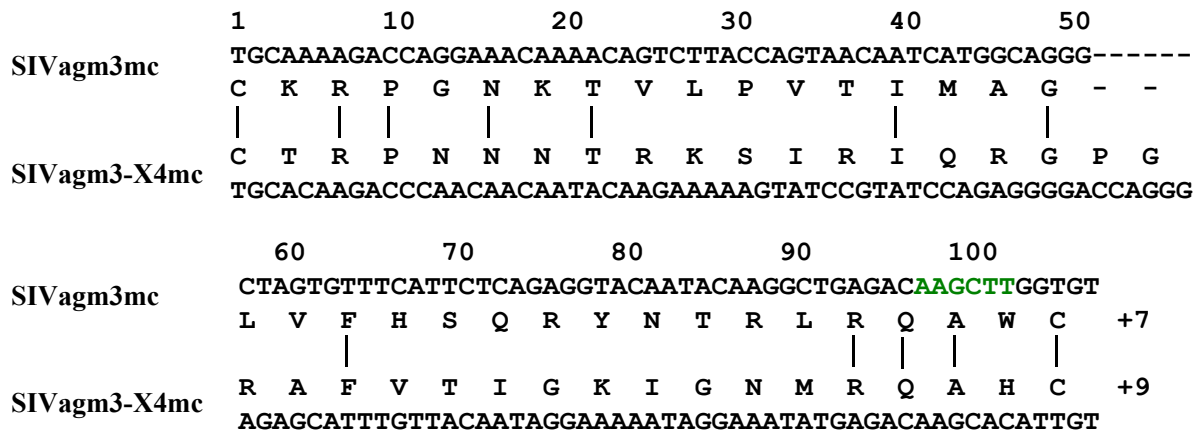


Abb. 11: Sequenz des Peptidloops der dritten variablen Domäne (V3-Loop) im Env von SIVagm3mc und SIVagm3-X4

Sequenzausschnitt und Aminosäurenleseraster *env* des V3-Loops von pSIVagm3-X4mc (untere Reihen) im Vergleich zum Nukleotidbereich (A6726 – A6827) und Aminosäurenleseraster von pSIVagm3mc (obere Reihen); die Sequenzgemeinsamkeiten sind durch Querstriche dargestellt; die grün markierten Nukleotide zeigen die Erkennungssequenz des Enzyms *HindIII*; die Nettoladung der Aminosäuren des jeweiligen V3-Loops ist am Ende dargestellt.

Um die biologische Aktivität des rekombinanten Hybrid-Provirus zu überprüfen, wurde die provirale DNA des Plasmides pSIVagm3-X4mc in die T-Lymphozyten-Zelllinie Molt4.8 transfiziert. Die erfolgreiche Transfektion und damit verbundene Virusproteinsynthese wurde 48 Stunden später mittels IPA nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pSIVMB2 verwendet. Als Negativkontrolle wurde eine Mock-Transfektion mit DNA des Plasmides PUC19 durchgeführt. Zum Nachweis der SIVagm3mc-Antigene wurde ein spezifisches Serum (1 : 400) mit der Bezeichnung Nem170 verwendet, das einem mit SIVagm3mc infizierten Schweinsaffen entnommen worden war. Die Bildung der Virusantigene konnte durch die Rotfärbung der Zellen im IPA (siehe 2.3.1.1) nachgewiesen werden. Filtrierter Zellkulturüberstand mit den sezernierten Viruspartikeln wurde dann zur Infektion von Molt4.8-Zellen oder C8166-Zellen eingesetzt. Spätestens nach einer Woche konnte eine erfolgreiche Infektion mittels RT-Test im Gegensatz zur Negativkontrolle nachgewiesen werden. Somit war die Replikationsfähigkeit des neu konstruierten Virus SIVagm3-X4mc in permissiven T-Zelllinien gegeben.

Überstände, die nach ein-bis sechswöchiger Kultivierung mit den T-Zelllinien im RT-Test hohe Werte erzielten, wurden in Aliquots als Virusstocks eingefroren. Der Virustiter dieser verschiedenen Virusstocks wurde durch Titration auf C8166-Zellen bestimmt (siehe 2.3.3). Mit dieser Methode wird die Anzahl infektiöser Viruspartikel pro ml Überstand, ausgedrückt in TCID₅₀ pro ml Überstand, definiert. Es wurden, wie in Abb. 12 dargestellt, Virustiter bis zu 9×10^6 TCID₅₀ / ml für das Virus SIVagm3-X4mc und $2,2 \times 10^6$ TCID₅₀ / ml für das Virus SIVagm3mc erreicht.

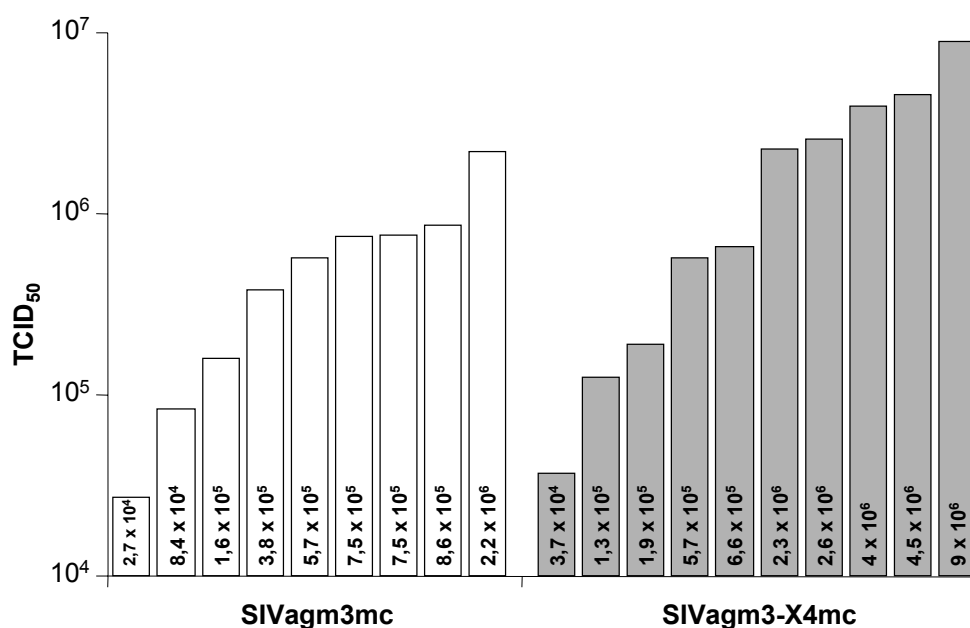


Abb. 12: Titerbestimmung von Überständen der Viren SIVagm3mc und SIVagm3-X4mc
Überstände von SIVagm3mc (weiß) und SIVagm3-X4mc (grau) wurden auf C8166-Zellen titriert zur Bestimmung der TCID₅₀

3.2 Untersuchung zur Korezeptornutzung von SIV

Sowohl bei natürlich infizierten AGM (Cichutek und Norley, 1993) als auch bei mit dem Moleklarklon SIVagm3mc infizierten AGM (Baier *et al.*, 1989) konnte keine Krankheitsentwicklung beobachtet werden: die Infektion verläuft apathogen. Es stellt sich die Frage, welche Korezeptoren Isolate aus natürlich infizierten AGM zum Zelleintritt nutzen. Außerdem ist es interessant zu untersuchen, ob die Korezeptornutzung von pathogenen SIV im Vergleich zum apathogenem SIVagm unterschiedlich ist.

3.2.1 Reisolierung

Eine erfolgreiche Reisolierung zu hohen Titern ist die Voraussetzung für eine vergleichende Studie der Korezeptornutzung. Damit sich der Tropismus der Viren durch die Methodik der Reisolierung nicht verändern kann, wurde versucht, Virus direkt aus PBMC ohne Kokultivierung mit einer sensitiven T-Zelllinie zu isolieren.

3.2.1.1 Reisolierung aus PBMC von Schweinsaffen

Da AGM-PBMC einen sehr hohen Anteil an CD8⁺-Zellen enthalten, die SIV suppressierende Zytokine sezernieren können, wurde die Methodik der Reisolierung zuerst an NEM-PBMC etabliert, um darauf aufbauend auch die Isolierung aus AGM-PBMC verbessern zu können. Verwendet wurden dabei PBMC (definiert als „Spender-PBMC“) aus einem mit dem moderat pathogenen SIVagm9063 infizierten Schweinsaffen (NEM₆₈₁₅). Dieses Virus löst in Schweinsaffen eine AIDS-ähnliche Erkrankung aus (Hirsch *et al.*, 1995). Die Proliferation der Zellen wurde angeregt durch eine vierwöchige Kokultivierung mit PBMC aus einem uninfizierten Schweinsaffen (NEM₆₆₃₅) (definiert als „Empfänger-PBMC“), um durch diese "mixed lymphocytes reaction" die Virusproduktion zu steigern. Zur Stimulierung und Aktivierung der Zellen wurden zusätzlich entweder die T-Zellstimulantien PHA und IL2 oder der Phorbolster TPA in Kombination mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin verwendet. TPA und Ionomycin stimulieren die mitogene Signalkaskade, aktivieren mitogene Transkriptionsfaktoren und erhöhen damit die Expression nachgeschalteter Gene. Um mögliche negative Einflüsse der sezernierten Zytokine zu unterbinden, wurden vor der Kultivierungsphase mittels MACS-Separierung die CD8⁺-Zellen depletiert. Als Positivkontrolle wurde eine Reisolierung durchgeführt, bei der die PBMC des infizierten Schweinsaffen mit der suszeptiblen Zelllinie C8166 kokultiviert wurden. Als Negativkontrolle wurden PBMC des uninfizierten Schweinsaffen mit der T-Zelllinie kokultiviert. Die

verschiedenen Methoden wurden kombiniert und verglichen. Dabei zeigte sich, dass es nur durch die Kombination der CD8+-Depletion von Spender- und Empfänger-PBMC und nachgeschalteter TPA / Ionomycin-Stimulation zu einer erfolgreichen Reisolierung nach vier Wochen kam. Der Titer des Isolats blieb aber um das 3,7-fache unter dem Wert, der durch eine Kokultivierung mit der T-Zelllinie C8166 erreicht werden konnte (Abb. 13).

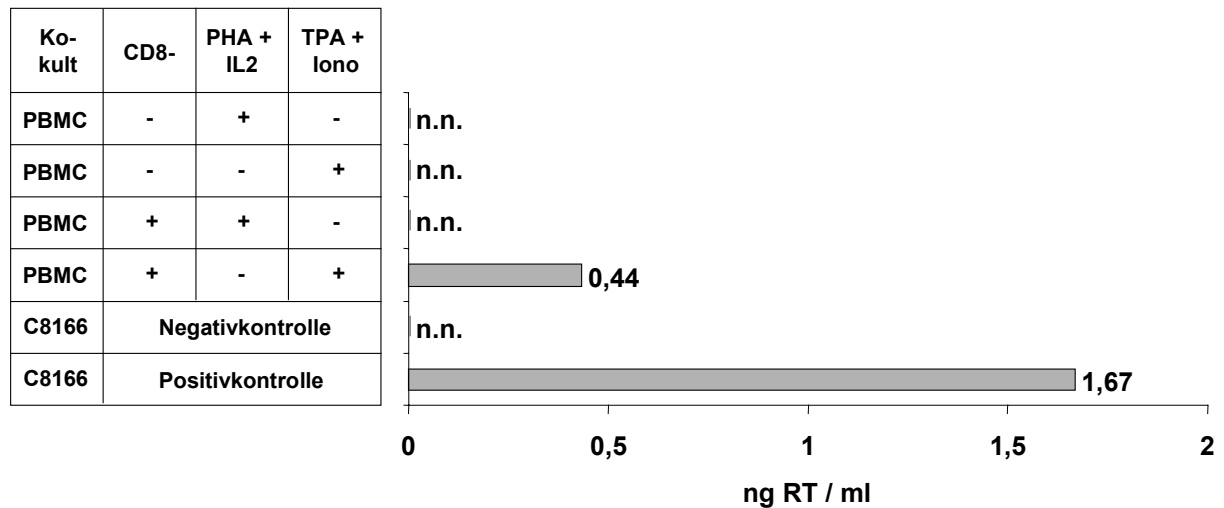


Abb. 13: Reisolierung von SIVagm9063 aus PBMC von NEM₆₈₁₅
 Reisolierung aus NEM₆₈₁₅ wurde nach verschiedener Methodik durchgeführt (siehe linker Kasten) und erfolgte nach vierwöchiger Kulturdauer; Isoliertes Virus wurde gemessen in ng RT / ml

dabei bedeuten die Abkürzungen:

n.n.: nicht nachweisbar

Positivkontrolle: PBMC des infizierten NEM₆₈₁₅ kokultiviert mit C8166-Zellen

Negativkontrolle: PBMC des uninfizierten NEM₆₆₃₅ kokultiviert mit C8166-Zellen

Kokult: Kokultivierung der PBMC von NEM₆₈₁₅ mit PBMC von NEM₆₆₃₅ oder mit C8166-Zellen

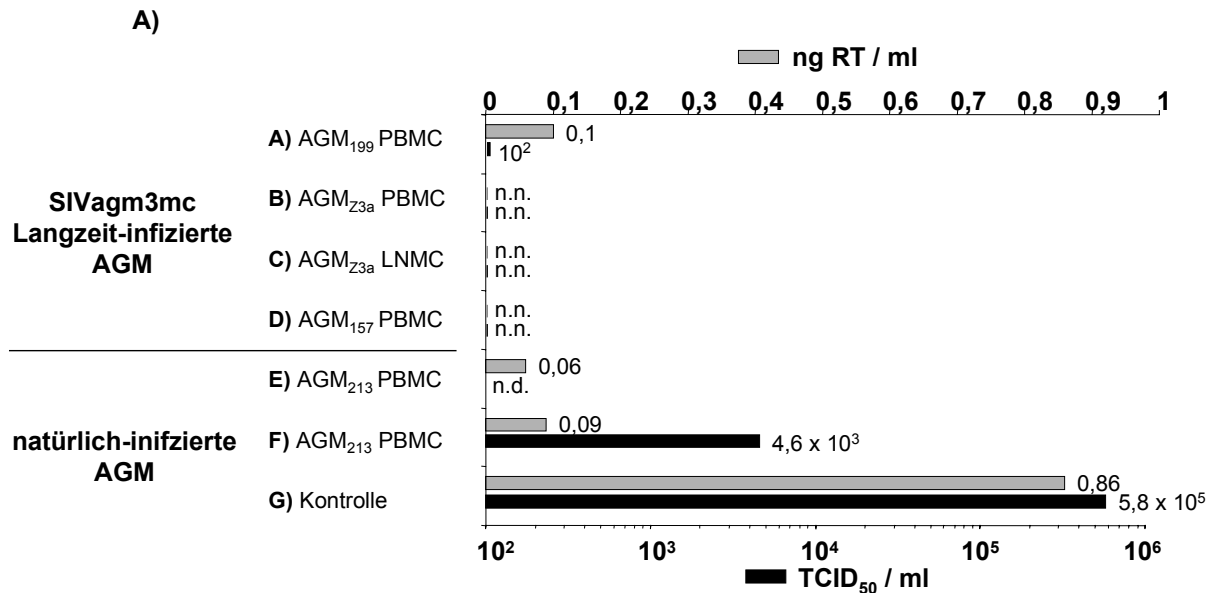
CD8-: MACS-Separierung zur Depletion der CD8+-Zellen; danach erfolgte die Kultivierung

PHA / IL2: Stimulierung der Zellen mit PHA / IL2 (siehe 2.3.4.2)

TPA / Iono: Stimulierung der Zellen mit TPA / Ionomycin (siehe 2.3.4.2)

3.2.1.2 Reisolierung aus PBMC und LNMC von AGM

Um Virusisolate aus infizierten AGM zu gewinnen, wurden eine natürlich infizierte AGM (AGM₂₁₃) und mehrere aus mit dem Moleklarklon SIVagm3mc Langzeit-infizierte AGM (AGM₁₉₉, AGM_{Z3a}, AGM₁₅₇) ausgewählt. Reisolierungsversuche aus AGM erweisen sich schwieriger als Isolierungen aus NEM-PBMC, da die AGM nur sehr wenig (bis zu 10% Anteil an Gesamt-PBMC) CD4⁺-Zellen besitzen. Daher wurden verschiedene Methoden, wie in 3.2.1.1 beschrieben, ausprobiert, unter anderem auch CD8⁺-Depletierung und anschließende TPA-Stimulierung. Zum Teil wurde auf eine MACS-Separierung verzichtet, da die Ausbeute an Zellen wegen des limitierten Anteils der CD4⁺-Zellpopulation zu gering war. Unter anderem wurde die CD8⁺-Depletion nur bei den Empfänger-Zellen, d.h. den PBMC aus nichtinfizierten AGM, durchgeführt, um insgesamt den Anteil an Zytokin-sezernierenden Zellen zu limitieren, aber die Ausbeute der infizierten Zellen durch die MACS-Säulenaufreinigung nicht zu beeinträchtigen. Als Positivkontrolle wurde eine Isolierung durchgeführt aus verschiedenen gepoolten natürlich infizierten AGM, deren PBMC mit der T-Zelllinie Molt4.8 kokultiviert wurden. Hier ergab sich ein Titer von 0,86 ng RT / ml Überstand (Abb. 14 G). Isolierungsversuche aus der AGM₂₁₃ waren sowohl mit Stimulierung durch PHA, als auch durch TPA erfolgreich (Abb. 14 E + F). Sowohl die Kultivierungsdauer als auch individuelle Unterschiede spielten eine Rolle: nach 9 Tagen konnte z.B. bei der AGM₁₉₉ noch kein Virus isoliert werden, allerdings ab 3 Wochen Kokultivierung wurde ein positiver RT-Wert ermittelt (Abb. 14 A). Bei AGM₁₅₇ konnte kein Virus reisoliert werden (Abb. 14 D). Bei dem Affen AGM_{Z3a} wurde erfolglos versucht, sowohl aus PBMC als auch aus der Milz Virus zu isolieren (Abb. 14 B + C). Die Überstände mit den höchsten RT-Werten wurden eingesetzt zur Titration auf der T-Zelllinie C8166 zur Ermittlung der TCID₅₀. Diese Titerermittlung bestimmt nur infektiöses Virus. Daher eignet sich die Methode der TCID₅₀-Titerbestimmung zur Quantifizierung von Virusüberständen besser für nachfolgende Infektionsversuche. Bei zwei Isolaten aus natürlich infizierten AGM konnten Titer ermittelt werden: die Kokultivierung mit Molt4.8-Zellen (Positivkontrolle) ergab einen Titer von $5,8 \times 10^5$ (Abb. 14 G) und die Virusreisolierung aus AGM₂₁₃ ergab einen Titer von $4,6 \times 10^3$ TCID₅₀ (Abb. 14 F). Bei den mit dem Moleklarklon SIVagm3mc Langzeit-infizierten AGM konnte jedoch kein ausreichend hoher Titer ermittelt werden. Damit stand für die Untersuchung der Korezeptornutzung ein Isolat aus einer natürlich infizierten AGM zur Verfügung.



B)

	Kokult	CD8-	PHA + IL2	TPA + Iono
A)	PBMC	+ (E)	-	+
B)	PBMC	-	+	-
C)	PBMC	-	+	-
D)	PBMC	+ (S/E)	-	+
E)	PBMC	-	+	-
F)	PBMC	-	-	+
G)	Molt4.8	Kontrolle		

Abb. 14: Virus-Reisolierung aus PBMC von AGM

A) Virus wurde reisoliert nach verschiedener Methodik (**A** bis **G**) aus PBMC oder LNMC von SIVagm3mc Langzeit-infizierten AGM (AGM₁₉₉, AGM_{Z3a}, AGM₁₅₇; **A** bis **D**) oder aus PBMC von natürlich infizierten AGM (AGM₂₁₃, AGM; **E** bis **G**); isoliertes Virus wurde gemessen in ng RT / ml Überstand (grau) und Virusüberstände wurden titriert auf C8166-Zellen zur Ermittlung der TCID₅₀ (schwarz); n.n.: nicht nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

B) Methodik der Reisolierung

dabei bedeuten die Abkürzungen:

Kontrolle: PBMC der infizierten AGM kokultiviert mit Molt4.8-Zellen

Kokult: Kokultivierung mit uninfizierten PBMC von AGM

CD8-: MACS-Separierung zur Depletion der CD8+-Zellen; Depletion der Empfänger-PBMC (E) oder von Spender und Empfänger (S/E) danach erfolgte die Kultivierung

PHA / IL2: Stimulierung der Zellen mit PHA / IL2 (siehe 2.3.4.2)

TPA / Iono: Stimulierung der Zellen mit TPA / Ionomycin (siehe 2.3.4.2)

3.2.2 Korezeptornutzung eines Isolates aus einer natürlich infizierten AGM im Vergleich zu pathogenen SIV

Die Korezeptorspezifität von einem apathogenem SIV_{agm}, d.h. ein Isolat aus einer natürlich infizierten AGM, wurde verglichen mit zwei SIV, die Krankheit induzieren können. Das moderat pathogene SIV_{agm}9063, isoliert aus einem mit SIV_{agm}90 (ein Isolat aus einer natürlich infizierten AGM) infizierten Schweinsaffen, führte in fünf von acht Schweinsaffen innerhalb eines Jahres zum Tod der Tiere (Hirsch *et al.*, 1995). Das akut pathogene SIV_{smm}PBj1.9 wurde molekular kloniert aus einem Schweinsaffen, der mit SIV_{smm}PBj14 infiziert worden war, das eine akute Erkrankung hervorrief und innerhalb von acht Tagen zum Tod des Tieres führte. Die Tiere zeigten als Symptome hohes Fieber, starke Diarrhöe, Lymphadenopathie sowie einen drastischen Rückgang der peripheren CD4⁺- und CD8⁺- T-Lymphozyten. Das Isolat SIV_{smm}PBj14 stammt aus einem Schweinsaffen, der mit einem Isolat aus einer Schopfmangabe (SIV_{smm}9) infiziert worden war und eine AIDS-ähnliche Erkrankung aufwies (Dewhurst *et al.*, 1990; Fultz *et al.*, 1989).

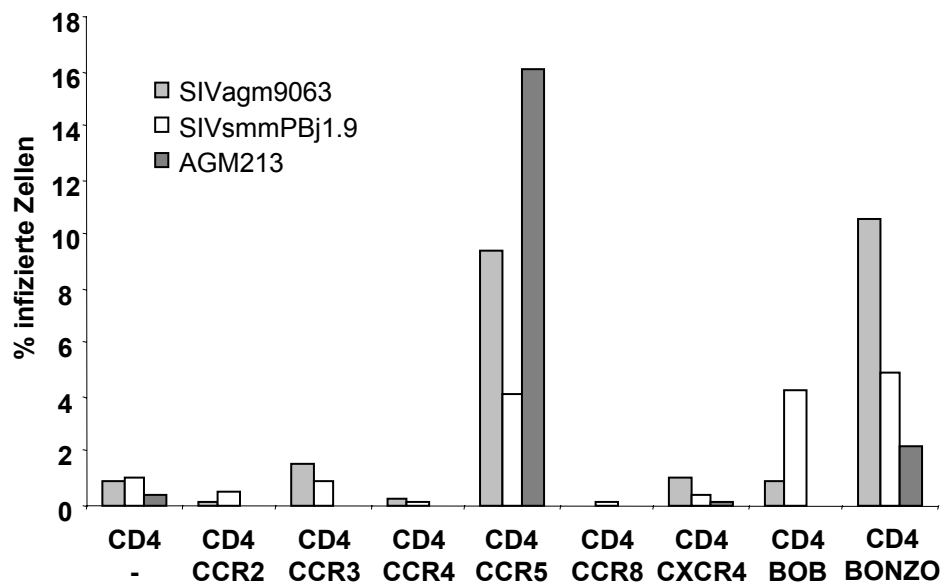


Abb. 15: Korezeptornutzung von verschiedenen SIV
 GHOST-Zellen wurden mit SIV_{agm}9063 (in hellgrau), mit SIV_{smm}PBj1.9 (in weiß) und mit SIV isoliert aus AGM₂₁₃ (in dunkelgrau) mit einer *moi* von 10 infiziert; infizierte Zellen wurden im FACS gemessen;

Zur Untersuchung der Korezeptornutzung wurde eine humane Osteosarcom-Zelllinie, die stabil den Rezeptor CD4 und einen von mehreren Korezeptoren exprimiert, die sog. GHOST-Zelllinien, mit einer moi von 10 infiziert. Da diese Zelllinie stabil ein HIV-2-LTR getriebenes GFP-Konstrukt trägt, können aufgrund der Tat-induzierten GFP-Expression die infizierten Zellen im FACS gemessen werden. Wie in Abb. 15 zu sehen, infizieren das moderat pathogene SIV_{agm9063} als auch das apathogene Isolat AGM₂₁₃ bevorzugt die Zellen, die den Korezeptor CCR5 und BONZO exprimieren. Das akut pathogene SIV_{smmPBj1.9} nutzt zum Zelleintritt hauptsächlich die Chemokinrezeptoren CCR5, BOB und BONZO. Die schwache Hintergrund-Infektion aller GHOST-Zelllinien kann auf die bekannte endogene Expression von BONZO zurückgeführt werden (Edinger *et al.*, 1998). Sowohl pathogene SIV als auch ein Isolat aus einer natürlich infizierten AGM nutzen zum Zelleintritt nicht den Korezeptor CXCR4, sondern bevorzugt CCR5 und BONZO. Welchen Einfluß ein Wechsel der Korezeptornutzung von CCR5 zu CXCR4 im apathogenem SIV_{agm}-System hervorruft, kann mit Hilfe des neu konstruierten Molekularklons SIV_{agm3-X4mc} evaluiert werden.

3.3 Eigenschaften von SIVagm3-X4mc *in-vitro*

Die Eigenschaften des neu konstruierten Molekularklons SIVagm3-X4mc wurden in *in-vitro* Experimenten untersucht. Dazu wurden die Korezeptornutzung von SIVagm3-X4 und das Replikationsverhalten *in-vitro* überprüft im Vergleich zum Parentalvirus SIVagm3mc. Außerdem wurden potentielle Zielzellen beider Virusvarianten charakterisiert.

3.3.1 Korezeptornutzung von SIVagm3-X4mc

Um die Korezeptornutzung von SIVagm3-X4mc im Vergleich zum Parentalvirus SIVagm3mc zu testen, wurden die GHOST-Zelllinien mit einer *moi* von 10 mit den jeweiligen Virusvarianten infiziert. Der Nachweis der Infektion erfolgte durch Detektion von p27-Gag im Überstand mittels ELISA (Abb. 16). Außerdem wurde die GFP-Expression der Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 17). Aufgrund der nach einer Infektion Tat-induzierten GFP-Expression leuchten infizierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün.

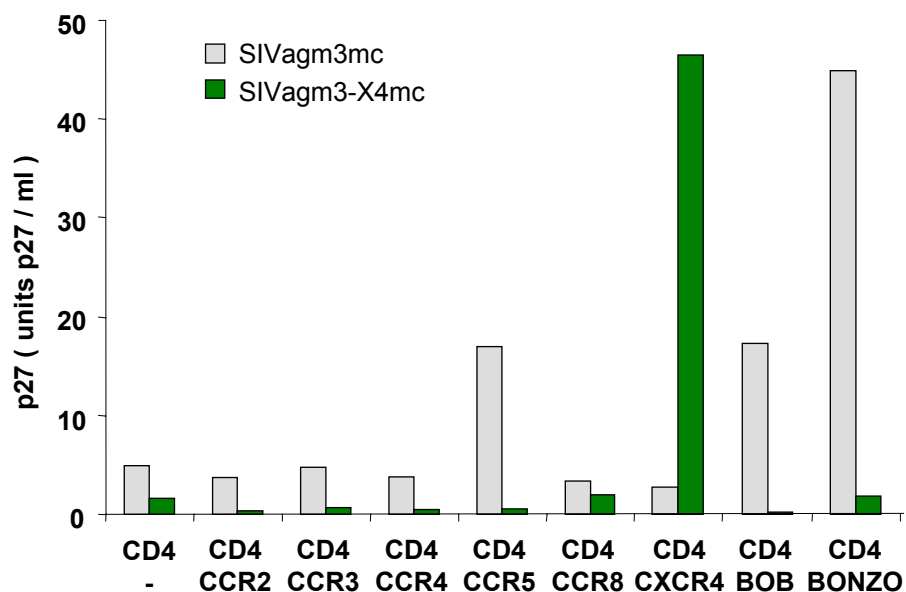


Abb. 16: Korezeptornutzung von SIVagm3mc und SIVagm3-X4mc

GHOST-Zellen wurden mit SIVagm3mc (in grau) und SIVagm3-X4mc (in grün) mit einer *moi* von 10 infiziert; der Nachweis der Infektion erfolgte mittels ELISA (p27-Antigen-Nachweis im Überstand)

Nach Infektion der GHOST-Zelllinien zeigte sich, daß das Parentalvirus SIVagm3mc bevorzugt die Rezeptoren CCR5, BOB und BONZO zum Zelleintritt nutzt (Abb. 16 + 17 A). Dagegen repliziert SIVagm3-X4mc ausschließlich in der CD4/CXCR4-Linie und kann nicht mehr die Korezeptoren CCR5, BOB und BONZO zum Zelleintritt verwenden (Abb. 16 + 17 B). Die Expression des Rezeptors CD4 und der Korezeptoren CCR5 und CXCR4 wurden im FACS überprüft (Abb. 18 + Tab. 1). Die Messung der Oberflächenexpression des Rezeptors CD4 ergab je nach Zelllinie 34,0 – 48,5 % CD4-positiver Zellen. Der Korezeptor CCR5 wird zu 77,0 % von der CD4/CCR5-Linie exprimiert und findet sich nicht auf den anderen Linien (Abb 18 + Tab. 1). Wie auch in der Literatur beschrieben (Edinger *et al.*, 1998), exprimieren die GHOST-Zellen zu Prozentsätzen von 8,0 – 40,0 % den Rezeptor CXCR4 (Abb. 18 + Tab. 1). Die CD4/CXCR4-Linie exprimiert den CXCR4-Rezeptor zu 85,0 % (Abb. 18 + Tab. 1). Die GHOST-Zelllinien exprimieren somit stabil in hohen Prozentsätzen den Rezeptor CD4 und auf den jeweiligen Indikatorlinien CCR5 und CXCR4. Die schwache Replikation von SIVagm3mc und SIVagm3-X4mc in allen GHOST-Zelllinien kann auf die endogene Expression von BONZO und CXCR4 zurückzuführen sein.

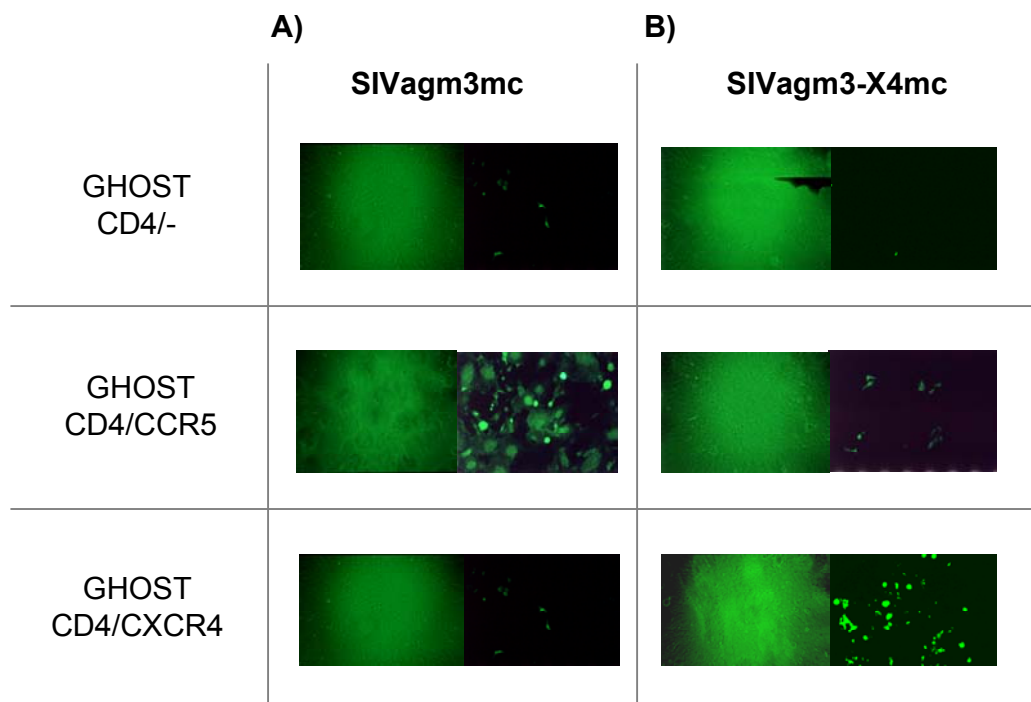


Abb. 17: Fluoreszenzaufnahmen von infizierten GHOST-Zellen

Die GHOST-Zelllinien CD4/CXCR4 (oberste Reihe), CD4/CCR5 (mittlere Reihe) und die Parentallinie CD4 (unterste Reihe) wurden nach Infektion von SIVagm3mc (A) und SIVagm3-X4mc (B) im Durchlicht und unter dem Fluoreszenzmikroskop photographiert (A + B).

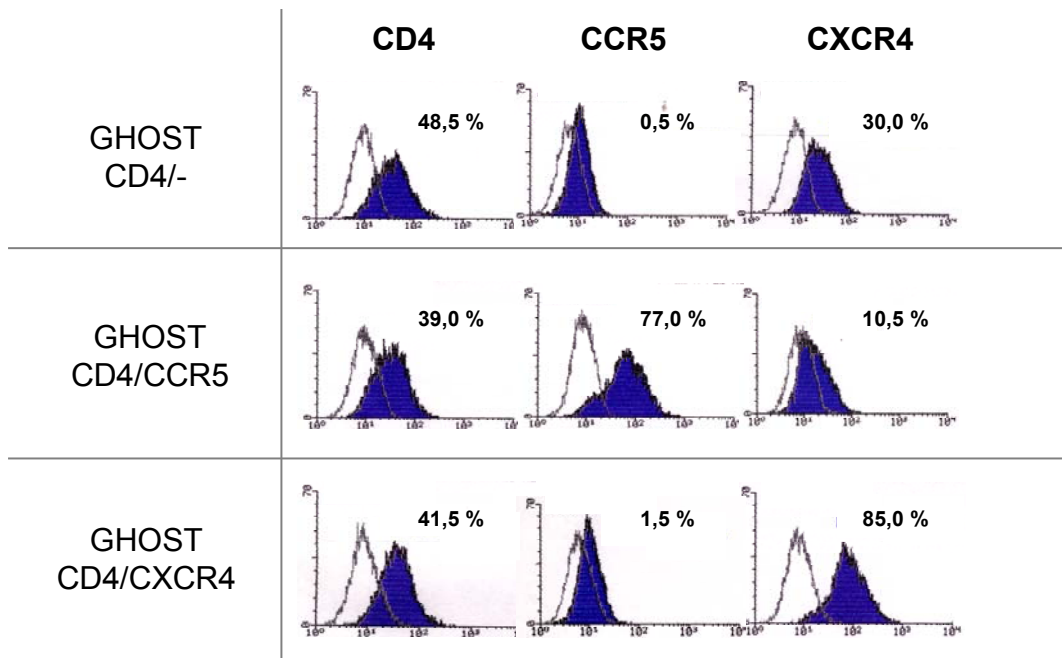


Abb. 18: FACS-Analyse der GHOST-Zellen auf Expression der Rezeptoren
 Die GHOST-Zelllinien CD4/CXCR4 (oberste Reihe), CD4/CCR5 (mittlere Reihe) und die Parentallinie CD4 (unterste Reihe) wurden im FACS auf Expression von CD4 (linke FACS-Histogramme) und der Korezeptoren CCR5 (mittlere FACS-Histogramme) und CXCR4 (rechte FACS-Histogramme) gemessen. Das weiße Histogramm stellt die Färbung mit der Isotypkontrolle dar, das blaue Histogramm die Färbung mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper.

Oberflächenexpression %	CD4	CCR5	CXCR4
GHOST CD4/- (Parental)	48,5	0,5	30,0
GHOST CD4/CCR2b	nd	nd	40,0
GHOST CD4/CCR3	46,0	nd	10,0
GHOST CD4/CCR4	46,0	nd	8,0
GHOST CD4/CCR5	39,0	77,0	10,5
GHOST CD4/CCR8	41,0	nd	21,0
GHOST CD4/CXCR4	41,5	1,5	85,0
GHOST CD4/BOB	34,0	nd	20,0
GHOST CD4/BONZO	47,0	nd	9,0

Tab. 1: FACS-Analyse der GHOST-Zelllinien auf Expression der Rezeptoren
 Das komplette Set der GHOST-Zelllinien (Parental bis BONZO) wurde auf Expression von CXCR4 (rechte Spalte), CD4 (linke Spalte) und CCR5 (mittlere Spalte) im FACS gemessen; dargestellt sind die Prozentzahlen positiv-gemessener Zellen; nd: nicht durchgeführt

Um die Ergebnisse zur Korezeptornutzung zu bekräftigen, wurden Replikationsstudien durchgeführt in An- oder Abwesenheit des Chemokins SDF-1 α . Da dieses den natürlichen Liganden des Korezeptors CXCR4 darstellt, sollte dadurch der Viruseintritt eines CXCR4-tropen Virus gehemmt sein. Die Virus-Blockierung resultiert aus der Internalisierung des Rezeptors aufgrund der Bindung seines Liganden (Amara *et al.*, 1997). Zunächst wurden C8166 T-Zellen mit beiden Viren mit einer moi von 0,1 in Abwesenheit oder in Anwesenheit von 0,5, 2 und 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ SDF-1 α infiziert und im Verlauf von 10 Tagen im Überstand RT-Aktivität gemessen (Abb. 19). Dabei ergab sich, daß das Parentalvirus unbeeinflusst von der Zugabe von SDF replizieren kann, wohingegen SIVagm3-X4mc dosisabhängig gehemmt wird.

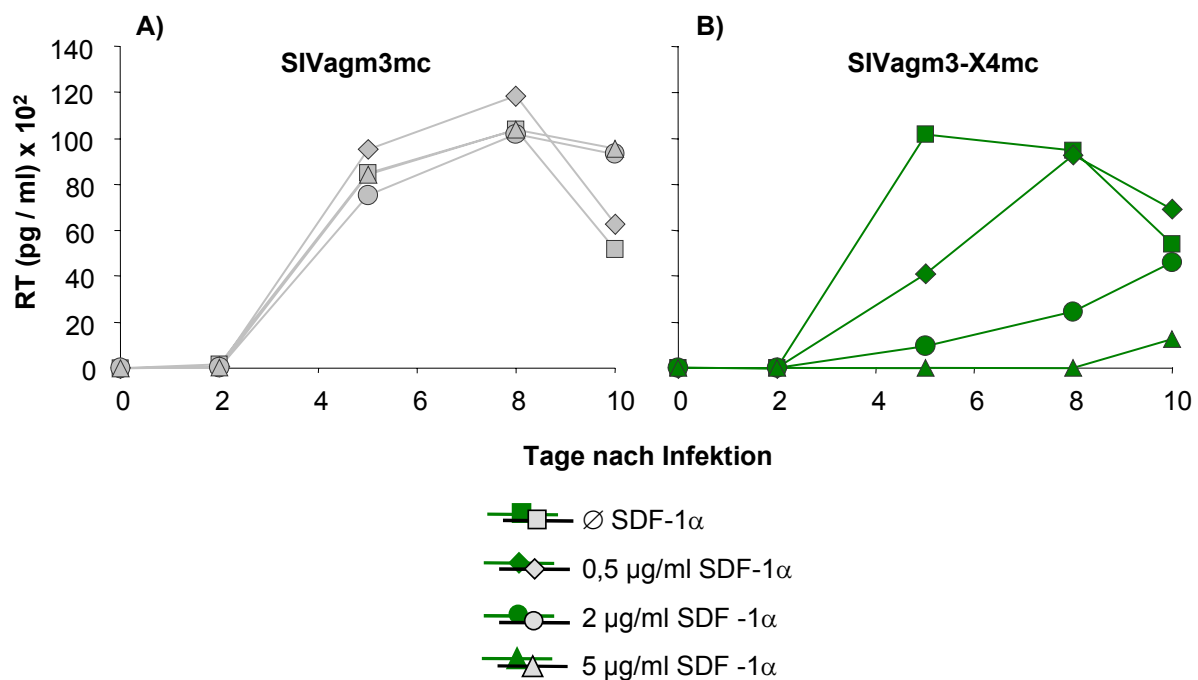


Abb. 19: Replikation in C8166-T-Zellen nach Zugabe von SDF-1 α

C8166-Zellen wurden mit SIVagm3mc (A) und SIVagm3-X4mc (B) mit einer moi von 0,1 infiziert. Die Zellen wurden ohne SDF (Quadrate) oder mit SDF in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Rhomben), 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Kreise) oder 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Dreiecke) in Kultur gehalten. Der Nachweis der Infektion erfolgte über Messung der RT-Werte.

Auch in primären Zellen wurde die Hemmung des Zelleintritts überprüft (Abb. 20). PHA/IL2 stimulierte PBMC von Schweinsaffen wurden mit einer *moi* von 1 infiziert und in Gegenwart von 0, 1, 3, oder 6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ SDF-1 α kultiviert. Es zeigte sich wieder eine SDF-unabhängige Replikation von SIVagm3mc und eine dosisabhängige Hemmung des Zelleintritts von SIVagm3-X4mc, was für ein X4-tropes Virus zu erwarten ist. Diese Ergebnisse zeigen somit, daß die Korezeptornutzung von SIVagm3mc erfolgreich geändert wurde von CCR5, BOB und BONZO zu CXCR4, was zu einem replikativen neuen Virus führte, nämlich SIVagm3-X4mc. Diese Änderung wurde durch einen Austausch des V3-Loops erzielt. Daraus kann man schließen, daß der V3-Loop in SIVagm für den Virustropismus verantwortlich ist.

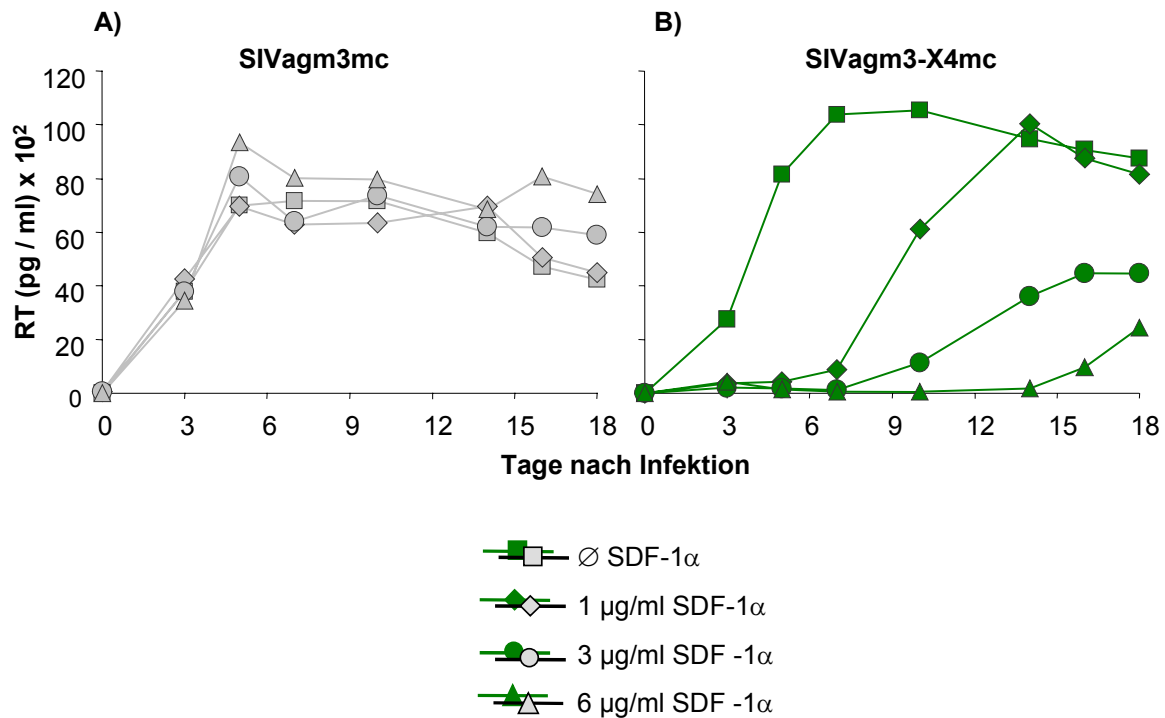


Abb. 20 Replikation in PBMC von NEM nach Zugabe von SDF-1 α
 PHA/IL2 stimulierte PBMC von Schweinsaffen wurden mit SIVagm3mc (A) und SIVagm3-X4mc (B) mit einer *moi* von 1 infiziert. Die Zellen wurden ohne SDF (Quadrate) oder mit SDF in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Rhomben), 3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Kreise) oder 6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Dreiecke) in Kultur gehalten. Der Nachweis der Infektion erfolgte über Messung der RT-Werte.

3.3.2 Korezeptorverteilung in PBMC von AGM und NEM

Um sicherzustellen, daß potentielle Zielzellen in primären Zellen für beide Viren vorhanden sind, wurden FACS-Analysen in PBMC von AGM und NEM durchgeführt. Dazu wurden PBMC auf die Lymphozytenpopulation eingegrenzt und die Expression von CD4 und der Korezeptoren CCR5 und CXCR4 gemessen. 19,0 % der T-Lymphozyten eines individuellen Schweinsaffen, nämlich NEM₂₃₆, sind doppelpositiv für CD4 und CCR5 und 28,0 % sind doppelpositiv für CD4 und CXCR4 (Abb. 21). 6,5 % der T-Lymphozyten einer Afrikanischen Grünen Meerkatze, AGM_{Z3a}, exprimieren CD4 und CCR5 und 9,5 % sind CD4 und CXCR4-doppelpositiv (Abb. 21 A). Bezogen auf die Gesamtanzahl an CD4-positiver T-Lymphozyten, d.h. in NEM₂₃₆ 35,0 % und in AGM_{Z3a} 10,0 %, ergibt sich rechnerisch, daß 54,3 % der CD4-positiven T-Zellen von NEM₂₃₆ den Rezeptor CCR5 exprimieren und 80,0 % den Rezeptor CXCR4. 65,0 % der CD4+-T-Zellen von AGM_{Z3a} sind CCR5 positiv und 95,0 % sind CXCR4 positiv (Abb. 21 B). Da nachfolgende *in-vivo* Experimente in Schweinsaffen durchgeführt wurden, wurden die PBMC von mehreren Individuen von Schweinsaffen im FACS auf die Expression der Korezeptoren gemessen (Tab. 2). Hier ergab sich ein Durchschnittswert von 77,9 % CCR5 positive und 91,9 % CXCR4 positive CD4+-T-Zellen (Tab. 2). Somit sind sowohl für das Wildtypvirus SIV_{agm3mc} als auch für das CXCR4-trope SIV_{agm3-X4mc} in primären Zellen von Schweinsaffen und Afrikanischen Grünen Meerkatzen genügend potentielle Zielzellen zur Replikation vorhanden.

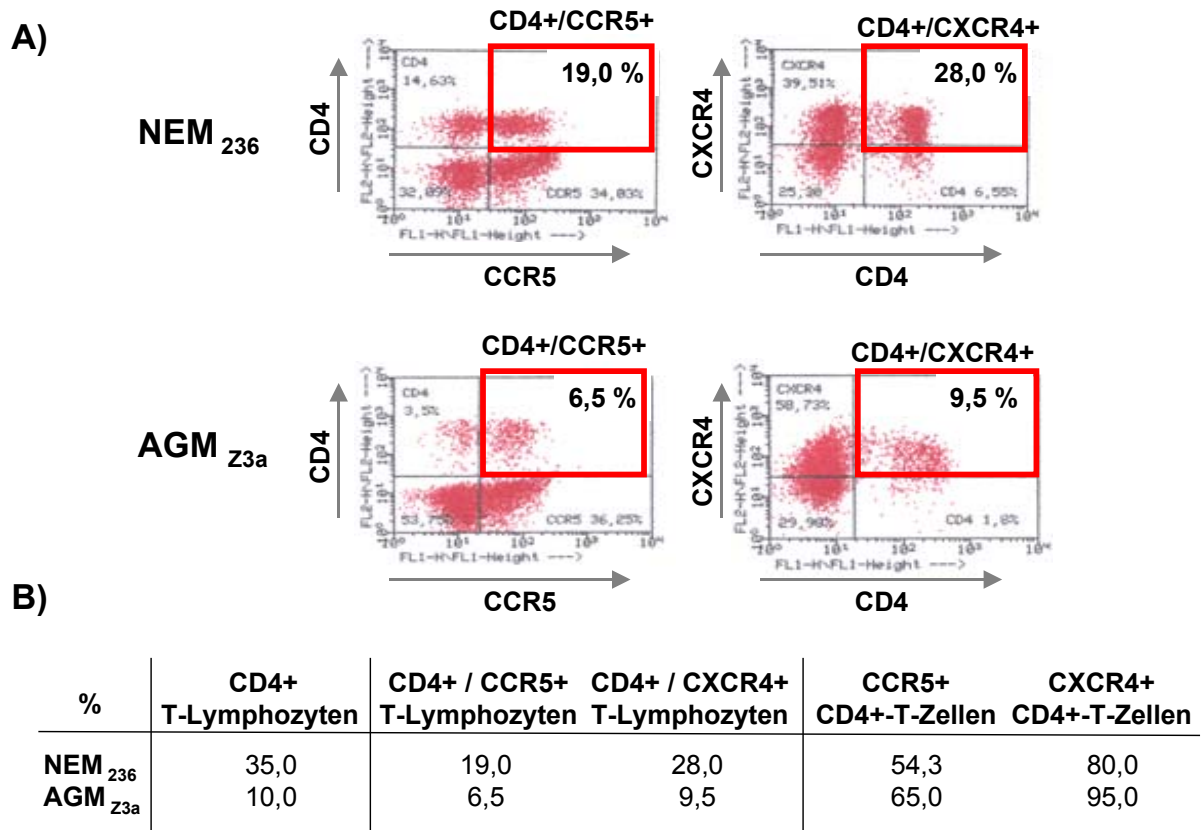


Abb. 21: FACS-Analyse der Korezeptoren je eines individuellen NEM und AGM

- A)** Doppelfärbung im FACS auf die Rezeptoren CD4 und CCR5 in der linken Spalte, CD4 und CXCR4 in der rechten Spalte des NEM₂₃₆ (obere Reihe) und des AGM_{Z3a} (untere Reihe); die doppelpositiven Zellen sind rot umrandet;
- B)** Tabellarische Zusammenstellung der Prozentsätze an CD4-positiver T-Lymphozyten (linke Spalte), an doppelpositiver CD4/CCR5 oder CD4/CXCR4 T-Lymphozyten (mittlere Spalte) und des prozentualen Anteils der CCR5+ oder CXCR4+-Zellen an Gesamt-CD4-positiver T-Lymphozyten (rechte Spalte) des NEM₂₃₆ (obere Reihe) oder des AGM_{Z3a} (untere Reihe)

%	FACS-Analyse der PBMC von unterschiedlichen NEM	Mittelwert
CCR5+ CD4+-T-Zellen	48, 53, 54, 59, 60, 63, 66, 67, 74, 76, 78, 82	77,9 %
CXCR4+ CD4+-T-Zellen	61, 71, 71, 79, 80, 80, 80, 82, 83, 83, 83, 84, 85, 86, 88, 90, 91, 100	91,9 %

Tab. 2: FACS-Analyse der Korezeptoren der PBMC von verschiedenen NEM
 Tabellarische Zusammenstellung des prozentualen Anteils der CCR5+ oder CXCR4+-Zellen an Gesamt-CD4-positiver T-Lymphozyten von verschiedenen NEM; in der rechten Spalte sind die jeweiligen Mittelwerte dargestellt.

3.3.3 Replikation von SIVagm3-X4mc in PBMC von AGM und NEM

Die *in-vitro* Replikationseigenschaft von SIVagm3-X4mc wurde verglichen mit der des Wildtypvirus SIVagm3mc. Dazu wurden PBMC entweder von Schweinsaffen oder von Afrikanischen Grünen Meerkatzen mit einer *moi* von 0,1 infiziert und im Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten infektiöses Virus nachgewiesen. Diese Bestimmung erfolgte durch Titration der Überstände auf C8166 T-Zellen, ausgedrückt in TCID₅₀ / ml.

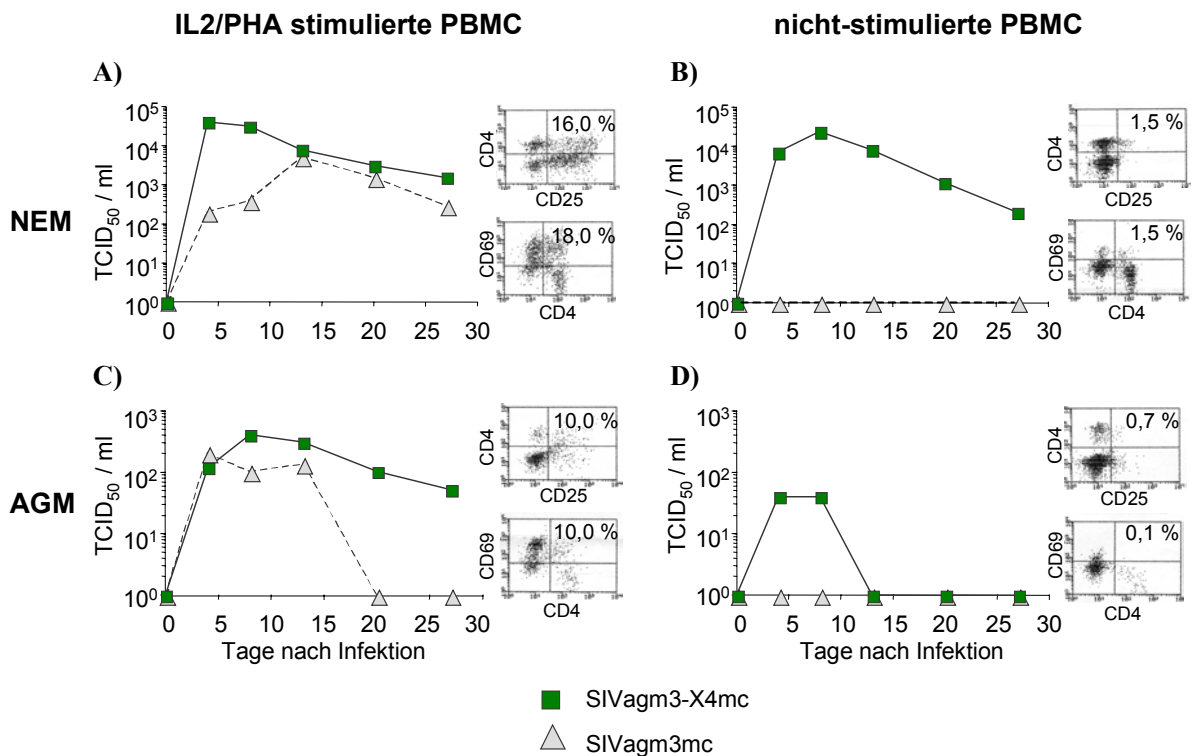


Abb. 22: *In-vitro* Replikation in PBMC von NEM und AGM

PBMC von Schweinsaffen (A + B) und von Afrikanischen Grünen Meerkatzen (C + D) wurden mit SIVagm3mc (grün) und SIVagm3-X4mc (grau) mit einer *moi* von 0,1 infiziert. Replikation wurde in IL2/PHA-stimulierten PBMC (A + C) oder frisch isolierten, nicht stimulierten PBMC (B + D) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion nachgewiesen. Dabei wurden infektiöse Viruspartikel durch Messung der TCID₅₀ in C8166 T-Zellen quantifiziert. Der Stimulierungsstatus der Zellen zum Zeitpunkt der Infektion wurde durch FACS-Analysen der PBMC (eingegrenzt auf die Lymphozytenpopulation) auf Expression von CD4/CD69 oder CD4/CD25 überprüft. Die FACS-Diagramme zeigen die Prozentanteile der doppeltpositiven Lymphozyten.

Wie in Abb. 22 A und 22 C gezeigt, repliziert SIVagm3-X4mc in IL2/PHA stimulierten PBMC von NEM oder AGM zu ähnlich hohen Titern wie SIVagm3mc. Die maximalen Titer von SIVagm3mc waren geringfügig niedriger als die von SIVagm3-X4mc. In Übereinstimmung mit der Literatur repliziert das Wildtypvirus nicht in frisch isolierten, nicht stimulierten PBMC (Abb. 22 B + D) (Dittmar *et al.*, 1995). Interessanterweise konnte SIVagm3-X4mc in nicht stimulierten PBMC sowohl von AGM als auch von NEM replizieren. Die maximalen Titer erreichten dabei Werte ähnlich denen der Replikation in den jeweiligen stimulierten PBMC. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde auch der Stimulierungsstatus der Zellen überprüft. Dazu wurden FACS-Analysen auf Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 durchgeführt. 16,0 % der stimulierten T-Lymphozyten von NEM waren doppelt positiv für CD4 und CD25 und 18,0 % waren CD4/CD69-positiv (Abb. 22 A). Jeweils 10,0 % der Lymphozyten von AGM exprimierten CD4/CD25 und CD4/CD69 (Abb. 22 C). Dagegen konnte in den nicht stimulierten Lymphozyten von NEM nur 1,5 % CD4/CD25 oder CD4/CD69-doppeltpositive Zellen detektiert werden (Abb. 22 B). Die nicht stimulierten Lymphozyten von AGM enthielten nur 0,7 % CD4/CD25-positiv und 0,1 % CD4/CD69-positiv Zellen (Abb. 22 D). Somit konnte gezeigt werden, daß die Population der nicht stimulierten Zellen vor Infektion kaum aktivierte Zellen enthielt. Zusammenfassend kann man sagen, daß SIVagm3-X4mc sowohl in stimulierten als auch in nicht stimulierten PBMC von AGM und NEM replikationsfähig ist.

Das Replikationsverhalten beider Virusvarianten wurde in Subpopulationen der stimulierten PBMC von Schweinsaffen überprüft. Dazu wurden PBMC von NEM mittels α CD4-gekoppelter "Beats" über MACS-Säulen separiert. Gesamt-PBMC sowie die separierte CD4+-Population sowie der Durchlauf der Säule, der CD8+-Zellen enthält, wurden mit PHA/IL2 stimuliert und nach zwei Tagen mit beiden Viren mit einer *moi* von 0,1 infiziert. Im FACS wurde die Reinheit und der Stimulierungsstatus der Populationen überprüft (Abb. 23 C). Die Lymphozytenpopulation von Gesamt-PBMC enthalten 35% CD4, 44% CD8-positiv und 5% CD4/CD8-doppeltpositive Zellen, wohingegen die separierte CD4+-Population zu 71% aus CD4-positiver, zu 7% aus CD4/CD8-doppeltpositiver Zellen bestand und nur noch 8% CD8-positiv Zellen zu finden sind. 62% der Zellen der separierten CD8+-Population exprimierten CD8; 1,7% waren CD4/CD8-positiv und nur noch 3% CD4-positiv. Alle drei Zellpopulationen waren stimuliert: sie exprimierten den Aktivierungsmarker CD69 zu 42% auf Gesamt-PBMC, zu 27% auf der CD4+-Population und zu 46% auf der CD8+-Population. Auch der Aktivierungsmarker CD25 war auf den Gesamt-PBMC (44%) als auch auf der CD8+-Population (45%) zu detektieren. Die Zellen wurden mit einer *moi* von 0,1 infiziert und im Überstand wurden im Infektionsverlauf RT-Werte gemessen. Wie auch schon in der vorangegangenen Replikationsstudie zu sehen war, in der infektiöse Viruspartikel per TCID₅₀ detektiert wurden (Abb. 22), konnten beide Virusvarianten in Gesamt-PBMC replizieren,

wobei die Replikationsfähigkeit des SIVagm3mc (Abb. 23 A) im Vergleich zum SIVagm3-X4mc (Abb. 23B) gering vermindert war. In der CD4+-Population, in der hemmende Einflüsse der von CD8+-Zellen sezernierenden Zytokine verhindert war, konnten beide Viren gleich gut replizieren. Beide Virusvarianten waren nicht in der Lage in der CD8+-Subpopulation zu replizieren.

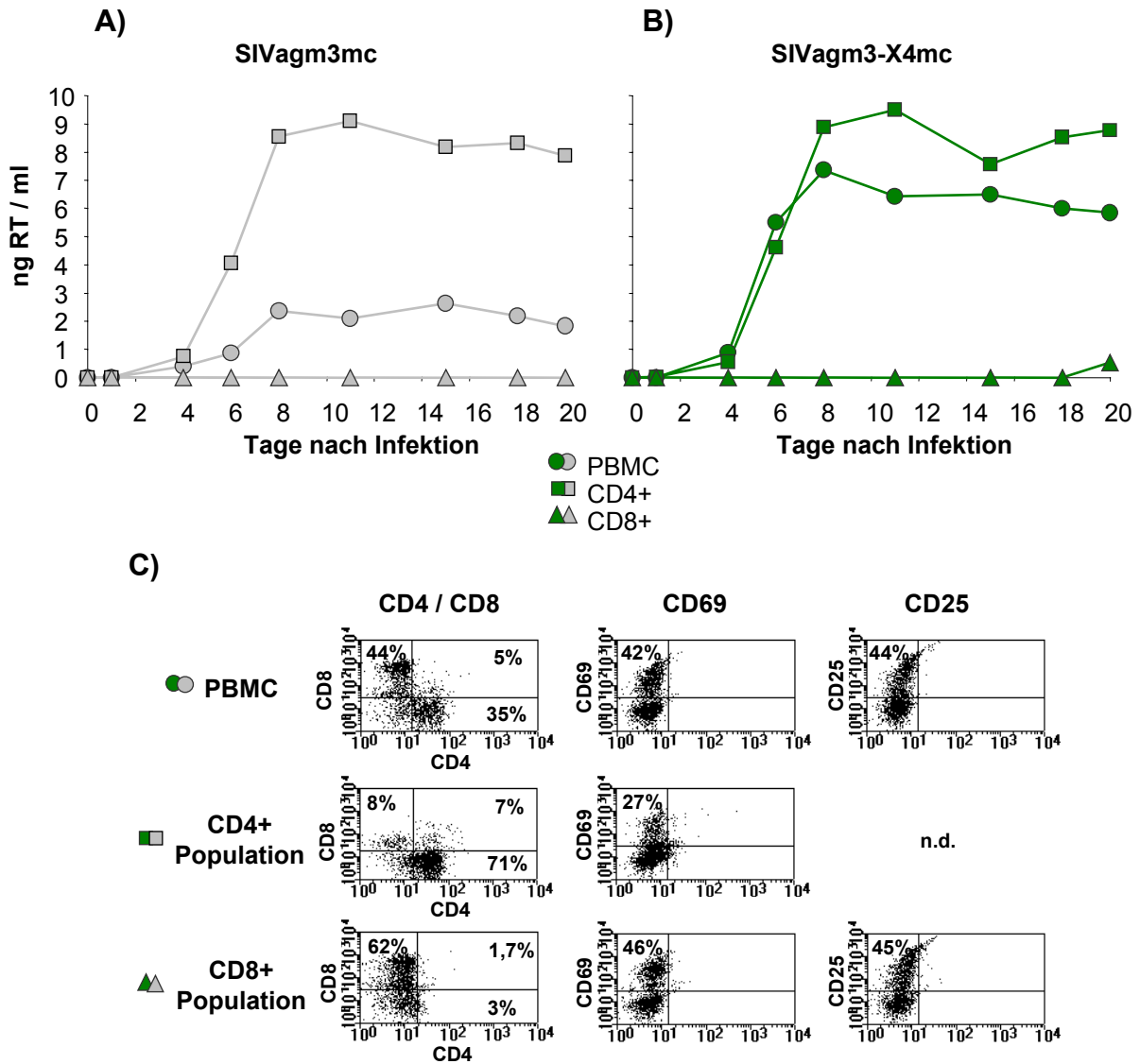


Abb. 23: Replikation in CD4+ und CD8+ Subpopulation der PBMC von NEM
 PBMC von NEM wurden mit Hilfe des MACS-Separierungssystems (α CD4-gekoppelte Beads) in CD4+ (Quadrate) und CD8+ (Dreiecke) Subpopulationen getrennt und mit PHA/IL2 stimuliert. Nach zwei Tagen erfolgte die Infektion der Gesamt-PBMC (Kreise) oder der separierten Populationen mit SIVagm3mc (A, grau) und SIVagm3-X4mc (B, grün) mit einer moi von 0,1. Der Nachweis der Infektion erfolgte über Messung der RT-Werte. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden die Zellen (eingegrenzt auf die Lymphozytenpopulation) auf Expression von CD4, CD8, CD69 und CD25 im FACS analysiert (C); n.d.: nicht durchgeführt.

3.4 Einfluß der veränderten Korezeptornutzung von SIVagm3-X4mc *in-vivo*

3.4.1 Infektion von Schweinsaffen

Nach Infektion von Schweinsaffen wurde der Einfluß der veränderten Korezeptornutzung von SIVagm3-X4mc auf Replikation und pathogenen Verlauf untersucht. Dazu wurden Schweinsaffen mit beiden Virusvarianten mit einem Titer von 1×10^6 TCID₅₀ intravenös infiziert. Zwei Schweinsaffen (NEM₂₃₂, NEM₇₃₃₇) wurden mit SIVagm3mc inokuliert und zwei mit SIVagm3-X4mc (NEM₂₃₆, NEM₆₅₀₂). Den Affen wurde wöchentlich bis zur vierten Woche nach Inokulation, dann zwei-wöchentlich bis zur achten Woche und danach monatlich Blut abgenommen und sie wurden auf Krankheitsanzeichen hin untersucht. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 26 Wochen (Abb. 24). Charakterisiert wurden Virusparameter, wirtsspezifische Parameter und die Eigenschaften von SIVagm3-X4mc nach *in-vivo* Replikation

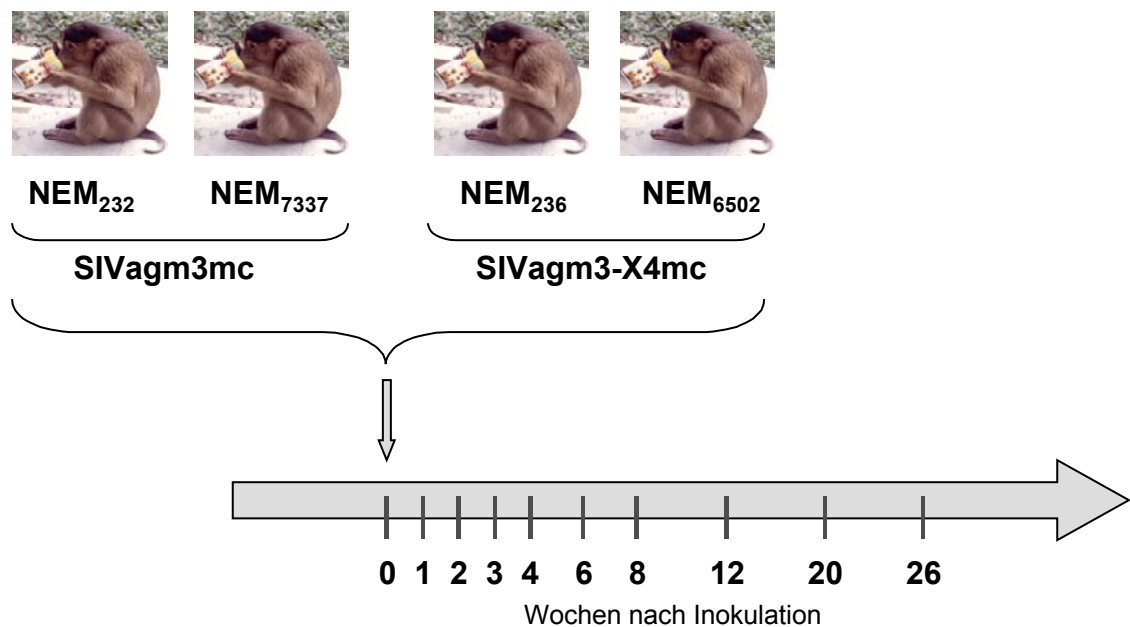


Abb. 24: Schema des Zeitraums der Blutentnahme nach Infektion von Schweinsaffen

3.4.1.1 Charakterisierung der Virusparameter

3.4.1.1.1 Virusbelastung der infizierten Schweinsaffen

Um die Infektionskinetik *in-vivo* zu charakterisieren, wurde die Virusbelastung und die Anzahl an produktiv infizierten Zellen in den infizierten Tieren gemessen. Der Verlauf der Plasmavirusbelastung wurde mittels quantitativer PCR bestimmt (Abb. 25 A). Die initiale Plasmavirämie konnte eine Woche nach Infektion in den SIVagm3mc infizierten Tieren und zwei Wochen nach Infektion in den SIVagm3-X4mc infizierten Tieren detektiert werden. Der Bereich der maximalen Virustiter betrug 6×10^4 (NEM₂₃₆) bis 3×10^6 (NEM₂₃₂) RNA Kopien / ml Plasma. Nach der initialen Virusbelastung folgte ein Absinken der Viruslast bis unter das Detektionslimit von 10^3 RNA Kopien / ml Plasma, wobei bei den mit dem Parentalvirus infizierten Tieren die Detektionsgrenze zwei Woche später erreicht wird als bei den SIVagm3-X4 infizierten Tieren. Die Anzahl der produktiv infizierten Zellen (Abb. 25 B), gemessen durch eine Kokultur mit C8166-Zellen, zeigte einen ähnlichen frühen Höchstwert von 191 (NEM₂₃₂) bis 8173 (NEM₂₃₆) infizierte Zellen / 10^6 PBMC und ein Absinken der Virusbelastung bis Woche 6 nach Infektion. Die Provirusbelastung wurde auch mittels quantitativer PCR bestimmt (Abb. 25 C). Es zeigte sich dabei ebenso einen initialen Höchstwert von 146 (NEM₆₅₀₂) bis 6661 (NEM₂₃₆) DNA Kopien pro 10^5 PBMC und nach 6 bis 12 Wochen ein Absinken bis unter das Detektionslimit von 10^2 DNA Kopien / 10^5 PBMC. Zusammenfassend kann man feststellen, daß eine initiale Virämie in mit beiden Virusvarianten infizierten Tiergruppen beobachtet wurde, gefolgt von einer chronischen Infektion. Allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Infektionsprofilen zwischen SIVagm3mc und SIVagm3-X4mc infizierten Affen.

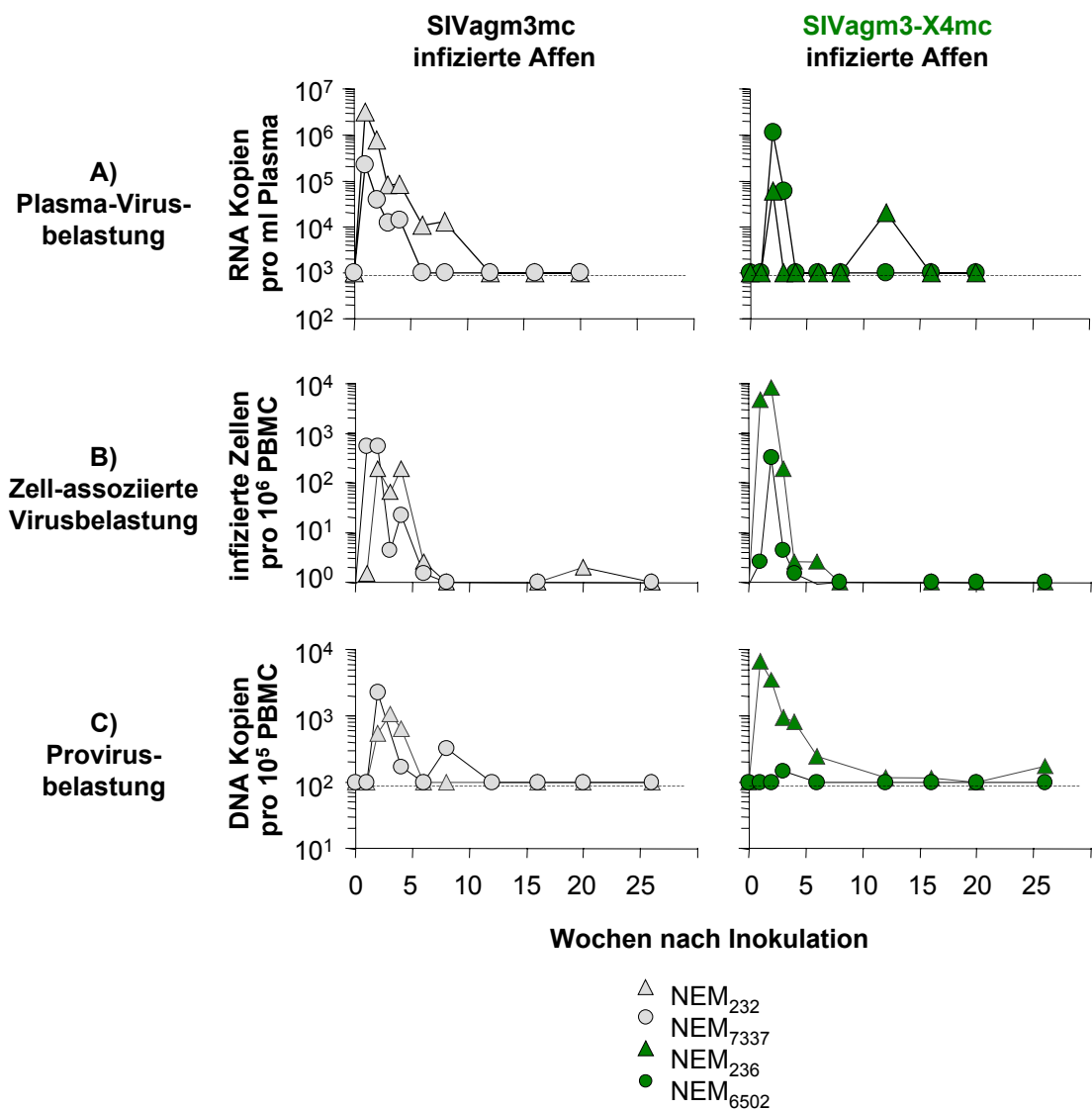


Abb. 25: Virusbelastung nach Infektion von Schweinsaffen
 SIVagm3mc infizierte Affen: NEM₂₃₂ (graues Dreieck), NEM₇₃₃₇ (grauer Kreis),
 SIVagm3-X4mc infizierte Affen: NEM₂₃₆ (grünes Dreieck), NEM₆₅₀₂ (grüner Kreis)

- A) Plasmavirusbelastung wurde gemessen in RNA Kopien / ml Plasma mit Hilfe der quantitativen Taqman RT-PCR. Das Detektionslimit des Assays beträgt 10^3 RNA Kopien / ml Plasma (gestrichelte Linie).
- B) Zellassoziierte Virusbelastung wurde gemessen in produktiv infizierte Zellen / 10^6 PBMC. Es wurden dabei limitierende Verdünnungen der PBMC auf C8166-T-Zellen durchgeführt und die Neuinfektion der C8166-Zellen im IPA gemessen.
- C) Provirusbelastung wurde gemessen in DNA Kopien / 10^5 PBMC. Das Detektionslimit betrug 10^2 DNA Kopien pro 10^5 PBMC (gestrichelte Linie).

3.4.1.2 Charakterisierung der Wirtsparameter

3.4.1.2.1 Bestimmung der CD4+/CD8+-Zellzahl

Während des Beobachtungszeitraumes von 14 Monaten zeigten weder die mit dem Parentalvirus infizierten Tiere noch die mit SIVagm3-X4mc infizierten Tiere klinische Erkrankungssymptome. Da die Messung der absoluten Anzahl an CD4+-Lymphozyten einen Hinweis auf eine SIV-Infektion gibt, wurden FACS-Analysen durchgeführt und die Expression der CD4+ und CD8+-T-Lymphozyten gemessen. Die absolute Anzahl der Lymphozyten wurde mit Hilfe des Differentialblutbildes ermittelt. Es ergab sich ein initialer Abfall der CD4 und CD8-positiven Lymphozyten im peripheren Blut von mit beiden Virusvarianten infizierten Tiergruppen (Abb. 26). Nach zwei bis vier Wochen nach Infektion erreichten die Werte wieder ein Niveau, das einem gesunden Tier entspricht. Diese CD4+-Werte lagen zwischen $1,5$ bis 2×10^3 (NEM₂₃₂), $2,7$ bis $3,6 \times 10^3$ (NEM₂₃₆), $0,8$ bis $1,1 \times 10^3$ (NEM₆₅₀₂) und 1 bis $1,5 \times 10^3$ (NEM₇₃₃₇). Es zeigte sich also kein Abfall der CD4+-Zellzahl.

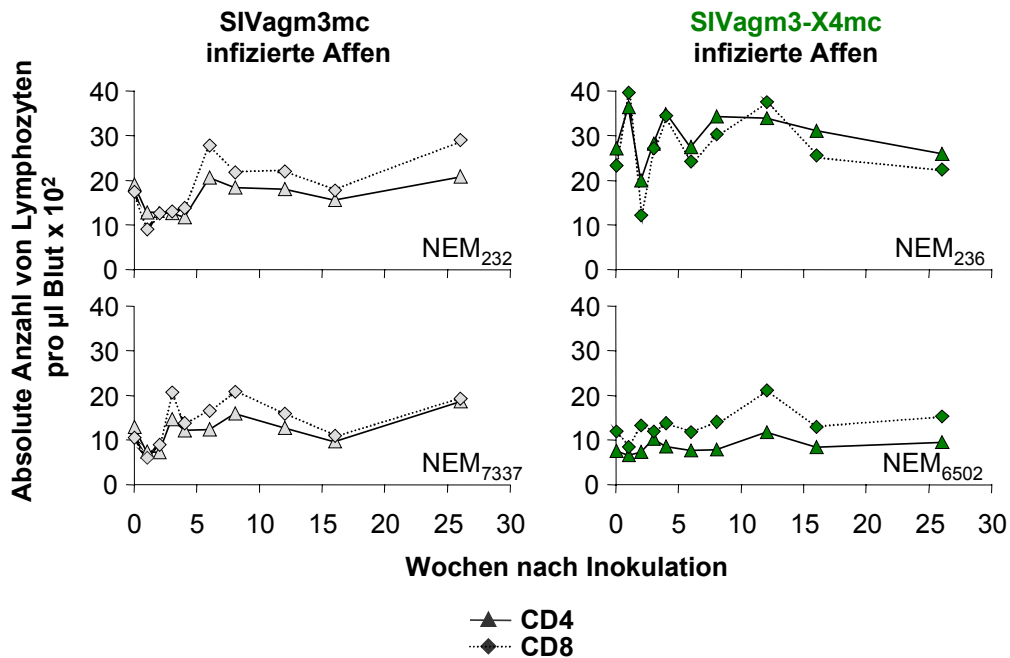


Abb. 26: Absolute Anzahl der CD4+ und CD8+-Lymphozyten der infizierten Affen
 Per FACS-Analyse wurde die Expression von CD4 (Dreiecke) und CD8 (Kreise) in der eingegrenzten Lymphozytenpopulation der PBMC der infizierten Affen nach verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Mit Hilfe des Differentialblutbildes wurde der Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten / µl Blut ermittelt.

3.4.1.2.2 Induktion von SIV und HIV-spezifischen Antikörpern

Um die SIV-gerichtete, humorale Immunantwort der infizierten Affen zu untersuchen, wurde ein ELISA durchgeführt, der spezifisch war gegen SIVagm3-Gesamtantigen. Wie in Abb. 27 zu sehen, konnte bei drei von den vier Tieren eine Serokonversion beobachtet werden. Diese drei Tiere (NEM₂₃₂, NEM₂₃₆ und NEM₇₃₃₇) zeigten eine Antikörperantwort während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Die maximalen Antikörpertiter, die dabei erreicht wurden rangieren von 6749 (NEM₂₃₂), 2307 (NEM₂₃₆) bis zu 18030 (NEM₇₃₃₇). Einer der Affen (NEM₆₅₀₂), der mit SIVagm3-X4mc infiziert worden war, serokonvertierte erst später (in Woche 16) und zeigte nur einen geringen Antikörpertiter von 145. Wahrscheinlich aufgrund des hohen Detektionslimits des selbst etablierten ELISAs konnte ein geringe Antikörperantwort (wie sie in dem Tier NEM₆₅₀₂ auftrat) nicht oder kaum nachgewiesen werden.

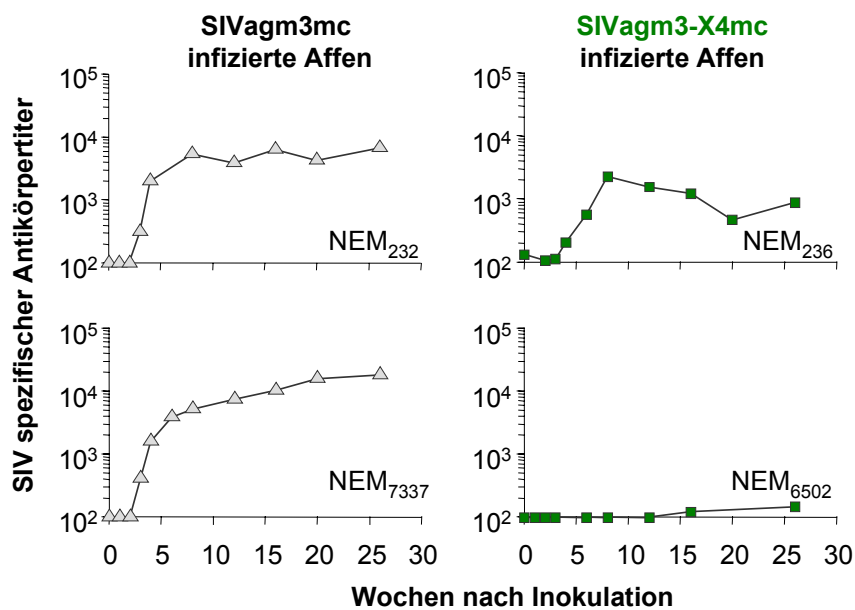


Abb. 27: SIV spezifische Antikörper
 Antikörper gerichtet gegen SIVagm3-Gesamtantigen wurden mittels ELISA detektiert. Der SIV spezifische Antikörpertiter entspricht der reziproken Serumverdünnung.

In einem Westernblot wurde untersucht, ob der im SIV_{agm3-X4mc} inserierte V3-Loop die Bildung von Antikörpern induzieren kann, die gegen HIV-1 gerichtet sind. Dazu wurden Seren der Affen vor und 12 Wochen nach Inokulation verwendet und auf ihre Spezifität gegen HIV-1 und HIV-2 getestet (Abb. 28). Dabei zeigte sich, daß alle Seren, die vor Infektion entnommen wurden, keine Reaktivität im Westernblot aufwiesen. Erst nach Inokulation (gemessen 12 wpi) entwickeln drei von vier Makakken (NEM₂₃₂, NEM₇₃₃₇, NEM₂₃₆) Antikörper, die gegen das Hüllprotein und das Transmembranprotein von HIV-2- gerichtet sind.

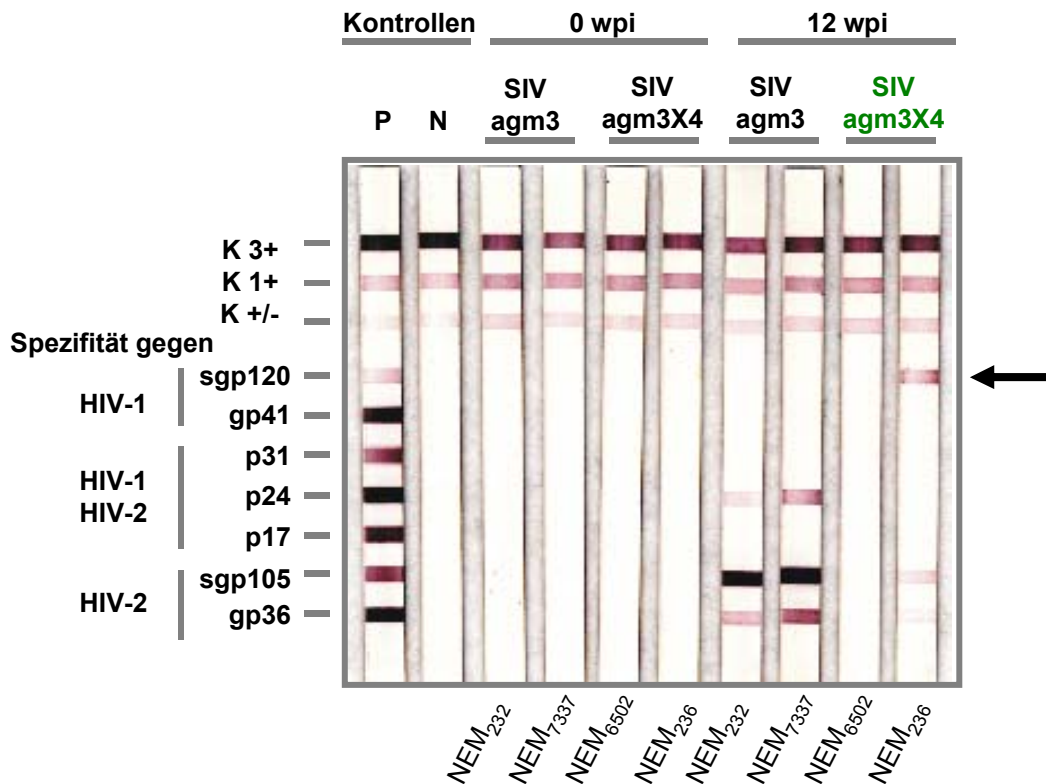


Abb. 28: Detektion von HIV-spezifischen Antikörpern

Western-Blot-Streifen wurden inkubiert mit Seren der infizierten Tiere der Zeitpunkte vor Infektion (0 wpi) und 12 wpi. Die auf den Streifen sich befindlichen Antigene sind spezifisch gegen HIV-1 und/oder HIV-2. Von oben nach unten sind aufgetragen: drei Kontrollproteine (K3+, K1+, K+/-) in verschiedenen Konzentrationen; das lösliche Hüllprotein gp120 und das Transmembranprotein gp41 (spezifisch für HIV-1); das Polyprotein Kapsid/Nukleokapsid p31, das Kapsid p24 und das Matrixprotein p17 (spezifisch für HIV-1 und HIV-2); das lösliche Hüllprotein gp105 und das Transmembranprotein gp36 (spezifisch für HIV-2). Außerdem wurden zwei Kontrollstreifen (Positivkontrolle P; Negativkontrolle N) mit entwickelt.

Hier kam es wahrscheinlich zu einer Kreuzreaktivität der SIV-spezifischen Antikörper gerichtet gegen HIV-2. Auch eine geringe Kreuzreaktivität gegen das Kapsidprotein kann in zwei Tieren, nämlich NEM₂₃₂ und NEM₇₃₃₇, gezeigt werden. Im Serum von NEM₆₅₀₂ konnten

in diesem Test keine Antikörper detektiert werden, was in Übereinstimmung steht mit der späten Serokonversion (siehe oben). Im Serum des zweiten Affen, der mit SIVagm3-X4mc infiziert worden war und eine frühe Serokonversion aufweist (NEM₂₃₆), können HIV-1 spezifische Antikörper gerichtet gegen das Oberflächenhüllprotein detektiert werden (Abb. 28, Pfeil). NEM₂₃₆ zeigt insgesamt einen schwächeren Antikörpertiter im Vergleich zu den beiden mit SIVagm3mc infizierten Makakken (Abb. 27 und 28), aber eine starke HIV-1-spezifische Antikörperantwort. Diese zeigt sich nicht in den mit SIVagm3mc infizierten Tieren. Somit wurde durch den Austausch des V3-Loops eine HIV-1 spezifische Antikörperproduktion in einem infizierten Tier induziert.

3.4.1.2.3 Induktion von SIV-neutralisierenden Antikörpern

Das Vorkommen von neutralisierenden Antikörpern gerichtet gegen SIVagm3mc oder SIVagm3-X4mc wurde in einem Neutralisationstest auf C8166-T-Zellen gemessen. Dabei zeigte sich, daß in den Seren von SIVagm3-X4mc infizierten Tieren und in den Seren eines SIVagm3mc infizierten Tieres (NEM₇₃₃₇) keine neutralisierende Aktivität gerichtet gegen SIVagm3mc detektiert werden konnte. Die Seren des zweiten Tieres, das mit SIVagm3mc infiziert war, (NEM₂₃₂) enthielten schwach neutralisierende Antikörper (Abb. 29 A). Dagegen zeigte sich eine hohe Neutralisation gegen SIVagm3-X4mc in allen Seren, sowohl von SIVagm3mc als auch von SIVagm3-X4mc infizierten Tieren. Die gemessenen Neutralisationstiter erreichten ein Plateau nach zwei bis drei Wochen nach Infektion und blieben stabil über den Beobachtungszeitraum. Die Höchstwerte reichten von $1,4 \times 10^5$ ND₅₀ in Sera von NEM₂₃₂, 1×10^5 ND₅₀ in NEM₇₃₃₇, 6×10^4 ND₅₀ in NEM₂₃₆ bis zu $6,4 \times 10^3$ ND₅₀ in NEM₆₅₀₂ (Abb. 29 B). Das zeigte, daß eine Infektion von Zellen mit SIVagm3-X4mc *in-vitro* sehr sensitiv ist im Bezug auf neutralisierende Antikörper, die sich sowohl in Sera von SIVagm3-X4mc infizierten Affen als auch in Sera von SIVagm3mc infizierten Tieren befinden. Dies zeigte ebenfalls, daß neutralisierende Antikörper durch beide Virusvarianten induziert werden.

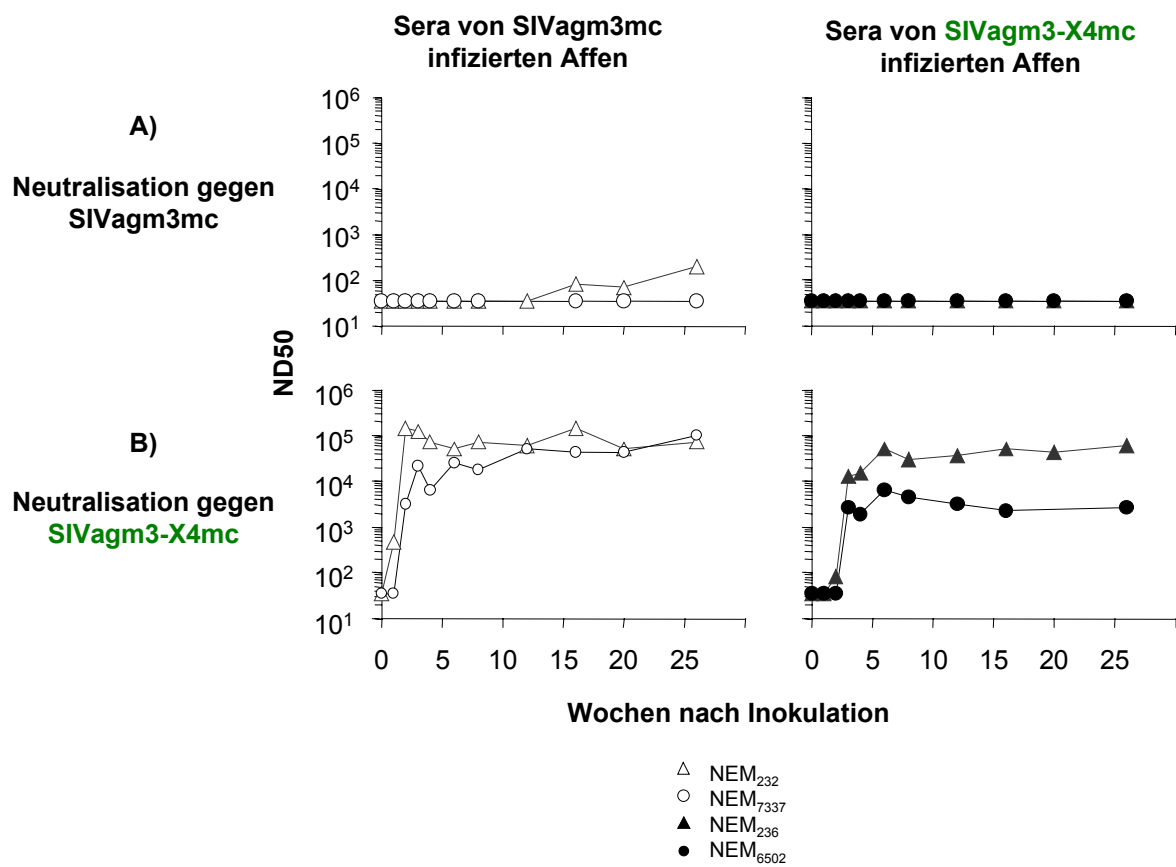


Abb. 29: Induktion von neutralisierenden Antikörpern in Sera von SIVagm3mc und SIVagm3-X4mc infizierten Makakken, die gerichtet sind gegen SIVagm3mc oder SIVagm3-X4mc

Neutralisation der Infektion mit SIVagm3mc (A) und mit SIVagm3-X4mc (B) durch Sera von NEM infiziert mit SIVagm3mc (NEM₂₃₂ [graues Dreieck], NEM₇₃₃₇ [grauer Kreis]) und mit SIVagm3-X4mc (NEM₂₃₆ [schwarzes Dreieck], NEM₆₅₀₂ [schwarzer Kreis]). Die Neutralisation wurde auf C8166-Zellen gemessen. Angegebene Neutralisationstiter (ND₅₀) bezeichnen die reziproke Serumverdünnung, bei der 50% der Zellen vor Infektion geschützt waren. ND₅₀-Werte unter dem Detektionslimit wurden willkürlich auf den Wert 35 gesetzt.

3.4.1.3 Eigenschaften von SIVagm3-X4mc *in-vivo*

3.4.1.3.1 Korezeptornutzung von SIVagm3-X4mc nach *in-vivo* Replikation

Um eventuelle potentielle Veränderungen in der Korezeptornutzung nach *in-vivo* Replikation auszuschließen, wurde Virus aus den infizierten Schweinsaffen isoliert durch Kokultivierung mit der suszeptiblen Zelllinie C8166. Die Korezeptornutzung dieser Isolate wurde getestet auf den GHOST-Zelllinien. Wie in Abb. 30 zu sehen, infizieren die Isolate, die aus den beiden mit SIVagm3mc infizierten Schweinsaffen stammen, hauptsächlich die CD4/CCR5, CD4/BOB oder CD4/BONZO-Zelllinien. Die Isolate, die aus den mit SIVagm3-X4mc infizierten Tieren stammen, nutzen zum Zelleintritt hauptsächlich den Korzeptor CXCR4 genauso wie das inokulierte Virus. Somit blieb die Korezeptornutzung der Virusvarianten auch nach *in-vivo* Replikation erhalten.

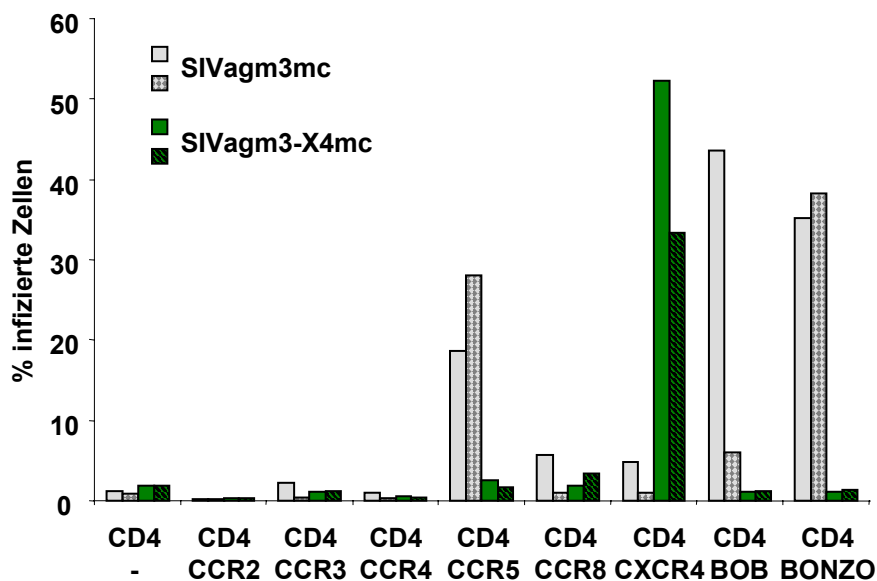


Abb. 30: Korezeptornutzung von Isolaten aus infizierten Schweinsaffen
 Virusisolate, erhalten durch Kokultivierung der PBMC aus infizierten Affen mit C8166-T-Zellen, wurden zur Infektion von GHOST-Zellen mit einer *moi* von 10 eingesetzt. Ein Isolat (grau) von NEM₇₃₃₇ infiziert mit SIVagm3mc wurde eine Woche nach Inokulation erhalten. Die folgenden drei Isolate wurden drei Wochen nach Inokulation erhalten: aus NEM₂₃₂ infiziert mit SIVagm3mc (grau kariert), aus NEM₂₃₆ (grün) und aus NEM₆₅₀₂ (grün gestreift) infiziert mit SIVagm3-X4mc.

3.4.1.3.2 Sequenzierung von SIVagm3-X4mc nach *in-vivo* Replikation

Um eventuelle potentielle Änderungen in der Sequenz des V3-Loops nach *in-vivo* Replikation zu untersuchen, wurde DNA aus PBMC der infizierten Schweinsaffen 26 Wochen nach Inokulation aufgereinigt und eine V3-Loop spezifische PCR durchgeführt. Das erhaltene Amplifikat wurde in das TOPO-TA-Cloning Vektorsystem eingefügt und nach Transformation in Bakterien wurden pro Schweinsaffe DNA aus 11 Bakterienklonen aufgereinigt und sequenziert. Es zeigte sich, daß alle 11 Sequenzen, die aus beiden mit SIVagm3mc infizierten Schweinsaffen stammen, alle 11 Sequenzen aus dem mit SIVagm3-X4mc infizierten NEM₂₃₆ und 10 von 11 Sequenzen, die von dem mit SIVagm3-X4mc infizierten NEM₆₅₀₂ stammen, der originalen V3-Loop Sequenz des entsprechenden inokulierten Virus entsprechen. Nur in einer aus 11 Sequenzen, die von NEM₆₅₀₂ stammen, kam es zu einem einzelnen Aminosäureaustausch von G→R an Position 29 des V3-Loops. Dieser Sequenzunterschied verändert die Nettoladung dieses SIVagm3-X4mc V3-Loops von +9 zu +10. Diese Daten zeigen, daß es zu kaum einer Veränderung im V3-Loop nach *in-vivo* Replikation gekommen ist und somit die Korezeptornutzung der jeweiligen Virusvarianten höchstwahrscheinlich auch 26 Wochen nach Inokulation erhalten blieb.

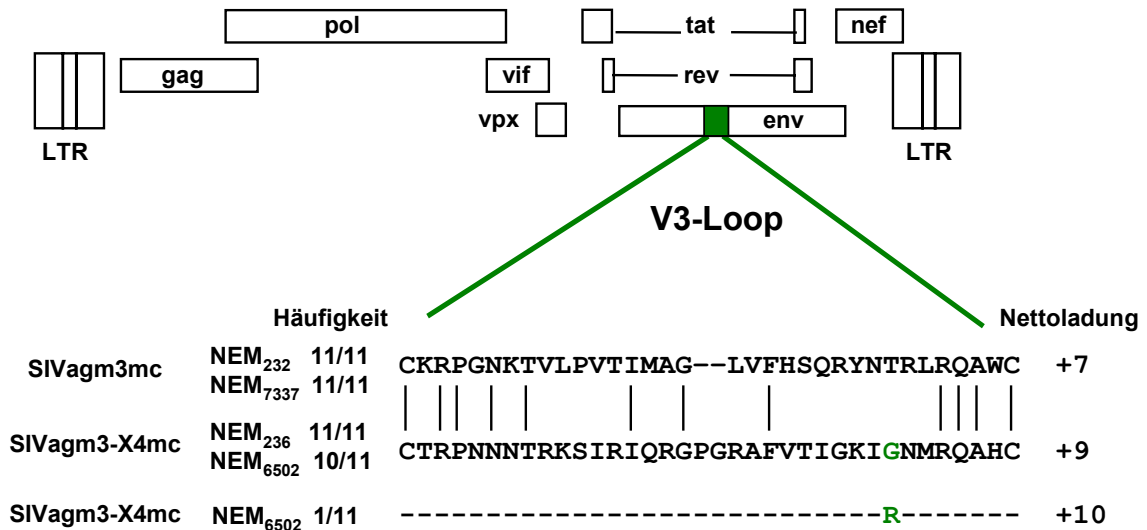


Abb. 31: Sequenzierung des V3-Loops 26 Wochen nach Inokulation
 DNA aus infizierten Schweinsaffen wurde aufgereinigt und benutzt zur Amplifizierung der V3-Loop enthaltenen genomischen Region. Nach Klonierung der Amplifikate in das TOPO-TA-Cloning Vektorsystem wurden jeweils 11 Klone pro Schweinsaffen-DNA sequenziert. Die Häufigkeit der erhaltenen Klone und die jeweilige erhaltene Sequenz ist dargestellt. Querstriche und Platzhalter zeigen Sequenzgemeinsamkeiten an. Grün hervorgehoben ist eine Aminosäurenänderung in einem sequenzierten Klon. Rechts ist die Nettoladung der sequenzierten V3-Loops angezeigt.

4 Diskussion

Der Zelleintritt von SIV wird hauptsächlich durch den Korezeptor CCR5, in seltenen Fällen durch den Chemokinrezeptor CXCR4 vermittelt (Chen *et al.*, 1997; Broder und Jones-Trower, 1999). Dagegen treten bei der HIV-1-Infektion initial CCR5-trope Virusvarianten auf und im Verlauf der Infektion ist das Auftreten von CXCR4-nutzenden Varianten assoziiert mit der Krankheitsprogression (Xiao *et al.*, 1998; Connor *et al.*, 1997). Zum Verständnis eines solchen sogenannten Korezeptorwechsels von CCR5 zu CXCR4 und der involvierten Mechanismen, welche der Pathogenese von Immundefizienzvirus-Infektionen begleiten, kann das Studium CXCR4-troper SIV-Varianten hilfreich sein.

4.1 Veränderung der Korezeptornutzung von SIV_{agm3mc} zu CXCR4

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein erfolgreicher Austausch eines V3-Loops bei einem molekular klonierten SIV durchgeführt, der zur Konsequenz hatte, daß dieses SIV den Korezeptor CXCR4 zum Zelleintritt nutzte. Der putative V3-Loop des SIV_{agm3mc} wurde durch den des CXCR4-tropen HIV-1 Isolats BH10 substituiert. Das resultierende Virus SIV_{agm3-X4mc} war replikationskompetent und nutzte zum Zelleintritt neben CD4 hauptsächlich den Chemokinrezeptor CXCR4.

Bisher wurden ausschließlich V3-Loops zwischen HIV-1 und HIV-2 (Mamounas *et al.*, 1995) oder zwischen verschiedenen HIV-1 Stämmen ausgetauscht. Die Gruppe um Sato (Sato *et al.*, 1999) substituierte den V3-Loop eines HIV-1 des Subtyps B mit V3-Loops von Virusvarianten des Subtyps E und erreichte damit die Übertragung der jeweiligen Korezeptorpräferenz der Viren, von denen die V3-Loops stammten auf die neuen HIV-1 Varianten (CCR5 oder CXCR4). Der Versuch jedoch, gezielt den Tropismus eines SIV auf CXCR4 umzustellen, war bisher noch nicht gelungen. Durch die Insertion des V3-Loops eines CXCR4-tropen HIV-1 wurde u. a. gezielt versucht, die Korezeptornutzung von SIV_{mac} zu verändern. Allerdings waren die resultierenden Viren nicht replikationskompetent (Kirchhoff *et al.*, 1994; Mamounas *et al.*, 1995). Auch das Einfügen basischer Aminosäuren in den V3-Loop des SIV_{mac}, welches die Gesamt-Nettoladung in diesem V3-Loop erhöhte, konnte nicht zur Nutzung von CXCR4 beitragen (Meister *et al.*, 2001). Bekannt ist, daß eine hohe Nettoladung des V3-Loops den T-Zelltropismus determiniert und eine niedrige Ladung bei M-tropen Viren zu finden ist (Shioda *et al.*, 1992). Darüber hinaus ist ein Wechsel der Korezeptornutzung von CCR5 zu CXCR4 mit einem Anstieg der Nettoladung des V3-Loops

assoziiert (Isaka *et al.*, 1999a). Bisher konnte die Korezeptornutzung nur dahingehend beeinflusst werden, daß zusätzlich zu CCR5 der Chemokinrezeptor BOB für den Zelleintritt benutzt wird. Erzielt wurde dies durch einzelne Aminosäureaustausche innerhalb des V3-Loops des SIVmac (Pohlmann *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit ist es damit erstmals gelungen, ein replikationskompetentes, CXCR4-tropes SIV zu generieren.

Des weiteren wird deutlich, daß ein funktioneller Austausch des V3-Loops zwischen zwei phylogenetisch entfernten Lentiviren, nämlich SIVagm und HIV-1, möglich ist. Der Austausch führte zu einem Wechsel der Korezeptornutzung von CCR5, BOB und BONZO (SIVagm3mc) zu CXCR4 (SIVagm3-X4mc). Andere Korezeptoren als CXCR4 wurden von SIVagm3-X4mc nicht mehr verwendet. Dies läßt vermuten, daß die putative V3 Region des SIVagm, deren Sequenz zu der des V3-Loops von HIV-1 homolog ist, eine für die Korezeptornutzung verantwortliche Determinante im SIVagm ist. Der ausgetauschte Bereich im gp130-SU des SIVagm befindet sich zwar C-terminal zu der dritten hypervariablen Region, kann aber aufgrund der Anwesenheit der flankierenden Cysteine und der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen funktionellen Daten als V3-Loop-Äquivalent bezeichnet werden (Muller *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 1994; Siegel *et al.*, 1992).

Die zur Bestimmung der Korezeptornutzung verwendeten GHOST-Zelllinien zeigen eine endogene geringe Expression von CXCR4 (Edinger *et al.*, 1998b). Dadurch kommt es bei Verwendung von CXCR4-tropen Virusvarianten zu einer geringen Infektion aller GHOST-Zelllinien. Zurückzuführen ist das auf die klonale Entstehung der verschiedenen Linien. Die Expression der Korezeptoren als auch die des CD4 ist in allen Linien verschieden hoch. Es wurde von Kozak *et al.* (1997) gezeigt, daß eine variierende Abhängigkeit verschiedener HIV-1-Stämme bezogen auf die Rezeptordichte des CD4 und der Korezeptoren besteht. Die Wechselwirkung der Zelloberflächenexpressionen von CD4 und CCR5 z.B. beeinflusst konzentrationsabhängig die Infektion mit HIV-1 (Platt *et al.*, 1998).

Zur Bestätigung der Experimente zur Korezeptornutzung wurden Inhibitionsexperimente auf humanen T-Zelllinien und PBMC von Schweinsaffen durchgeführt. Hierbei wurde der natürliche Ligand des CXCR4, SDF-1 α , verwendet, wodurch der Eintritt von CXCR4-tropen HIV-1 gehemmt wird (Bleul *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996). Die Hemmung beruht auf der Internalisierung des Rezeptors in Folge der Bindung des Liganden (Amara *et al.*, 1997). Die funktionelle Hemmung des Zelleintritts von SIVmnd(GB-1), dem einzig bekannten CXCR4-nutzenden SIV, wurde ebenfalls durch Infektionsversuche in Gegenwart von SDF-1 α gezeigt (Schols und De Clercq, 1998). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen eingesetzten SDF-Konzentrationen variierten um einen aus der Literatur bekannten Wert von 3,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Owen *et al.*, 2000). Es konnte eine konzentrationsabhängige Inhibition der Infektion des

SIVagm3-X4mc und nicht des SIVagm3mc beobachtet werden. Somit wurde eine eindeutige Nutzung von CXCR4 als Korezeptor für SIVagm3-X4mc definiert.

4.2 Korezeptornutzung von SIVagm

Kürzlich wurde beschrieben, daß ein primäres SIVagm-Isolat, wie auch andere Isolate von SIVstm und SIVsm, den Korezeptor CXCR4 zum Zelleintritt in GHOST-Zellen verwenden (Owen *et al.* 2000). Allerdings replizierten diese Isolate im Vergleich zu HIV-2 zu geringen Titern in den CD4+/CXCR4+-Zellen und zu normalen Titern in CD4+/CCR5+ exprimierenden Zellen. Außerdem führten Inhibitionsexperimente mit SDF-1 α , einem monoklonalem Antikörper gegen CXCR4 und zwei CXCR4-Antagonisten nur teilweise zur Blockierung der Infektion (Owen *et al.* 2000). Generell jedoch wird CXCR4 nicht als Korezeptor des SIVagm betrachtet. Zum Beispiel zeigte die Korezeptorspezifität zweier apathogener Klone von SIVagm, SIVagmSab1.4 und SIVagmTYO, eine Präferenz für CCR5, BOB und BONZO (Edinger *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 1997).

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde nach erfolgreicher Reisolierung eines SIV aus einer natürlich infizierten AGM in der hier beschriebenen Arbeit die Korezeptornutzung untersucht. Sowohl das Isolat, das aus einer gesunden AGM stammte, als auch zwei verschieden pathogene Virusklone, SIVagm9063 und SIVsmmPBj1.9, zeigten keine Nutzung von CXCR4 zum Zelleintritt. Beide SIVagm benutzten hauptsächlich CCR5 und BONZO, SIVsmmPBj1.9 nutzte zusätzlich BOB.

Die Beobachtung, daß es bei der Langzeit-Infektion von AGM zu keinem Wechsel der Korezeptornutzung von CCR5 zu CXCR4 kommt, stimmt mit den Ergebnissen in drei weiteren Publikationen überein. SIVmne-Varianten, die während des Verlaufs einer Erkrankung in Schweinsaffen entstanden, nutzten die Rezeptoren CCR5 und BOB genauso wie der zur Infektion eingesetzte Makrophagen-trope Virusklon, jedoch kam es zu keiner Veränderung der Spezifität zu CXCR4 oder einem anderen Korezeptor (Kimata *et al.*, 1999). Sequentielle Isolate aus acht Javaneraffen (*Macaca Fascicularis*), infiziert mit SIVsm, zeigten ebenso eine beständige Nutzung von CCR5 wie das Ausgangsvirus (Vodros *et al.*, 2001). SIVmac, erhalten aus vier Rhesusmakakken mit SAIDS-Symptomen, konnten auch nicht auf CXCR4 exprimierenden Zellen replizieren. Dies zeigt, daß eine CXCR4-Nutzung nicht nur bei molekularen Virusklonen, sondern auch bei Virusisolaten aus Affen sehr ungewöhnlich ist und in der Regel nicht vorkommt. Daher war es sinnvoll, ein CXCR4-tropes Virus zu generieren, wie in dieser Arbeit beschrieben, um den Einfluß einer veränderten Korezeptornutzung auf *in-vivo* Replikation und Pathogenese zu untersuchen.

Bemerkenswert ist auch die über 26 Wochen konstante Korezeptornutzung nach Infektion von Schweinsaffen sowohl mit SIVagm3mc als auch mit SIVagm3-X4mc. Das deutet darauf hin, daß eine *in-vivo* Nutzung von CXCR4 in Lymphozyten von Schweinsaffen auch über einen längeren Zeitraum möglich ist.

Es ist auffallend, daß SIV normalerweise nicht den Korezeptor CXCR4 nutzen, obwohl der Rezeptor in jeweiligen Affenzellen funktionell ist. CXCR4-Rezeptoren aus sowohl Rhesusaffen und Halsbandmangaben als auch aus AGM erlauben die Infektion von CXCR4-gängigen HIV-1 (Dumonceaux *et al.*, 1999; Marx und Chen, 1998; Chen *et al.*, 1998). Ein weiterer Beweis für die Funktionalität der CXCR4-Rezeptoren aus Affen geben SIV-HIV-Hybridviren, sogenannte SHIV. Das in Rhesusaffen AIDS auslösende SHIV(KU-2MC4), dessen Genom die *tat*-, *rev*-, *vpu*- und *env*-Gene von HIV-1 im genetischen Hintergrund von SIVmac enthält, ist CXCR4-trop (Liu *et al.*, 1999). Ein weiteres SHIV, SHIV_{SF162P}, in welchem ebenfalls die *tat*-, *rev*- und *env*-kodierenden Regionen im SIVmac korrespondierend zu HIV-1 substituiert wurden, ist CXCR4-spezifisch und induziert einen Verlust der intestinalen und peripheren CD4⁺-T-Zellen.

Für Korezeptorstudien ist es wichtig, Virus zu isolieren, ohne die Viren auf empfänglichen T-Zelllinien zu kultivieren. So wird vermieden, daß aus dem Viruspool einige Varianten durch Replikation in der Zelllinie selektioniert werden. Es wurden auch Methoden beschrieben, wie man Virus aus den PBMC von HIV-Patienten isolieren kann, trotz einer bis zu zwei Jahre andauernden Unterdrückung der Plasmavirämie bis unter 50 Kopien pro ml Plasma aufgrund einer HAART-Behandlung. Dabei werden die CD8⁺-Zellen der HIV-seronegativer und HIV-positiver Donoren depletiert. Danach werden die CD4⁺-Lymphozyten mit α CD3 und α CD28-Antikörpern stimuliert (Wong *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde diese Methode abgewandelt. Es zeigte sich, daß sowohl die CD8⁺-Depletion, als auch die Stimulierung mit TPA/Ionomycin bei Schweinsaffen-PBMC die Virusisolierung begünstigt.

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung von Korezeptorstudien stellen hohe Titer der isolierten Viren dar. Diese erreicht man nicht zwangsläufig durch die Isolierung mit Hilfe von PBMC. In einem Falle konnte aus einer natürlich infizierten AGM ein Isolat mit hohem Titer erhalten werden. In früheren Publikationen konnten aus natürlich infizierten AGM sogar durch Kokultivierung mit der T-Zelllinie Molt4.8 nur Titer von $10 \text{ TCID}_{50} / 10^6 \text{ PBMC}$ erreicht werden (Hartung *et al.*, 1992). Nach Infektion der Schweinsaffen mit SIVagm3mc oder SIVagm3-X4mc konnten Isolate mit genügend hohen Titern durch Kokultivierung mit einer T-Zelllinie isoliert werden. Die Isolate wiesen den gleichen Tropismus auf wie die inokulierten Viren, gezeigt durch Infektion von Indikatorzelllinien wird durch Sequenzierung

des V3-Loops. Somit wurde trotz der Verwendung der T-Zelllinie zur Isolierung die Korezeptorspezifität nicht beeinflusst.

Die Sequenzierung 26 Wochen nach Inokulation ergab bei allen sequenzierten Klonen bis auf eine Ausnahme die Originalsequenz des jeweiligen inokulierten Virus. In einem Klon aus einem SIVagm3-X4 infizierten Tier zeigte sich ein Aminosäureaustausch, der insgesamt die Nettoladung des V3-Loops von +9 auf +10 erhöhte. Da eine hohe Nettoladung mit dem CXCR4-Tropismus korreliert (Isaka *et al.*, 1999), kann man davon ausgehen, daß auch ein Isolat mit dieser Sequenz seine CXCR4-Spezifität erhielt. Somit blieb die Korezeptornutzung auch nach *in-vivo* Propagierung konstant.

4.3 Replikation von SIVagm3-X4mc in PBMC

SIVagm3-X4mc replizierte in aktivierten PBMC von Schweinsaffen und AGM *in-vitro*. Darüber hinaus war das Virus im Gegensatz zum Wildtypvirus SIVagm3mc in der Lage, in nicht exogen stimulierten PBMC von Schweinsaffen und AGM zu replizieren. Da beide Viren sich nur in den Aminosäuren des V3-Loops unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, daß SIVagm3-X4mc ein intrazelluläres Signal über den Chemokinrezeptor CXCR4 auslöst, welches in der Konsequenz die Replikation von SIVagm3-X4mc antreibt.

Die folgenden drei Punkte sprechen für eine mögliche Theorie, warum die Virusreplikation in nichtstimulierten PBMC durch SIVagm3-X4mc angetrieben werden könnte.

- (I) Frisch isolierte, nicht stimulierte primäre CD4+-Lymphozyten befinden sich zu 98% in der G₀/G₁-Phase und zu etwa je 1% in der S und G₂-Phase des Zellzyklus (Spina *et al.*, 1995), können aber *in-vitro* normalerweise keine produktive Retrovirusinfektion gewährleisten (Stevenson *et al.*, 1990). *In-vivo* könnte der Kontakt mit MHC-Komplexen zu einer geringen Stimulierung führen, welche die Zellen nicht zur vollen Aktivierung treibt, aber den Status der Zelle so verändert, daß auch in ruhenden Zellen retrovirale Replikation zu geringen Titern unterstützt wird (Zhang *et al.*, 1999). Die Progression des Zellzykluses von G_{1a} zu G_{1b} ist essentiell für die Vervollständigung der reversen Transkription (Korin und Zack, 1998) und dem nukleären Import des Präintegrationskomplexes in den Kern, der noch in der G_{1b}/S-Phase stattfindet (Bukrinsky *et al.*, 1992). Da sich die meisten Zellen unstimulierter PBMC in der G₀/G₁-Phase befinden, kann eine Virusreplikation nur durch Stimulierung der Vervollständigung der reversen Transkription und / oder des Kerntransports stattfinden. Eine Integration ist nicht unbedingt nötig, da gezeigt wurde, daß auch eine selektive Transkription von *nef* und *tat* vor der Integration stattfindet und dies zu einer

- gesteigerten T-Zell-Aktivierung in ruhenden Zellen und damit viralen Replikation führt (Wu und Marsh, 2001).
- (II) Von Chemokinrezeptoren ausgehende Signale spielen eine Rolle bei Ereignissen, die einem Viruseintritt folgen und die für eine weitere Replikation nötig sind (Chackerian *et al.*, 1997). Zum Beispiel generierte ein Chemokin-vermitteltes Signal den notwendigen Stimulus, welcher den vollständigen Replikationszyklus in Makrophagen und die Replikation eines CCR5-nutzenden Virus erlaubte (Arthos *et al.*, 2000). Des Weiteren werden durch das Ansteuern verschiedenartiger Chemokinrezeptoren Signalwege unterschiedlich stark aktiviert, was den Aktivierungsstatus der Zelle verändern kann und in der Konsequenz auch die Virusreplikation fördern kann (Popik und Pitha, 2000; Liu *et al.*).
- (III) Eine andere Erklärung wäre eine so starke Aktivierung der Zelle durch das Virus, so daß auch Proliferation stattfindet. Bei dem akut pathogenem SIVsmmPBj1.9 wurde gezeigt, daß durch das Virus die IL2, TNF α und IL6-Synthese gesteigert wurde und daraufhin die Zellen zur Proliferation getrieben wurden (Fultz, 1991; Schwiebert und Fultz, 1994; Whetter *et al.*, 1998).

Potentielle Zielzellen in nichtstimulierten PBMC von AGM oder NEM sind für SIVagm3mc und SIVagm3-X4mc vorhanden. Sowohl der Rezeptor CCR5 als auch CXCR4 wird exprimiert. Die Expression von CCR5 ist zwar geringer als von CXCR4, aber der Unterschied ist nicht so signifikant wie im humanem System: durchschnittlich sind 64% der humanen CD4+-T-Zellen CXCR4-positiv und nur 6,5% CCR5-positiv (Ostrowski *et al.*, 1998). Da auf humanen PBMC auch der Korezeptor BONZO zu finden ist (Sharron *et al.*, 2000), kann man davon ausgehen, daß auch auf PBMC von Schweinsaffen BONZO exprimiert wird, aber zu welchen Prozentsatz bleibt unklar, da ein geeigneter Antikörper leider noch nicht erhältlich ist.

Das Wildtypvirus SIVagm3mc replizierte in Gesamt-PBMC zu niedrigeren Titern und leicht verzögert im Vergleich zu SIVagm3-X4mc. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß weniger Zielzellen für SIVagm3mc vorhanden sind als für SIVagm3-X4mc (siehe obigen Abschnitt). Eine andere Erklärung wäre, daß von CD8+-T-Zellen sezernierte Chemokine (Rantes, MIP-1 α und MIP-1 β) (Cocchi *et al.*, 1995) die Replikation des CCR5-tropen SIVagm3mc hemmen. Die Replikationsstudie auf der CD4+ und CD8+-Subpopulation der PBMC von NEM zeigt, daß ohne den hemmenden Einfluß der CD8+-Population beide Viren gleich gut replizieren. Somit sind für beide Viren gleich viele Zielzellen vorhanden, sie werden aber unterschiedlich supprimiert. Auch in AGM wurde gezeigt, daß bei Trennung der Populationen SIVagm in den CD4+-T-Zellen besser replizieren kann als in Gesamt-PBMC. Erklärt wurde das durch die

Sekretion eines von CD8⁺-T-Lymphozyten Virus-supprimierenden Lymphokin (Ennen *et al.*, 1994).

Kürzlich zeigte eine Studie mit verschiedenen SIVmac Stämmen, daß eine Assoziation besteht zwischen einem Neutralisations-sensitiven Phänotyp, dem Wachstum in Makrophagen und einer zunehmenden Fähigkeit CD4⁺-unabhängig zu replizieren (Means *et al.* 2001). Der V3-Loop war dabei das Ziel der neutralisierenden Antikörper. Eine andere Publikation beschreibt eine Verknüpfung von Sensitivität für Neutralisation, CD4-Unabhängigkeit und der Exposition des CD4-induzierten Epitops im HIV-1-*env*, wie es durch ein CXCR4-tropes HIV-1 vermittelt wurde (Edwards *et al.* 2001). *In-vitro* konnten auch CXCR4-trope HIV-1 und HIV-2-Varianten generiert werden, die CD4 unabhängig replizierten, wahrscheinlich durch die gesteigerte Exposition der Chemokinrezeptor-Bindungsstelle (Hoxie *et al.*, 1998). Da in dieser Arbeit durch das SIVagm3-X4mc neutralisierende Antikörpern detektiert werden konnten im Gegensatz zu SIVagm3mc und wahrscheinlich der V3-Loop oder benachbarte Regionen das Ziel dieser Antikörper darstellt, war es interessant, zu überprüfen, ob SIVagm3-X4mc CD4 unabhängig replizieren kann. Wie sich zeigte, konnte weder das Wildtypvirus noch SIVagm3-X4mc in der CD8⁺-Subpopulation von PBMC von NEM replizieren. Für ein SIVagm-Isolat wurde schon gezeigt, daß eine Replikation in CD4-negativen Zelllinien vorkommt (Werner *et al.*, 1990). In dieser Arbeit allerdings wurden die Replikationsstudien in Subpopulationen von PBMC durchgeführt. Man kann aber ausschließen, daß die CD8⁺-Zellen einen negativen Einfluß auf die Replikation des CXCR4-tropen Virus ausüben, da trotz der konstitutiven Expression von SDF-1 in den meisten Geweben die CD8⁺-Zellen sehr geringe Mengen an SDF-1 mRNA enthalten. (Lacey *et al.*, 1997).

Somit konnte die Replikationsfähigkeit von SIVagm3-X4mc in PBMC von Schweinsaffen und AGM, sogar in nicht-stimulierten Zellen, *in-vitro* nachgewiesen werden. SIVagm3-X4mc replizierte zu höheren Titern als SIVagm3mc in Gesamt-PBMC, aber zu gleichen Titern in CD4⁺-T-Zellen. Eine Replikation in CD8⁺-T-Zellen konnte mit keinem der beiden Virusklone beobachtet werden.

4.4 Replikation und Apathogenität von SIVagm3-X4mc *in-vivo*

SIVagm3-X4mc replizierte *in-vivo* in Schweinsaffen und die Korezeptorspezifität blieb auch während des Beobachtungszeitraumes von 26 Wochen erhalten. Das deutet darauf hin, daß CXCR4 von Schweinsaffen als ein relevanter Korezeptor für den HIV-1 V3-Loop von SIVagm3-X4mc dienen kann. Es wurde bereits gezeigt, daß der CXCR4-Korezeptor von Rhesusaffen den Eintritt von HIV-1 gewährleistet (Marx und Chen, 1998). Der Vergleich der Aminosäuresequenz des Korezeptors CXCR4 von Rhesusaffen und Schweinsaffen zeigt keine Unterschiede (Abb. 32). Daher ist die Nutzung dieses Chemokinrezeptors *in-vivo* in Schweinsaffen sehr wahrscheinlich.

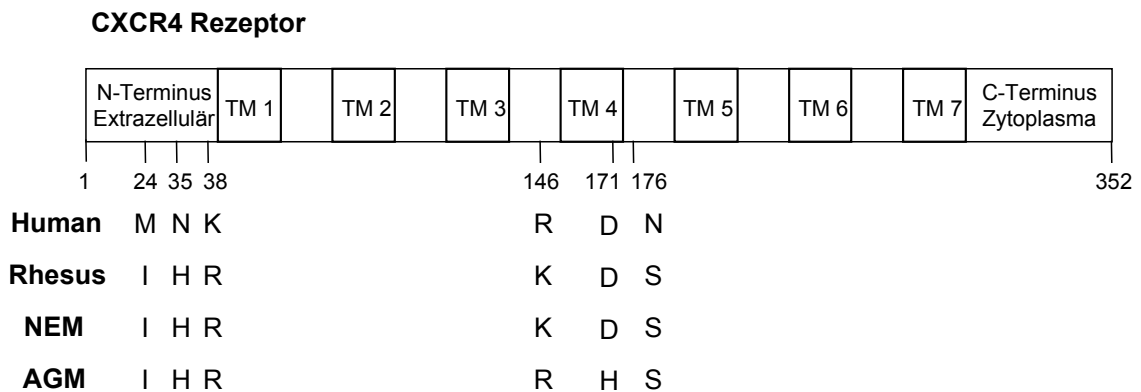


Abb. 32: Sequenzunterschiede des CXCR4-Rezeptors verschiedener Spezies.

Schematische Darstellung des CXCR4 Rezeptors (Aminosäure 1 bis 352) mit sieben Transmembrandomänen (TM) wie angezeigt. Die Ziffern beziehen sich auf die Position der unterschiedlichen Aminosäuren zwischen dem CXCR4 Rezeptors aus Mensch (Human: EMBL: AF025375) aus Rhesusaffen (Rhesus: *Macaca mulatta*; EMBL: AF001928), aus Schweinsaffen (NEM: *Macaca nemestrina*, EMBL: AF172226, AF172192) und Afrikanischer Grüner Meerkatze (AGM: *Chlorocebus aethiops*, EMBL: AB015943).

Die Kinetiken der Virusbelastungen der Schweinsaffen, die experimentell mit SIVagm3mc oder SIVagm3-X4mc infiziert wurden, unterschieden sich nicht signifikant. Bei allen Tieren ergab sich ein anfängliche hohe Virusbelastung gemessen als Plasmavirus- oder als Provirusbelastung gefolgt von einem Abfall auf Werte knapp überhalb oder unterhalb der Nachweisgrenze. Auch ein initialer Anstieg der Anzahl produktiv infizierter Zellen im Blut konnte bei allen Affen gezeigt werden. Das steht in Übereinstimmung mit einer von Beer *et al.* beschriebenen experimentellen Infektion von AGM mit dem Moleklarklon SIVagm3mc

(Beer *et al.*, 1997). Ebenso wurde ein anfänglicher Höchstwert der Plasmavirusbelastung und der zellassozierten Virusbelastung gemessen. Die Höchstwerte des Anteils produktiv infizierter Zellen beliefen sich dabei auf 56 bis zu 7029 infizierte Zellen pro 10^6 PBMC. Vier bis 24 Wochen nach Inokulation konnte infektiöses Virus aus PBMC detektiert werden. Danach konnte kein Virus mehr isoliert werden (Beer *et al.*, 1997). Werte in ähnlicher Höhe konnten auch bei den in dieser Arbeit infizierten Schweinsaffen bestimmt werden. Auch bei mit dem pathogenem SIVagm9063 infizierten Schweinsaffen zeigte sich ein anfänglich hoher Plasmaspiegel, der je nach Individuum 2 bis 40 Wochen nach Inokulation nicht mehr nachweisbar war (Hirsch *et al.*, 1995). Die Provirusbelastung mit dem Moleklarklon SIVagm3mc infizierter AGM war nach längerer Zeitspanne (1 bis 3 Jahre) sehr gering, nämlich 2,1 bis 5,1 DNA-Kopien pro 10^5 PBMC und ähnelte der von asymptomatischen HIV-1 infizierten Patienten (Beer *et al.*, 1996). In Übereinstimmung damit fällt in vorliegender Studie die Provirusbelastung nach sechs bis 15 Wochen nach Inokulation auch bis unter die Detektionsgrenze von 100 Kopien pro 10^5 PBMC. Die Schweinsaffen waren aber persistend infiziert, da auch nach 26 Wochen mittels PCR die für den V3-Loop spezifisch kodierenden Virusgenomfragmente nachgewiesen werden konnte.

Die absolute Anzahl der CD4+-T-Lymphozyten aller vier infizierten Schweinsaffen blieb im Rahmen dessen, was bei gesunden Tieren beobachtet wird. Es kam zu keinem Abfall der CD4+-T-Zellen. Die Anzahl variiert bei Schweinsaffen etwa zwischen 1000 und 2500 CD4+-Zellen pro μ l Blut (Hirsch *et al.*, 1995), je nach Alter der Tiere. Jungtiere besitzen einen viel höheren Anteil und CD4+-T-Zellen an Gesamt-T-Lymphozyten. Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+-Zellen in Rhesusaffen ist bei Neugeborenen mit 3,5 : 1 höher als bei Erwachsenen (0,7 : 1) (DeMaria *et al.*, 2000).

Der Korezeptorwechsel veränderte nicht die Pathogenität des Virus. SIVagm3-X4mc blieb apathogen wie das Wildtypvirus. Eine Infektion mit SIVagm3mc verläuft sowohl im natürlichen Wirt als auch im heterologen Wirt, dem Schweinsaffen, apathogen (Baier *et al.*, 1989). Dagegen ist die pathogene Replikation von HIV-1 im Mensch durch einen Korezeptorwechsel von CCR5 zu CXCR4 charakterisiert. Verstärkt wirkt das noch dadurch, daß durch die Stimulierung der Zellen, d.h. Proliferation und dadurch verstärkte Virusreplikation, die Expression des Rezeptors CXCR4 hochreguliert wird. Alleine die Fähigkeit durch α CD28-Antikörper die Expression von CXCR4 in ruhenden und aktivierten CD4+T-Zellen zu erhöhen, könnte einen relevanten Mechanismus für die Progression des Krankheitsverlaufs darstellen, da verstärkt Zielzellen für CXCR4-trope Viren vorhanden sind (Secchiero *et al.*, 2000). In humanen PBMC wurde außerdem ein höherer Prozentsatz von Lymphozyten mit exprimierten CXCR4-Rezeptor im Vergleich zu CCR5 gefunden (Lee *et al.*, 1999). Ferner ist die Expression von CCR5 vor allem auf Gedächtnis-Lymphozyten

(CD45RO⁺) und die von CXCR4 auf naiven Lymphozyten (CD45RO⁻) begrenzt (Bleul *et al.*, 1997). Diese Verlagerung der Zielzellpopulation auf unterschiedliche Lymphozyten-Subpopulationen könnte einen Einfluß auf die Krankheitsprogression ausüben. Auch in mit einem CCR5-tropen SIV infizierten Rhesusaffen waren die CCR5-positiven Gedächtnis-Lymphozyten selektiv eliminiert in hauptsächlich allen lymphoiden Geweben; die verbleibenden CD4⁺-Zellen entsprachen dem naiven Phänotyp und exprimierten CXCR4 (Veazey *et al.* 2000). Somit wäre für ein CXCR4-tropes Virus ein Potential an Zielzellen vorhanden. Zusätzlich zeigt das Verteilungsmuster von Korezeptoren in Rhesusaffen einige Unterschiede: z. B. exprimieren Thymozyten und Neuronen einen hohen Anteil an CXCR4 und nicht CCR5 (Zhang *et al.*, 1998). Obwohl angenommen werden kann, daß SIVagm3-X4mc verschiedene Zielzellen infiziert, evtl. eine Verlagerung der Zielzellpopulation oder variierender Gewebe veranlaßt, läßt diese Untersuchung vermuten, daß die Korezeptornutzung und damit involvierend unterschiedliche Zielzellen nicht die alleinige Determinante für virale Pathogenese in diesem apathogenem Modellsystem (SIVagm in AGM) darstellt.

In Rhesusaffen infiziert mit pathogenen SHIV, die entweder CCR5 oder CXCR4-trop sind, zeigte sich trotz vergleichbarer Werte an viraler Replikation ein deutlich unterschiedliches Ergebnis: das CCR5-spezifische SHIV zeigte im Gegensatz zum CXCR4-spezifischen SHIV einen dramatischen Verlust an intestinalen CD4⁺-T-Zellen, wohingegen eine dramatische Abnahme beim CXCR4-tropen SHIV vorkam und nur eine allmähliche Abnahme von peripheren CD4⁺-T-Zellen bei dem CCR5-tropen Virus (Harouse *et al.*, 1999). Dies korreliert auch mit dem im hohen Prozentsatz an CCR5-exprimierenden Gedächtnis-T-Zellen im GALT ("gut associated lymphoid tissue", Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe) (Veazey *et al.* 2000; Bleul *et al.*, 1997). Darin zeigt sich, daß der Gewebetropismus beeinflusst wird durch die Korezeptorexpression und damit auch Einfluß nehmen könnte auf die virale Pathogenese, aber nicht die alleinige Determinante für virale Pathogenese ist.

Eine Interaktion von verschiedenen Faktoren spielen wahrscheinlich eine Rolle bei Krankheitsauslösung und Progression. Wirtsspezifische Determinanten (Immunsystem) virusspezifische Determinanten (Genomaufbau, spezifische akzessorische Gene) und Wirt-Virus-spezifische Interaktionen (Replikationsfähigkeit in distinkten Zellpopulationen z. B. aufgrund des Aktivierungsstatus / Rezeptorexpression) bilden vermutlich ein komplexes Zusammenspiel (Whetter *et al.*, 1999).

4.5 Immunantwort

Alle infizierten Tiere zeigten eine Serokonversion und eine SIV-spezifische humorale Immunantwort über den gesamten Beobachtungszeitraum. Die Antikörpertiter gegen Gesamt-SIVagm-Antigen waren bei den SIVagm3-X4mc infizierten Tieren geringer als bei den mit SIVagm3mc infizierten Schweinsaffen und bei einem Tier wenig über der Nachweisgrenze. Dieses Tier zeigte auch erst ab Woche 12 nach Inokulation einen positiven Titer. Im Vergleich zu einer SIVagm3mc-Infektion in AGM lagen die Werte allerdings im normalen Rahmen (Beer *et al.*, 1997). Die in dieser Publikation beschriebenen Titer lagen zwischen unter 100 bis 1000.

HIV-1-spezifische Antikörper gerichtet gegen den V3-Loop konnten in einem mit SIVagm3-X4mc infizierten Schweinsaffen nachgewiesen werden. Das zweite Tier, das mit SIVagm3-X4mc infiziert worden war, zeigte insgesamt einen geringen Antikörpertiter und eine späte Serokonversion, so daß eventuell vorhandenen HIV-1-spezifische Antikörper nicht nachweisbar waren.

Ein unerwartetes Ergebnis war der Nachweis auffallend hoher Titer neutralisierender Antikörper ausschließlich gegen SIVagm3-X4mc in Seren beider infizierten Tiergruppen, unabhängig davon ob die Schweinsaffen mit SIVagm3mc oder mit SIVagm3-X4mc infiziert worden waren. Das bedeutet, daß die neutralisierenden Antikörper nicht direkt gegen den V3-Loop gerichtet sein können, sondern gegen Regionen, die erst durch den Austausch des V3-Loops zugänglich wurden, womöglich aufgrund von Konformationsänderung. Kürzlich wurde beschrieben, daß das Env eines CXCR4-tropen, CD4-unabhängigen HIV-1 in einem teilweise getriggerten Zustand existiert, in dem die Korezeptorbindungsstelle exponiert daliegt und funktionell ist, und diese Exposition in einem Neutralisations-sensitiven Phänotyp resultiert (Hoffman *et al.*, 1999). Die Resistenz von Primärisolaten verglichen mit T-Zelllinien-adaptierten Stämmen (TCLA) gegen HIV-1 positive Sera scheint auf die Struktur des gp120-SU zu basieren. Die CD4-Bindungsstelle von Primärisolaten ist stärker maskiert durch den V1/V2 Loop als die von TCLA-Viren (Parren *et al.*, 1999). Daher neigt das gp120-SU von TCLA-Viren mehr zu einem "offenen" Zustand, der V3-Loop wäre stärker exponiert. Aber diese Unterschiede scheinen nicht abhängig zu sein von der Korezeptornutzung der Viren (LaCasse *et al.*, 1998; Montefiori *et al.*, 1998; Trkola *et al.*, 1998). Dies läßt vermuten, daß neutralisierende Antikörper gerichtet gegen SIVagm3-X4mc auf die Struktur des chimären Virus basieren, vor allem auf die stabile Exposition der KorezeptorBindungsstelle, und nicht auf die Korezeptorpräferenz.

Der Nachweis hoher Neutralisationstiter induziert durch SIVagm3mc und SIVagm3-X4mc, aber nur nachweisbar mit SIVagm3-X4mc, ist einzigartig.. In AGM infiziert mit SIVagm3 konnten keine neutralisierende Antikörper detektiert werden (Norley *et al.*, 1990). In Sera von natürlich infizierten AGM wurden geringe Titer neutralisierender Antikörper detektiert abhängig vom Virusisolat und der Zielzelle, die in dem Test benutzt wurde (Gicheru *et al.*, 1999). Daher könnten diese früheren Beobachtungen irreführend sein und revidiert werden durch ein Testsystem mit SIVagm3-X4mc.

5 Zusammenfassung

Bei einer HIV-1-Infektion ist die Krankheitsprogression zum Vollbild AIDS mit dem Auftreten von Virusvarianten assoziiert, die den Chemokinrezeptor CXCR4 zum Zelleintritt verwenden. Dagegen nutzen SIV ein breites Korezeptorspektrum, vor allem CCR5. Im Verlauf einer SIV-Infektion findet kein Korezeptorwechsel von CCR5 zu CXCR4 statt. In dieser Arbeit wurde der Einfluß einer solchen Änderung der Korezeptornutzung auf die SIVagm-Infektion *in-vitro* und auf den Verlauf der apathogenen SIV-Infektion *in-vivo* nach Infektion von Schweinsaffen untersucht.

Um die Korezeptorspezifität eines SIV zu CXCR4 zu verändern, wurde das in AGM und Schweinsaffen apathogene SIVagm3mc verwendet, das als Korezeptoren zum Zelleintritt CCR5, BOB und BONZO nutzt. Die potentielle Korezeptorbindungsstelle, der zu HIV-1 homologe V3-Loop des Oberflächen-Hüllproteins gp130-SU des SIVagm3mc wurde durch den V3-Loop des CD4 / CXCR4-tropen HIV-1-Klons BH10 ersetzt. Das resultierende SIVagm3-X4mc erwies sich als replikationskompetent und verwendete zum Zelleintritt ausschließlich CD4 / CXCR4. Die Replikation wurde durch den natürlichen Liganden des CXCR4, SDF-1 α , dosisabhängig gehemmt. Überraschenderweise besaß SIVagm3-X4mc die Eigenschaft, *in-vitro* nicht nur in IL2 / PHA-stimulierten sondern auch in unstimulierten PBMC von Schweinsaffen und AGM replizieren.

Nach Infektion von je zwei Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) mit SIVagm3mc bzw. SIVagm3-X4mc konnte bis zu 14 Monate nach Inokulation keine Krankheitsentwicklung und kein Abfall der absoluten Anzahl der CD4⁺-T-Lymphozyten beobachtet werden. Die Virusbelastung der Tiere war vergleichbar und die Korezeptornutzung blieb auch nach *in-vivo* Replikation erhalten.

Interessanterweise konnte SIVagm3-X4mc, nicht aber das Wildtypvirus SIVagm3mc, durch Sera von SIVagm3mc und SIVagm3-X4mc infizierten Schweinsaffen neutralisiert werden. HIV-1-spezifische Antikörper konnten in Sera eines mit SIVagm3-X4mc infizierten Tieren nachgewiesen werden.

Diese Studie beschreibt zum ersten Mal den erfolgreichen Austausch eines V3-Loops bei SIV. Das resultierende SIVagm3-X4mc, das wie beabsichtigt CD4 / CXCR4-positive Zellen infizierte, war im Gegensatz zum Ausgangsvirus in der Lage, in nicht-stimulierten PBMC zu replizieren und zeigte Sensitivität gegenüber neutralisierenden Antikörpern, die in SIVagm3mc- und SIVagm3-X4mc-infizierten Schweinsaffen induziert wurden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Albert,J., Stalhandske,P., Marquina,S., Karis,J., Fouchier,R.A., Norrby,E., and Chiodi,F. (1996). Biological phenotype of HIV type 2 isolates correlates with V3 genotype. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12, 821-828.

Alkhatib,G., Combadiere,C., Broder,C.C., Feng,Y., Kennedy,P.E., Murphy,P.M., and Berger,E.A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955-1958.

Amara,A., Gall,S.L., Schwartz,O., Salamero,J., Montes,M., Loetscher,P., Baggiolini,M., Virelizier,J.L., and Arenzana-Seisdedos,F. (1997). HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J. Exp. Med.* 186, 139-146.

Arthos,J., Rubbert,A., Rabin,R.L., Cicala,C., Machado,E., Wildt,K., Hanbach,M., Steenbeke,T.D., Swofford,R., Farber,J.M., and Fauci,A.S. (2000). CCR5 signal transduction in macrophages by human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus envelopes. *J. Virol.* 74, 6418-6424.

Baggiolini,M., Dewald,B., and Moser,B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 675-705.

Baier,M., Garber,C., Muller,C., Cichutek,K., and Kurth,R. (1990). Complete nucleotide sequence of a simian immunodeficiency virus from African green monkeys: a novel type of intragroup divergence. *Virology* 176, 216-221.

Baier,M., Werner,A., Cichutek,K., Garber,C., Muller,C., Kraus,G., Ferdinand,F.J., Hartung,S., Papas,T.S., and Kurth,R. (1989). Molecularly cloned simian immunodeficiency virus SIVagm3 is highly divergent from other SIVagm isolates and is biologically active in-vitro and in-vivo. *J. Virol.* 63, 5119-5123.

Barre-Sinoussi,F., Chermann,J.C., Rey,F., Nugeyre,M.T., Chamaret,S., Gruest,J., Dauguet,C., Axler-Blin,C., Vezinet-Brun,F., Rouzioux,C., Rozenbaum,W., and Montagnier,L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.

Beer,B., Baier,M., zur,M.J., Norley,S., and Kurth,R. (1997). Vaccine effect using a live attenuated nef-deficient simian immunodeficiency virus of African green monkeys in the

absence of detectable vaccine virus replication in-vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 4062-4067.

Beer,B., Scherer,J., zur,M.J., Norley,S., Baier,M., and Kurth,R. (1996). Lack of dichotomy between virus load of peripheral blood and lymph nodes during long-term simian immunodeficiency virus infection of African green monkeys. *Virology* *219*, 367-375.

Benveniste,R.E., Arthur,L.O., Tsai,C.C., Sowder,R., Copeland,T.D., Henderson,L.E., and Oroszlan,S. (1986). Isolation of a lentivirus from a macaque with lymphoma: comparison with HTLV-III/LAV and other lentiviruses. *J. Virol.* *60*, 483-490.

Berger,E.A., Doms,R.W., Fenyo,E.M., Korber,B.T., Littman,D.R., Moore,J.P., Sattentau,Q.J., Schuitemaker,H., Sodroski,J., and Weiss,R.A. (1998). A new classification for HIV-1. *Nature* *391*, 240.

Berger,E.A., Murphy,P.M., and Farber,J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 657-700.

Bleul,C.C., Farzan,M., Choe,H., Parolin,C., Clark-Lewis,I., Sodroski,J., and Springer,T.A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* *382*, 829-833.

Bleul,C.C., Wu,L., Hoxie,J.A., Springer,T.A., and Mackay,C.R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1925-1930.

Broder,C.C. and Jones-Trower,A. (1999). Coreceptor use by primate lentiviruses. *Human Retroviruses and AIDS. Los Alamos National HIV Sequence Database.* 517-541.

Bukrinsky,M.I., Sharova,N., Dempsey,M.P., Stanwick,T.L., Bukrinskaya,A.G., Haggerty,S., and Stevenson,M. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 6580-6584.

Cecilia,D., KewalRamani,V.N., O'Leary,J., Volsky,B., Nyambi,P., Burda,S., Xu,S., Littman,D.R., and Zolla-Pazner,S. (1998). Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage. *J. Virol.* *72*, 6988-6996.

Chackerian,B., Long,E.M., Luciw,P.A., and Overbaugh,J. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 coreceptors participate in postentry stages in the virus replication cycle and function in simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* *71*, 3932-3939.

- Clapham,P.R., Weiss,R.A., Dalglish,A.G., Exley,M., Whitby,D., and Hogg,N. (1987). Human immunodeficiency virus infection of monocytic and T-lymphocytic cells: receptor modulation and differentiation induced by phorbol ester. *Virology* 158, 44-51.
- Chan,D.C., Fass,D., Berger,J.M., and Kim,P.S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-273.
- Chen,Z., Telfier,P., Gettie,A., Reed,P., Zhang,L., Ho,D.D., and Marx,P.A. (1996). Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J. Virol.* 70, 3617-3627.
- Chen,Z., Zhou,P., Ho,D.D., Landau,N.R., and Marx,P.A. (1997). Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry. *J. Virol.* 71, 2705-2714.
- Chen,Z., Gettie,A., Ho,D.D., and Marx,P.A. (1998). Primary SIVsm isolates use the CCR5 coreceptor from sooty mangabeys naturally infected in west Africa: a comparison of coreceptor usage of primary SIVsm, HIV-2, and SIVmac. *Virology* 246, 113-124.
- Choe,H., Farzan,M., Sun,Y., Sullivan,N., Rollins,B., Ponath,P.D., Wu,L., Mackay,C.R., LaRosa,G., Newman,W., Gerard,N., Gerard,C., and Sodroski,J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85, 1135-1148.
- Cichutek,K. and Norley,S. (1993). Lack of immune suppression in SIV-infected natural hosts. *AIDS* 7 *Suppl 1*, S25-S35.
- Clavel,F., Guetard,D., Brun-Vezinet,F., Chamaret,S., Rey,M.A., Santos-Ferreira,M.O., Laurent,A.G., Dauguet,C., Katlama,C., Rouzioux,C., and . (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-346.
- Clayton,L.K., Hussey,R.E., Steinbrich,R., Ramachandran,H., Husain,Y., and Reinherz,E.L. (1988). Substitution of murine for human CD4 residues identifies amino acids critical for HIV-gp120 binding. *Nature* 335, 363-366.
- Clerici,M. and Shearer,G.M. (1993). A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* 14, 107-111.
- Cocchi,F., DeVico,A.L., Garzino-Demo,A., Arya,S.K., Gallo,R.C., and Lusso,P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270, 1811-1815.

- Cocchi,F., DeVico,A.L., Garzino-Demo,A., Cara,A., Gallo,R.C., and Lusso,P. (1996). The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat. Med.* 2, 1244-1247.
- Coffin,J., Haase,A., Levy,J.A., Montagnier,L., Oroszlan,S., Teich,N., Temin,H., Toyoshima,K., Varmus,H., Vogt,P., and . (1986). What to call the AIDS virus? *Nature* 321, 10.
- Connor,R.I., Sheridan,K.E., Ceradini,D., Choe,S., and Landau,N.R. (1997). Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J. Exp. Med.* 185, 621-628.
- Cooper,D.A., Gold,J., Maclean,P., Donovan,B., Finlayson,R., Barnes,T.G., Michelmore,H.M., Brooke,P., and Penny,R. (1985). Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1, 537-540.
- Cullen,B.R. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93, 685-692.
- Daniel,M.D., Letvin,N.L., King,N.W., Kannagi,M., Sehgal,P.K., Hunt,R.D., Kanki,P.J., Essex,M., and Desrosiers,R.C. (1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* 228, 1201-1204.
- Deng,H., Liu,R., Ellmeier,W., Choe,S., Unutmaz,D., Burkhart,M., Di Marzio,P., Marmon,S., Sutton,R.E., Hill,C.M., Davis,C.B., Peiper,S.C., Schall,T.J., Littman,D.R., and Landau,N.R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661-666.
- Deng,H.K., Unutmaz,D., KewalRamani,V.N., and Littman,D.R. (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 388, 296-300.
- DeMaria,M.A., Casto,M., O'Connell,M., Johnson,R.P., and Rosenzweig,M. (2000). Characterization of lymphocyte subsets in rhesus macaques during the first year of life. *Eur. J. Haematol.* 65, 245-257.
- Dewhurst,S., Embretson,J.E., Anderson,D.C., Mullins,J.I., and Fultz,P.N. (1990). Sequence analysis and acute pathogenicity of molecularly cloned SIVSMM-PBj14. *Nature* 345, 636-640.
- Dittmar,M.T., Cichutek,K., Fultz,P.N., and Kurth,R. (1995). The U3 promoter region of the acutely lethal simian immunodeficiency virus clone smmPBj1.9 confers related biological activity on the apathogenic clone agm3mc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 1362-1366.

- Dittmar, M.T., McKnight, A., Simmons, G., Clapham, P.R., Weiss, R.A., and Simmonds, P. (1997). HIV-1 tropism and co-receptor use. *Nature* 385, 495-496.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., and Paxton, W.A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-673.
- Dumonceaux, J., Chanel, C., Valente, S., Quivet, L., Briand, P., and Hazan, U. (1999). Mutations in the env gene of human immunodeficiency virus type 1 NDK isolates and the use of African green monkey CXCR4 as a co-receptor in COS-7 cells. *J. Gen. Virol.* 80, 1975-1982.
- Edinger, A.L., Hoffman, T.L., Sharron, M., Lee, B., O'Dowd, B., and Doms, R.W. (1998). Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* 249, 367-378.
- Edinger, A.L., Clements, J.E., and Doms, R.W. (1999). Chemokine and orphan receptors in HIV-2 and SIV tropism and pathogenesis. *Virology* 260, 211-221.
- Edwards, T.G., Hoffman, T.L., Baribaud, F., Wyss, S., LaBranche, C.C., Romano, J., Adkinson, J., Sharron, M., Hoxie, J.A., and Doms, R.W. (2001). Relationships between CD4 independence, neutralization sensitivity, and exposure of a CD4-induced epitope in a human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* 75, 5230-5239.
- Ennen, J., Findelee, H., Dittmar, M.T., Norley, S., Ernst, M., and Kurth, R. (1994). CD8+ T lymphocytes of African green monkeys secrete an immunodeficiency virus-suppressing lymphokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 7207-7211.
- Falk, S., Muller, H., Schmidts, H.L., and Stutte, H.J. (1986). [Morphological findings in the lymphadenopathy syndrome (LAS) and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 111, 714-718.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.
- Finzi, D. and Siliciano, R.F. (1998). Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* 93, 665-671.
- Franke, E.K., Yuan, H.E., and Luban, J. (1994). Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372, 359-362.
- Frankel, A.D. and Young, J.A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 1-25.

- Freed,E.O. (1998). HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251, 1-15.
- Fultz,P.N., McClure,H.M., Anderson,D.C., Swenson,R.B., Anand,R., and Srinivasan,A. (1986). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 5286-5290.
- Fultz,P.N., McClure,H.M., Anderson,D.C., and Switzer,W.M. (1989). Identification and biologic characterization of an acutely lethal variant of simian immunodeficiency virus from sooty mangabeys (SIV/SMM). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5, 397-409.
- Fultz,P.N. (1991). Replication of an acutely lethal simian immunodeficiency virus activates and induces proliferation of lymphocytes. *J. Virol.* 65, 4902-4909.
- Gaines,H., von Sydow,M.A., von Stedingk,L.V., Biberfeld,G., Bottiger,B., Hansson,L.O., Lundbergh,P., Sonnerborg,A.B., Wasserman,J., and Strannegaard,O.O. (1990). Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* 4, 995-999.
- Gao,F., Bailes,E., Robertson,D.L., Chen,Y., Rodenburg,C.M., Michael,S.F., Cummins,L.B., Arthur,L.O., Peeters,M., Shaw,G.M., Sharp,P.M., and Hahn,B.H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 397, 436-441.
- Gelderblom,H.R. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5, 617-637.
- Gicheru,M.M., Otsyula,M., Spearman,P., Graham,B.S., Miller,C.J., Robinson,H.L., Haigwood,N.L., and Montefiori,D.C. (1999). Neutralizing antibody responses in Africa green monkeys naturally infected with simian immunodeficiency virus (SIV_{agm}). *J. Med. Primatol.* 28, 97-104.
- Gottlieb,M.S., Schroff,R., Schanker,H.M., Weisman,J.D., Fan,P.T., Wolf,R.A., and Saxon,A. (1981). *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305, 1425-1431.
- Hahn,B.H., Shaw,G.M., De Cock,K.M., and Sharp,P.M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287, 607-614.
- Harouse,J.M., Gettie,A., Tan,R.C., Blanchard,J., and Cheng-Mayer,C. (1999). Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs. *Science* 284, 816-819.

- Hartung,S., Boller,K., Cichutek,K., Norley,S.G., and Kurth,R. (1992). Quantitation of a lentivirus in its natural host: simian immunodeficiency virus in African green monkeys. *J. Virol.* 66, 2143-2149.
- Hillis,D.M. (2000). AIDS. Origins of HIV. *Science* 288, 1757-1759.
- Hirsch,V.M., Dapolito,G.A., Goldstein,S., McClure,H., Emau,P., Fultz,P.N., Isahakia,M., Lenroot,R., Myers,G., and Johnson,P.R. (1993). A distinct African lentivirus from Sykes' monkeys. *J. Virol.* 67, 1517-1528.
- Hirsch,V.M. and Johnson,P.R. (1994). Pathogenic diversity of simian immunodeficiency viruses. *Virus Res.* 32, 183-203.
- Hirsch,V.M., Olmsted,R.A., Murphey-Corb,M., Purcell,R.H., and Johnson,P.R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389-392.
- Hirsch,V.M., Dapolito,G., Johnson,P.R., Elkins,W.R., London,W.T., Montali,R.J., Goldstein,S., and Brown,C. (1995). Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in-vivo replication. *J. Virol.* 69, 955-967.
- Ho,D.D., Neumann,A.U., Perelson,A.S., Chen,W., Leonard,J.M., and Markowitz,M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123-126.
- Hoffman,T.L., LaBranche,C.C., Zhang,W., Canziani,G., Robinson,J., Chaiken,I., Hoxie,J.A., and Doms,R.W. (1999). Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6359-6364.
- Holtkamp, N. (1999). Korezeptor- und Wirtszellotropismus humaner und simianer Immundefizienzviren. Dissertation, Fachbereich Biochemie, Johann-Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
- Horton,R.M., Hunt,H.D., Ho,S.N., Pullen,J.K., and Pease,L.R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61-68.
- Hoxie,J.A., LaBranche,C.C., Endres,M.J., Turner,J.D., Berson,J.F., Doms,R.W., and Matthews,T.J. (1998). CD4-independent utilization of the CXCR4 chemokine receptor by HIV-1 and HIV-2. *J. Reprod. Immunol.* 41, 197-211.

- Isaka,Y., Sato,A., Miki,S., Kawauchi,S., Sakaida,H., Hori,T., Uchiyama,T., Adachi,A., Hayami,M., Fujiwara,T., and Yoshie,O. (1999). Small amino acid changes in the V3-Loop of human immunodeficiency virus type 2 determines the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5. *Virology* 264, 237-243.
- Jameson,B.A., Rao,P.E., Kong,L.I., Hahn,B.H., Shaw,G.M., Hood,L.E., and Kent,S.B. (1988). Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein. *Science* 240, 1335-1339.
- Jin,M.J., Hui,H., Robertson,D.L., Muller,M.C., Barre-Sinoussi,F., Hirsch,V.M., Allan,J.S., Shaw,G.M., Sharp,P.M., and Hahn,B.H. (1994). Mosaic genome structure of simian immunodeficiency virus from west African green monkeys. *EMBO J.* 13, 2935-2947.
- Kärber,G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak.* 162, 480-483.
- Kanbe,K., Shimizu,N., Soda,Y., Takagishi,K., and Hoshino,H. (1999). A CXC chemokine receptor, CXCR5/BLR1, is a novel and specific coreceptor for human immunodeficiency virus type 2. *Virology* 265, 264-273.
- Kanki,P.J., Alroy,J., and Essex,M. (1985). Isolation of T-lymphotropic retrovirus related to HTLV-III/LAV from wild-caught African green monkeys. *Science* 230, 951-954.
- Kikukawa,R., Koyanagi,Y., Harada,S., Kobayashi,N., Hatanaka,M., and Yamamoto,N. (1986). Differential susceptibility to the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus in cloned cells of human leukemic T-cell line Molt-4. *J. Virol.* 57, 1159-1162.
- Kimata,J.T., Gosink,J.J., KewalRamani,V.N., Rudensey,L.M., Littman,D.R., and Overbaugh,J. (1999). Coreceptor specificity of temporal variants of simian immunodeficiency virus Mne. *J. Virol.* 73, 1655-1660.
- Kirchhoff,F., Mori,K., and Desrosiers,R.C. (1994a). The "V3" domain is a determinant of simian immunodeficiency virus cell tropism. *J. Virol.* 68, 3682-3692.
- Kirchhoff,F., Morrison,H.G., Murray,M.G., Rennert,P., and Desrosiers,R.C. (1994b). SIVmac expressing hybrid envelope proteins containing HIV-1 V3 and/or C4 sequences is not competent for replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 309-313.
- Korber,B., Muldoon,M., Theiler,J., Gao,F., Gupta,R., Lapedes,A., Hahn,B.H., Wolinsky,S., and Bhattacharya,T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288, 1789-1796.

- Korin,Y.D. and Zack,J.A. (1998). Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J. Virol.* 72, 3161-3168.
- Kozak,S.L., Platt,E.J., Madani,N., Ferro,F.E., Jr., Peden,K., and Kabat,D. (1997). CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 71, 873-882.
- Kwong,P.D., Wyatt,R., Robinson,J., Sweet,R.W., Sodroski,J., and Hendrickson,W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648-659.
- LaCasse,R.A., Follis,K.E., Moudgil,T., Trahey,M., Binley,J.M., Planelles,V., Zolla-Pazner,S., and Nunberg,J.H. (1998). Coreceptor utilization by human immunodeficiency virus type 1 is not a primary determinant of neutralization sensitivity. *J. Virol.* 72, 2491-2495.
- Lacey,S.F., McDanal,C.B., Horuk,R., and Greenberg,M.L. (1997). The CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 is not responsible for CD8+ T cell suppression of syncytia-inducing strains of HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 9842-9847.
- Landau,N.R., Warton,M., and Littman,D.R. (1988). The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* 334, 159-162.
- Lee,B., Sharron,M., Montaner,L.J., Weissman,D., and Doms,R.W. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5215-5220.
- Letvin,N.L., Daniel,M.D., Sehgal,P.K., Desrosiers,R.C., Hunt,R.D., Waldron,L.M., MacKey,J.J., Schmidt,D.K., Chalifoux,L.V., and King,N.W. (1985). Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* 230, 71-73.
- Liu,Q.H., Williams,D.A., McManus,C., Baribaud,F., Doms,R.W., Schols,D., De,C.E., Kotlikoff,M.I., Collman,R.G., and Freedman,B.D. (2000). HIV-1 gp120 and chemokines activate ion channels in primary macrophages through CCR5 and CXCR4 stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4832-4837.
- Liu,Z.Q., Muhkerjee,S., Sahni,M., McCormick-Davis,C., Leung,K., Li,Z., Gattone,V.H., Tian,C., Doms,R.W., Hoffman,T.L., Raghavan,R., Narayan,O., and Stephens,E.B. (1999). Derivation and biological characterization of a molecular clone of SHIV(KU-2) that causes AIDS, neurological disease, and renal disease in rhesus macaques. *Virology* 260, 295-307.

- Lowenstine,L.J., Lerche,N.W., Yee,J.L., Uyeda,A., Jennings,M.B., Munn,R.J., McClure,H.M., Anderson,D.C., Fultz,P.N., and Gardner,M.B. (1992). Evidence for a lentiviral etiology in an epizootic of immune deficiency and lymphoma in stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*). *J. Med. Primatol.* *21*, 1-14.
- Maddon,P.J., Dalgleish,A.G., McDougal,J.S., Clapham,P.R., Weiss,R.A., and Axel,R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* *47*, 333-348.
- Mamounas,M., Looney,D.J., Talbott,R., and Wong-Staal,F. (1995). An infectious chimeric human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) expressing the HIV-1 principal neutralizing determinant. *J. Virol.* *69*, 6424-6429.
- Marx,P.A. and Chen,Z. (1998). The function of simian chemokine receptors in the replication of SIV. *Semin. Immunol.* *10*, 215-223.
- Masur,H., Michelis,M.A., Greene,J.B., Onorato,I., Stouwe,R.A., Holzman,R.S., Wormser,G., Brettman,L., Lange,M., Murray,H.W., and Cunningham-Rundles,S. (1981). An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* *305*, 1431-1438.
- McCune,J.M. (2001). The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* *410*, 974-979.
- Means,R.E., Matthews,T., Hoxie,J.A., Malim,M.H., Kodama,T., and Desrosiers,R.C. (2001) Ability of the V3-Loop of simian immunodeficiency virus to serve as a target for antibody-mediated neutralization: correlation of neutralization sensitivity, growth in macrophages, and decreased dependence on CD4. *J. Virol.* *75*, 3903-3915.
- Meister,S., Otto,C., Papkalla,A., Krumbiegel,M., Pohlmann,S., and Kirchhoff,F. (2001). Basic amino acid residues in the V3-Loop of simian immunodeficiency virus envelope alter viral coreceptor tropism and infectivity but do not allow efficient utilization of CXCR4 as entry cofactor. *Virology* *284*, 287-296.
- Melikyan,G.B., Markosyan,R.M., Hemmati,H., Delmedico,M.K., Lambert,D.M., and Cohen,F.S. (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J. Cell Biol.* *151*, 413-423.
- Mellors,J.W., Rinaldo,C.R., Jr., Gupta,P., White,R.M., Todd,J.A., and Kingsley,L.A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* *272*, 1167-1170.

- Miedema,F., Tersmette,M., and van Lier,R.A. (1990). AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunol. Today* 11, 293-297.
- Modrow,S., Hahn,B.H., Shaw,G.M., Gallo,R.C., Wong-Staal,F., and Wolf,H. (1987). Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol.* 61, 570-578.
- Montefiori,D.C., Collman,R.G., Fouts,T.R., Zhou,J.Y., Bilaska,M., Hoxie,J.A., Moore,J.P., and Bolognesi,D.P. (1998). Evidence that antibody-mediated neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by sera from infected individuals is independent of coreceptor usage. *J. Virol.* 72, 1886-1893.
- Muller,M.C., Saksena,N.K., Nerrienet,E., Chappey,C., Herve,V.M., Durand,J.P., Legal-Campodonico,P., Lang,M.C., Digoutte,J.P., Georges,A.J., and . (1993). Simian immunodeficiency viruses from central and western Africa: evidence for a new species-specific lentivirus in tantalus monkeys. *J. Virol.* 67, 1227-1235.
- Muller-Trutwin,M.C., Corbet,S., Tavares,M.D., Herve,V.M., Nerrienet,E., Georges-Courbot,M.C., Saurin,W., Sonigo,P., and Barre-Sinoussi,F. (1996). The evolutionary rate of nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIVagm) is in agreement with a rapid and continuous replication in-vivo. *Virology* 223, 89-102.
- Norley,S.G., Kraus,G., Ennen,J., Bonilla,J., Konig,H., and Kurth,R. (1990). Immunological studies of the basis for the apathogenicity of simian immunodeficiency virus from African green monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9067-9071.
- Oberlin,E., Amara,A., Bachelerie,F., Bessia,C., Virelizier,J.L., Arenzana-Seisdedos,F., Schwartz,O., Heard,J.M., Clark-Lewis,I., Legler,D.F., Loetscher,M., Baggiolini,M., and Moser,B. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-835.
- Ohta,Y., Masuda,T., Tsujimoto,H., Ishikawa,K., Kodama,T., Morikawa,S., Nakai,M., Honjo,S., and Hayami,M. (1988). Isolation of simian immunodeficiency virus from African green monkeys and seroepidemiologic survey of the virus in various non-human primates. *Int. J. Cancer* 41, 115-122.
- Ostrowski,M.A., Justement,S.J., Catanzaro,A., Hallahan,C.A., Ehler,L.A., Mizell,S.B., Kumar,P.N., Mican,J.A., Chun,T.W., and Fauci,A.S. (1998). Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J. Immunol.* 161, 3195-3201.

- Owen,S.M., Ellenberger,D., Rayfield,M., Wiktor,S., Michel,P., Grieco,M.H., Gao,F., Hahn,B.H., and Lal,R.B. (1998). Genetically divergent strains of human immunodeficiency virus type 2 use multiple coreceptors for viral entry. *J. Virol.* 72, 5425-5432.
- Owen,S.M., Masciotra,S., Novembre,F., Yee,J., Switzer,W.M., Ostyula,M., and Lal,R.B. (2000). Simian immunodeficiency viruses of diverse origin can use CXCR4 as a coreceptor for entry into human cells. *J. Virol.* 74, 5702-5708.
- Page,K.A., Landau,N.R., and Littman,D.R. (1990). Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. *J. Virol.* 64, 5270-5276.
- Pantaleo,G., Graziosi,C., and Fauci,A.S. (1993a). New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 328, 327-335.
- Pantaleo,G., Graziosi,C., and Fauci,A.S. (1993b). The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection. *AIDS 7 Suppl 1*, S19-S23.
- Parren,P.W., Moore,J.P., Burton,D.R., and Sattentau,Q.J. (1999). The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *AIDS 13 Suppl A:S137-62.*, S137-S162.
- Peeters,M., Honore,C., Huet,T., Bedjabaga,L., Ossari,S., Bussi,P., Cooper,R.W., and Delaporte,E. (1989). Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* 3, 625-630.
- Pohlmann,S., Stolte,N., Munch,J., Ten Haaft,P., Heeney,J.L., Stahl-Hennig,C., and Kirchhoff,F. (1999). Co-receptor usage of BOB/GPR15 in addition to CCR5 has no significant effect on replication of simian immunodeficiency virus in-vivo. *J. Infect. Dis.* 180, 1494-1502.
- Platt,E.J., Wehrly,K., Kuhmann,S.E., Chesebro,B., and Kabat,D. (1998). Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72, 2855-2864.
- Popik,W. and Pitha,P.M. (2000). Inhibition of CD3/CD28-mediated activation of the MEK/ERK signaling pathway represses replication of X4 but not R5 human immunodeficiency virus type 1 in peripheral blood CD4(+) T lymphocytes. *J. Virol.* 74, 2558-2566.
- Rizzuto,C.D., Wyatt,R., Hernandez-Ramos,N., Sun,Y., Kwong,P.D., Hendrickson,W.A., and Sodroski,J. (1998). A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280, 1949-1953.

- Rossi,D. and Zlotnik,A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 217-242.
- Sato,H., Kato,K., and Takebe,Y. (1999). Functional complementation of the envelope hypervariable V3-Loop of human immunodeficiency virus type 1 subtype B by the subtype E V3-Loop. *Virology* 257, 491-501.
- Scarlatti,G., Tresoldi,E., Bjorndal,A., Fredriksson,R., Colognesi,C., Deng,H.K., Malnati,M.S., Plebani,A., Siccardi,A.G., Littman,D.R., Fenyo,E.M., and Lusso,P. (1997). In-vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat. Med.* 3, 1259-1265.
- Schols,D. and De Clercq,E. (1998). The simian immunodeficiency virus mnd(GB-1) strain uses CXCR4, not CCR5, as coreceptor for entry in human cells. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 9), 2203-2205.
- Schwiebert,R. and Fultz,P.N. (1994). Immune activation and viral burden in acute disease induced by simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14: correlation between in-vitro and in-vivo events. *J. Virol.* 68, 5538-5547.
- Secchiero,P., Zella,D., Curreli,S., Mirandola,P., Capitani,S., Gallo,R.C., and Zauli,G. (2000). Engagement of CD28 modulates CXC chemokine receptor 4 surface expression in both resting and CD3-stimulated CD4+ T cells. *J. Immunol.* 164, 4018-4024.
- Sharron,M., Pohlmann,S., Price,K., Lolis,E., Tsang,M., Kirchhoff,F., Doms,R.W., and Lee,B. (2000). Expression and coreceptor activity of STRL33/Bonzo on primary peripheral blood lymphocytes. *Blood* 96, 41-49.
- Shaw,G.M., Harper,M.E., Hahn,B.H., Epstein,L.G., Gajdusek,D.C., Price,R.W., Navia,B.A., Petit,C.K., O'Hara,C.J., Groopman,J.E., and . (1985). HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. *Science* 227, 177-182.
- Shearer,G.M. and Clerici,M. (1998). Cytokine profiles in HIV type 1 disease and protection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14 Suppl 2, S149-S152.
- Shioda,T., Levy,J.A., and Cheng-Mayer,C. (1992). Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 9434-9438.
- Siegel,F., Norley,S., Hartung,S., and Kurth,R. (1992). B-cell epitope mapping of the entire SIVagm envelope glycoprotein including fine mapping of immunogenic regions. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 5, 583-590.

- Spearman,C. (1908). The method of "right and wrong cases" ("constant stimuli") without gauss's formulae. *Brit J Psychol* 2, 227-242.
- Spina,C.A., Guatelli,J.C., and Richman,D.D. (1995). Establishment of a stable, inducible form of human immunodeficiency virus type 1 DNA in quiescent CD4 lymphocytes in-vitro. *J. Virol.* 69, 2977-2988.
- Stevenson,M., Stanwick,T.L., Dempsey,M.P., and Lamonica,C.A. (1990). HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.* 9, 1551-1560.
- Tchou,I., Misery,L., Sabido,O., Dezutter-Dambuyant,C., Bourlet,T., Moja,P., Hamzeh,H., Peguet-Navarro,J., Schmitt,D., and Genin,C. (2001). Functional HIV CXCR4 coreceptor on human epithelial Langerhans cells and infection by HIV strain X4. *J. Leukoc. Biol.* 70, 313-321.
- Tindall,B. and Cooper,D.A. (1991). Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 5, 1-14.
- Tomonaga,K., Katahira,J., Fukasawa,M., Hassan,M.A., Kawamura,M., Akari,H., Miura,T., Goto,T., Nakai,M., Suleman,M., and . (1993). Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from African white-crowned mangabey monkeys (*Cercocebus torquatus lunulatus*). *Arch. Virol.* 129, 77-92.
- Tristem,M., Marshall,C., Karpas,A., and Hill,F. (1992). Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. *EMBO J.* 11, 3405-3412.
- Tristem,M., Marshall,C., Karpas,A., Petrik,J., and Hill,F. (1990). Origin of vpx in lentiviruses. *Nature* 347, 341-342.
- Trkola,A., Ketas,T., KewalRamani,V.N., Endorf,F., Binley,J.M., Katinger,H., Robinson,J., Littman,D.R., and Moore,J.P. (1998). Neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates to antibodies and CD4-based reagents is independent of coreceptor usage. *J. Virol.* 72, 1876-1885.
- Tsujimoto,H., Cooper,R.W., Kodama,T., Fukasawa,M., Miura,T., Ohta,Y., Ishikawa,K., Nakai,M., Frost,E., Roelants,G.E., and . (1988). Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 62, 4044-4050.
- Unutmaz,D., KewalRamani,V.N., and Littman,D.R. (1998). G protein-coupled receptors in HIV and SIV entry: new perspectives on lentivirus-host interactions and on the utility of animal models. *Semin. Immunol.* 10, 225-236.

- Valentin,A., Trivedi,H., Lu,W., Kostrikis,L.G., and Pavlakis,G.N. (2000). CXCR4 mediates entry and productive infection of syncytia-inducing (X4) HIV-1 strains in primary macrophages. *Virology* 269, 294-304.
- van't Wout,A.B., Kootstra,N.A., Mulder-Kampinga,G.A., Albrecht-van Lent,N., Scherpbier,H.J., Veenstra,J., Boer,K., Coutinho,R.A., Miedema,F., and Schuitemaker,H. (1994). Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J. Clin. Invest* 94, 2060-2067.
- Veazey,R.S., Mansfield,K.G., Tham,I.C., Carville,A.C., Shvetz,D.E., Forand,A.E., and Lackner,A.A. (2000). Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 74, 11001-11007.
- Vodros,D., Thorstensson,R., Biberfeld,G., Schols,D., De Clercq,E., and Fenyo,E.M. (2001). Coreceptor usage of sequential isolates from cynomolgus monkeys experimentally Infected with simian immunodeficiency virus (SIVsm). *Virology* 291, 12-21.
- Wei,X., Ghosh,S.K., Taylor,M.E., Johnson,V.A., Emini,E.A., Deutsch,P., Lifson,J.D., Bonhoeffer,S., Nowak,M.A., Hahn,B.H., and . (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373, 117-122.
- Weissenhorn,W., Dessen,A., Harrison,S.C., Skehel,J.J., and Wiley,D.C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387, 426-430.
- Werner,A., Winskowsky,G., Cichutek,K., Norley,S.G., and Kurth,R. (1990). Productive infection of both CD4+ and CD4- human cell lines with HIV-1, HIV-2 and SIVagm. *AIDS* 4, 537-544.
- Whetter,L., Novembre,F.J., Saucier,M., Gummuluru,S., and Dewhurst,S. (1998). Costimulatory pathways in lymphocyte proliferation induced by the simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14. *J. Virol.* 72, 6155-6158.
- Whetter,L.E., Ojukwu,I.C., Novembre,F.J., and Dewhurst,S. (1999). Pathogenesis of simian immunodeficiency virus infection. *J. Gen. Virol.* 80, 1557-1568.
- Wilk,T., Pfeiffer,T., and Bosch,V. (1992). Retained in-vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product. *Virology* 189, 167-177.
- Wong,J.K., Hezareh,M., Gunthard,H.F., Havlir,D.V., Ignacio,C.C., Spina,C.A., and Richman,D.D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278, 1291-1295.

- Wu, Y. and Marsh, J.W. (2001). Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* 293, 1503-1506.
- Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., and Sodroski, J. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384, 179-183.
- Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W.A., and Sodroski, J.G. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393, 705-711.
- Xiao, L., Rudolph, D.L., Owen, S.M., Spira, T.J., and Lal, R.B. (1998). Adaptation to promiscuous usage of CC and CXC-chemokine coreceptors in-vivo correlates with HIV-1 disease progression. *AIDS* 12, F137-F143.
- Zaitseva, M., Blauvelt, A., Lee, S., Lapham, C.K., Klaus-Kovtun, V., Mostowski, H., Manischewitz, J., and Golding, H. (1997). Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat. Med.* 3, 1369-1375.
- Zhang, Y., Lou, B., Lal, R.B., Gettie, A., Marx, P.A., and Moore, J.P. (2000). Use of inhibitors to evaluate coreceptor usage by simian and simian/human immunodeficiency viruses and human immunodeficiency virus type 2 in primary cells. *J. Virol.* 74, 6893-6910.
- Zhang, L., He, T., Talal, A., Wang, G., Frankel, S.S., and Ho, D.D. (1998). In-vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J. Virol.* 72, 5035-5045.
- Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K.A., Reimann, K.A., Reinhart, T.A., Rogan, M., Cavert, W., Miller, C.J., Veazey, R.S., Notermans, D., Little, S., Danner, S.A., Richman, D.D., Havlir, D., Wong, J., Jordan, H.L., Schacker, T.W., Racz, P., Tenner-Racz, K., Letvin, N.L., Wolinsky, S., and Haase, A.T. (1999). Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* 286, 1353-1357.
- Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., and Ho, D.D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391, 594-597.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AGM	Afrikanische Grüne Meerkatze, <i>Chlorocebus aethiops</i>
AIDS	Erworbenes Immundefizienz-Syndrom
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CA	Kapsidprotein
cDNA	komplementäre DNA
CIP	calf intestinal alkaline phosphatase; Alkalische Phosphatase
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CCR5	Rezeptor des fünften CC-Chemokins
CXCR4	Rezeptor des vierten CXC-Chemokins
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Ribonukleosid-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
<i>env</i>	retrovirales Strukturgen, für die Hüllproteine (TM und SU) kodierend
FACS	fluorescence activated cell sorting; Analytische Durchflußzytometrie
FKS	fötales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Emissions-Transfer
g	Gramm <i>oder</i> Fallbeschleunigung
<i>gag</i>	retrovirales Strukturgen (gruppenspezifische Proteine)
GFP	Green Fluorescent Protein
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
i.E.	infektiöse Einheit
IL	Interleukin
IN	Integrase
IPA	Immunperoxidase-Assay
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani-Medium
LNMC	mononukleären Blutzellen der Lymphknoten
LTR	Long terminal repeat

MA	Matrixprotein
MACS	Magnetic Cell Sorting
MCS	Multiple cloning site
min	Minuten
MIP	macrophage inflammatory protein
moi	multiplicity of infection
mRNA	Messenger RNA
NC	Nucleocapsidprotein
ND ₅₀	50 % neutralisierende Dosis
NEM	Schweinsaffe, <i>Macaca nemestrina</i>
OD	optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphate buffered saline <i>oder</i> primer binding site
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHA	Phytohemagglutinin
<i>pol</i>	retrovirales Gen für die viralen Enzyme kodierend
PR	Protease
RANTES	regulated-upon-activation normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Kulturmedium aus dem "Roswell Park Memorial Institute"
RRE	rev-responsive element
RT	Reverse Transkriptase
RTemp	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAIDS	Simianes erworbenes Immundefizienz-Syndrom
SDF	stromal derived factor
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
SU	surface; Oberflächenhüllprotein
TAR	Trans-activation region
TCID ₅₀	Tissue Culture Infection Dosis
TM	Transmembranhüllprotein
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität
ÜN	Über Nacht
Vol	Volumen

8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Klaus Cichutek danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die sehr angenehme und freundliche Atmosphäre, für die wissenschaftliche Anleitung und die ständige Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit, die in der von ihm geführten Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ entstand.

Für die freundliche fachübergreifende Betreuung danke ich Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig vom Institut für Biochemie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Egbert Flory für die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit, die in seinem Sachgebiet durchgeführt wurde, und für seine humorvolle und offene Art, mit der er mir stets zur Seite stand.

Außerdem danke ich den ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mir bei der Bewältigung des Laboralltags zur Seite standen, stets zur fachlichen Diskussion bereit waren und durch ihre Kollegialität, Witz und Humor für ein sehr angenehmes Arbeitsklima sorgten. Danke an: PD Dr. Christian Buchholz, Sabine Fengler, Carsten Finger, Irene Hartl, Matthias Hamdorf, Dörte Kahlenberg, Tanja Kearns, Yulyia Medwedowska, Christoph Merten, Heide Muckenfuß, Michael Mühlebach, Dr. Peter Müller, Dr. Frank Nocken, Sylvia Raupp, Dr. Ralf Sanzenbacher, Isabel Schmitt, Richard Schneider, Manuela Schütze, PD Dr. Matthias Schweizer, Dipl. Ing. Martin Selbert, Dr. Steffi Steidl, Dr. Yuansheng Sun, Uli Tschulena, Dr. Jörn Stitz, Bernhard Völker, Renate Wenig und Nina Wolfrum

Ein besonderer Dank geht an Maria Bobkova, Dr. Martin Engelstädter und Jeanette Neumann für unseren „Lagomorphen-cerebellum“-Laboralltag und darüber hinaus.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Cheick Coulibaly, Dr. Silke Holzammer, Dr. Edgar Holznagel, Dr. Stephen Norley, Nicky Norley, Dr. Roland Plesker und Julia Seidl bedanken für die Zusammenarbeit und die fachlichen Tips, die sie mir während der Durchführung der Arbeit gegeben haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung das Biologie-Studium nicht möglich gewesen wäre, sowie meinem Bruder mit Familie und allen meinen Freunden, auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich während meines Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit verlassen konnte.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Renate König
Geburtsdatum/-ort	01.09.1969 in Marktredwitz
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Wissenschaftliche Tätigkeit und Ausbildung

06 / 2001 – dato	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Paul-Ehrlich-Institut, Langen Abt. Medizinische Biotechnologie Leitung: Prof. Dr. K. Cichutek Projekt: „ <i>Charakterisierung des Zelltyp-spezifischen Gentransfers in humane Zellen mit Milznekroseviren abgeleitete Targetingvektoren</i> “
11 / 1997 – dato	Promotionsstudium der Biochemie Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt
06 / 1997 – 05 / 2001	Doktorarbeit Paul-Ehrlich-Institut, Langen Abt. Medizinische Biotechnologie Leitung: Prof. Dr. K. Cichutek Titel: „ <i>Entwicklung und Charakterisierung einer CXCR4-tropen Variante des Simianen Immundefizienzvirus der Afrikanischen Grünen Meerkatze</i> “
04 / 1997	Diplom: Diplom-Biologe Univ., Gesamtnote „sehr gut“
07 / 1996 – 04 / 1997	Diplomarbeit Paul-Ehrlich-Institut, Langen Abt. Medizinische Biotechnologie Leitung: Prof. Dr. K. Cichutek Titel: „ <i>Analyse chimärer Lenti-Proviren des Typs SIVagm/SIVsmmPBj</i> “
10 / 1990 – 04 / 1997	Studium der Biologie Universität Bayreuth Schwerpunkte: Biochemie, Genetik, Pflanzenphysiologie

- 09 / 1988 – 07 / 1990 **Berufsausbildung**
Florist, Fa. Basad, Marktredwitz
- 06 / 1988 **Abitur (Allgemeine Hochschulreife)**
Otto-Hahn-Gymnasium, Marktredwitz

Publikationen

- König, R.**, Flory, E., Steidl, S., Holzammer, S., Holznagel, E., Coulibaly C., Norley S. and K. Cichutek (2002)
Engineered CD4/CXCR4-tropic Simian Immunodeficiency Virus from African Green Monkeys is Neutralization Sensitive and Replicates in non-stimulated Lymphocytes (Manuskript eingereicht bei JVIrol)
- König, R.**, Steidl, S., Flory E. and K. Cichutek
Change of Co-receptor usage of SIVagm3mc and Consequences for its Infection Profile in Vivo
Journal of Human Virology, 4, 160
International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, USA (2001)
- Stitz J., Mühlebach M.D., Blömer U., Scherr M., Selbert M., Wehner P., Steidl S., Schmitt I., **König R.**, Schweizer M. and K. Cichutek (2001)
A Novel Lentivirus Vector Derived from Apathogenic Simian Immunodeficiency Virus. Virology. 291,191-197
- Stitz, J., Steidl, S., Merget-Militzer, M., **König, R.**, Müller, P., Nocken, F., Engelstädter, M., Bobkova, M., Schmitt, I., Kurth, R., Buchholz, C. and K. Cichutek (2000)
MLV-Derived Retroviral Vectors Selective for CD4-Expressing Cells and Resistant to Neutralization by Sera from HIV-Infected Patients. Virology 267, 229-236
- Wagener, S., Dittmar, MT., Beer, B., **König, R.**, Plesker, R., Norley, S., Kurth, R. and K. Cichutek (1998)
The U3 promoter and the nef gene of simian immunodeficiency virus (SIV) smmPBj1.9 do not confer acute pathogenicity upon SIVagm. Journal of Virology 72(4), 3446-50

Vorträge

Change of Coreceptor usage of SIVagm3mc and consequences for its infection profile *in vivo*

König, R., Flory, E., Steidl, S., Tschulena, U., Holzammer, S., Holznagel, E., Coulibaly C., Norley S. and K. Cichutek

HIV Pathogenesis and Virus-Host Cell Interactions Heidelberg (2001)

Change of Coreceptor usage of SIVagm3mc and consequences for its infection profile in vivo

König, R., Flory, E., Steidl, S., Tschulena, U., Holzammer, S., Holznagel, E., Coulibaly C., Norley S. and K. Cichutek

8th Annual International Discussion Meeting on HIV Dynamics and Evolution Paris, Frankreich (2001)

Directing SIVagm3 Co-receptor Utilization to CXCR4 by V3-Loop Exchange in gp130-SU

König, R., Flory E., Steidl S., Coulibaly C., Norley S. and K. Cichutek

European Conference of Experimental AIDS Research (ECEAR) Madrid, Spanien (2000)

Directing SIVagm3 Co-receptor Utilization to CXCR4 Results in Neutralizing Activity in Sera of Infected Macaques

König, R., Flory, E., Steidl, S., Holzammer, S., Holznagel, E., Coulibaly C., Norley S. and K. Cichutek

1st Conference of Virus Diseases, München (2000)

Directing SIVagm3 Co-receptor Utilization to CXCR4 Results in Neutralizing Activity in Sera of Infected Macaques

König, R., Flory, E., Steidl, S., Tschulena, U., Holzammer, S., Holznagel, E., Coulibaly C., Norley S. and K. Cichutek

Annual Meeting of the German Society of Virology, Dresden (2001)

