

DIPLOMARBEIT

Freie Universität Berlin
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

Vorgelegt von:
Elham Chamanara
Februar 2003

Thema:
**Hemmung der HIV-Replikation durch virale Peptide
und neutralisierende Antikörper**

**Angefertigt am
Robert-Koch-Institut
Berlin**

Vorgelegt von:
Elham Chamanara
Matrikelnummer: 3038749

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
1.1 Taxonomische Zuordnung des humanen Immundefizienzvirus (HIV)	4
1.1.1 Retroviren	4
1.1.2 Struktur der Retroviren	5
1.1.3 Die Genomstruktur der Retroviren	6
1.1.4 Humane Retroviren	7
1.1.5 Durch Retroviren hervorgerufene Krankheiten	7
1.2 Lentiviren	8
1.2.1 Genomische Struktur der Lentiviren	8
1.3 HIV und AIDS	9
1.3.1 AIDS: Geschichte	9
1.3.2 AIDS: Epidemiologie	9
1.3.3 HIV-Replikation	10
1.3.4 Chemokinrezeptoren	10
1.3.5 HIV-Pathogenese	11
1.4 HIV-Oberflächenproteine	11
1.4.1 Funktion bei der Infektion	11
1.4.2 Struktur des transmembranen Hüllproteins gp41	12
1.4.3 Konformation des transmembranen Hüllproteins von HIV	13
1.4.4 Die Struktur des Oberflächenhüllproteins gp120	15
1.4.5 Bildung von Antikörpern gegen die Hüllproteine	16
1.5 HIV: Therapie	17
1.5.1 Anti-HIV-Substanzen	17
1.5.2 Fusionshemmer	18
1.5.3 Klinische Studien mit Fusionshemmern und dem neutralisierenden Antikörper 2F5	19
1.5.3.1 T20	19
1.5.3.2 2F5	20
1.5.3.3 T21	21
1.5.3.4 Resistenzbildung bei der HIV-Therapie	21
2 Zielsetzung der Arbeit	23

3 Material und Methoden	24
3.1 Zellbiologische Methoden	24
3.1.1 Zellkultur	24
3.1.1.1 Kultivierung von C8166-Zellen	24
3.1.1.2 Kultivierung von HeLa-Zellen	25
3.1.1.3 Bestimmung der Zellzahl	26
3.1.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
3.1.2 Infektion der C8166-Zellen mit HIV	27
3.1.2.1 Infektion durch Zugabe von Virus	27
3.1.2.2 Infektion durch Kokultivierung	27
3.1.2.3 Herstellung eines Virusstocks	27
3.1.3 Isolieren von genomischer DNA aus Zellkulturen	28
3.1.4 Transfektion der HeLa-Zellen	29
3.1.4.1 Selektion der transfizierten Klone	30
3.1.4.2 Isolierung der transfizierten Klone	30
3.1.4.3 Nachweis transfizierter Klone mit FACS	30
3.1.4.4 Nachweis transfizierter Klone durch Immunfluoreszenzfärbung	31
3.1.5 Untersuchung der Resistenzbildung gegen den monoklonalen Antikörper 2F5	31
3.2 Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
3.2.1.1 PCR für die Klonierung von selektierten Sequenzen von gp41	33
3.2.1.2 Lysis-PCR	34
3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese	36
3.2.2 Klonierung	37
3.2.2.1 Restriktionsverdau von DNA	37
3.2.2.2 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel	38
3.2.2.3 Reinigung von DNA mittels Qiagen-Kit	38
3.2.2.4 Dephosphorylierung des Vektors	38
3.2.2.5 Ligation	39
3.2.3 Transformation	39
3.2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien	39
3.2.3.2 Transformation kompetenter Top10-Zellen mit pDisplay-Dp107 bzw. pDisplay-Dp178	40

3.2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)	41
3.2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Maxiprep)	41
3.2.3.5 DNA-Sequenzierung	41
3.2.3.6 Klonierungsschema	41
3.3 Proteinchemische Methoden	43
3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford	43
3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.3.3 Western Blot	45
3.3.4 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
4 Ergebnisse	48
4.1 Infektionshemmende Wirkung von Fusionshemmern	48
4.1.1 Infektionshemmende Wirkung von Dp178 (T20)	48
4.1.2 Infektionshemmende Wirkung von Dp107 (T21)	49
4.1.3 Infektionshemmende Wirkung des Dextran6-ISU-Peptids	50
4.2 Der neutralisierende Antikörper 2F5 hemmt die HIV-Replikation	51
4.3 Kooperation zwischen den Fusionshemmern und dem monoklonalen Antikörper 2F5	52
4.4 Analyse der Wirkung von Antikörpern gegen die ISU-Domäne auf die HIV-Replikation	53
4.5 Resistenzbildung nach der Behandlung mit dem neutralisierenden Antikörper 2F5	54
4.5.1 Resistenzbildung bei niedriger Antikörperkonzentration	54.
4.5.2 Charakterisierung der mutierten Viren	59
4.5.3 Wirkung von Dp178 und der Antikörper 2F5 auf die Replikation des mutierten Virus	62
4.5.4 Reproduzierbarkeit der Resistenzbildung bei niedriger Konzentration des Antikörpers 2F5	63
4.5.5 Resistenzbildung bei hoher Antikörperkonzentration	65
4.6 Wirkung des Antikörpers 2F5 und des Peptids Dp178 auf die Replikation des mutierten Virus	65
4.7 Expression von Fusionshemmern auf der Zelloberfläche als gentherapeutischer Ansatz	68
4.7.1 Klonierung von Sequenzen, die Dp107 bzw. Dp178 entsprechende	

rekombinante Proteine kodieren	68
4.7.1.1 Amplifikation dieser Sequenzen aus dem pNL4-3-Vektor	68
4.7.1.2 Klonierung der PCR-Produkte in den pDisplay-Vektor	69
4.7.1.3 Transformation von Top10- <i>E. coli</i> -Zellen	70
4.7.2 Transfektion der HeLa-Zellen mit pDisplay-Dp107 bzw. pDisplay-Dp178	71
5 Diskussion	77
5.1 Wie hemmt das Peptid Dp178 (T20) die HIV-Replikation?	77
5.2 Wie hemmt das Peptid Dp107 bzw. das ISU-Peptid die HIV-Replikation?	77
5.3 Wie hemmt der monoklonale Antikörper 2F5 die HIV-Replikation?	79
5.4 Entstehen resistente HIV-Stämme nach der Behandlung mit dem Neutralisierenden Antikörper 2F5?	80
5.5 Könnte das Peptid Dp178 in Kombination mit dem Antikörper 2F5 Synergistische oder additive Wirkung auf die HIV-Replikation haben?	82
5.6 Können Antikörper gegen die ISU-Domäne des gp41 die Replikation Von HIV hemmen?	84
5.7 Ein gentherapeutischer Ansatz als HIV-Therapie	85
5.8 Ausblick	87
6 Zusammenfassung	88
7 Literaturverzeichnis	89
Danksagung	97
Eidesstaatliche Erklärung	98

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
BIV	bovines Immundefizienzvirus
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton, $1,66 \times 10^{-24}$ g
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
Env	envelope
FIV	felines Immundefizienzvirus
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff
FKS	Fötales Kälber Serum
g	Erdbeschleunigung
Gag	group specific antigen
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HAART	Hoch Active Antiviral Therapie
HERV	humanes endogenes Retrovirus
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase
HTLV	Human-T-Lymphotropic Virus
IN	Integrase
kb	Kilobasenpaar
LB	Luria-Broth (Bakterienmedium)
LTR	long terminal repeats
mM	millimolar
min	Minute
NSI	nicht syncytiuminduzierendes HIV

OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
POD	Peroxidase
Pol	Polymerase
PR	Protease
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natruimdodecylsulfat
SI	syncytiuminduzierendes HIV
SIV	simian immunodeficiency virus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin,
T _m	Schmelztemperatur
TM	transmembranes Protein
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
U	Unit
w/v	Gewicht pro Volumen

Aminosäurecodes

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin

M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Taxonomische Zuordnung und Eigenschaften des humanen Immundefizienzvirus (HIV)

1.1.1 Retroviren

Die Familie der Retroviren wird von einer Gruppe von Viren gebildet, die aufgrund besonderer taxonomischer Charakteristika wie Struktur, Zusammensetzung und Eigenheiten des Replikationsverhaltens, zusammengefasst werden (Coffin, 1992; Coffin et al., 1997). Retrovirale Partikel haben einen Durchmesser von 80-130nm und enthalten ein 7-12 kD langes, in zwei Kopien vorliegendes, unsegmentiertes Plus-Strang RNA-Genom. Bezüglich ihrer Replikationsstrategie zeichnen sie sich vor allem durch zwei Besonderheiten aus, die sich im Auftreten der beiden Schlüsselenzyme Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) widerspiegeln (Vogt, 1997). Nach der Infektion der Zielzelle wird das virale RNA-Genom durch die Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben, ein Vorgang, der das bis dahin anerkannte, zentrale Dogma vom unidirektionalen Fluss genetischer Information (DNA-RNA-Protein) ablöste und der dafür verantwortlich ist, dass die gesamte Virusfamilie als "Retro"-Viren bezeichnet wurde (Familie Retroviridae). Als zweiter essentieller und charakteristischer Schritt ist im Replikationszyklus der Retroviren die Integration des nun in Form von DNA vorliegenden Genoms in das Zellgenom. Die humanen Immundefizienzviren (HIV) und die simianen Immundefizienzviren (SIV) gehören zu dieser Virusfamilie (Genus Lentivirus). Retroviren infizieren eine Reihe von Spezies einschliesslich des Menschen und verursachen eine Vielfalt von Krankheiten wie Tumore, Immunsuppressionen (AIDS, acquired immune deficiency syndrome) und haemolytische Anämie.

Das internationale Komitee für Virustaxonomie (2000) hat die Retroviren auf der Basis ihrer genetischen Struktur in sieben unabhängigen Gattungen unterteilt (Tabelle 1).

Tabelle 1 : Taxonomie der Familie Retroviridae

Genus	Wirte	Wichtige Vertreter
Alphavirus	Vögel	Rous-Sarkomvirus (RSV)
Betaretrovirus	Primaten, Mäusen	Maus-Mammatumovirus (MMTV)
Gammaretrovirus	Säuger, Reptilien, Vögel	Maus-Leukämievirus (MLV)
Deltaretrovirus	Mensch, Primaten, Rinder	Humanes T-Zell-Leukämieviren vom Typ 1 und 2 (HTLV-1 und HTLV-2)
Epsilonretrovirus	Fische, Schlangen	Walleye dermal sarcoma virus (WDSV)
Lentivirus	Mensch, Affen, Rinder etc.	Humane Immundefizienzviren vom Typ 1 und 2 (HIV-1 und HIV-2)
Spumavirus	Schimpanzen, sonstige Affen	Simianes Foamy Virus 1 (SFV-1)

Nach funktionellen Gesichtspunkten teilt man die Vertreter in die Gruppe der einfachen bzw. der komplexen Retroviren ein (Coffin, 1992). Während die simplen Retroviren nur die Gene für die strukturellen Komponenten der Viruspartikel sowie die Gene für die viralen Enzyme besitzen (*gag*, *pol*, *env*), verfügen die komplexen Vertreter der Familie zusätzlich über akzessorische Gene, die regulatorische Funktionen erfüllen.

1.1.2 Struktur der Retroviren

Die verschiedenen Retroviren haben Gemeinsamkeiten in ihrer Struktur. Die Partikel mit einem Durchmesser von 80 bis 130nm bestehen aus einem inneren Kapsid und einer Lipidhülle, in die die Hüllproteine (gp120 und gp41, im Fall von HIV) integriert sind. Das Kapsid schliesst das virale Genom in Form von zwei identischen RNA-Molekülen, tRNA und wichtige virale Enzyme wie die Reverse Transkriptase (RT) und die Integrase (IN) ein. Die RNA hat eine Grösse von ca. 7000 bis 11000 Nukleotiden und ist im Viruspartikel an ein Nukleoprotein gebunden (Abbildung 1).

Die Virushülle entsteht bei allen Retroviren bei der Freisetzung aus der Wirtszelle durch Knospung. Sie enthält daher verschiedene zelltypische Oberflächenproteine, z.B. HLA (human leukocyte antigen). Zudem werden zwei Virusproteine, das transmembrane Hüllprotein (TM) und ein glykosyliertes Oberflächenprotein (SU) in dieser Membran verankert.

Desweiteren unterscheiden sich die einzelnen Retrovirusarten in dem für sie typischen Kapsidprotein (Gag).

Die Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase findet man bei allen Retroviren und sie sind wichtiger Bestandteil des Replikationszyklus dieser Viren. Die Proteine P6, Vif, Vpr, Nef sind nur bei komplexen Retroviren wie HIV-1 zu finden.

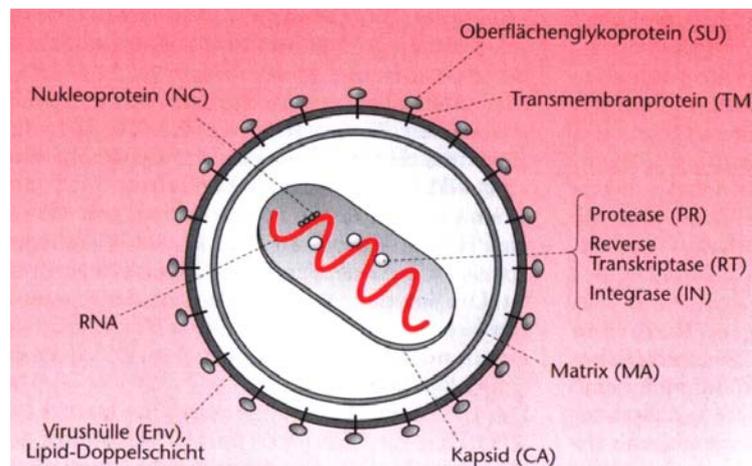


Abbildung 1: Morphologie der Retroviren am Beispiel von HIV-1. (Quelle: Medizinische Mikrobiologie; Köhler; Urban & Fischer Verlag)

1.1.3 Die Genomstruktur der Retroviren

Die Viren besitzen 2 Kopien ihres RNA-Genoms pro Viruspartikel. Das Genom kodiert für mindestens drei Proteine: Gag (group specific antigen), Pol (polymerase) und Env (envelope). Gag kodiert für das Kapsid-, das Matrix- und das Nukleokapsidprotein. Die Protease und die Reverse Transkriptase werden durch das *pol*-Gen, das Oberflächenhüllprotein sowie das transmembrane Hüllprotein werden durch das *env*-Gen kodiert (Abbildung 2).

LTRs (long terminal repeats) sind regulatorische Sequenzen an den beiden Enden des Genoms, die die Integration des Virusgenoms in die chromosomale DNA des Wirtes erlauben. Sie enthalten Promotor-, Transkriptionsaktivator- und Repressor-Sequenzen.

Nach der Aktivierung des viralen Promotors in der LTR werden diese Gene abgelesen. Die Produkte sind Polyproteine, d.h. sie müssen noch proteolytisch gespalten werden, um die funktionsfähigen Proteine zu bilden. Dies geschieht teilweise durch eine virale Protease (PR), die selbst im Pol-Protein kodiert ist und sich selbst von der Polymerase (Reverse Transkriptase, RT) und der Integrase abspalten kann. Gp160 wird von einer zellulären Protease im endoplasmatischen Retikulum gespalten.

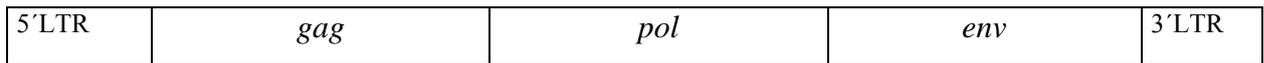


Abbildung 2 : Genomische Struktur der Retroviren

Die Retroviren haben einige Besonderheiten:

- 1) Sie sind die einzigen Viren, die zwei RNA-Kopien besitzen.
- 2) Sie sind die einzigen RNA-Viren, die nur von den wirtseigenen Transkriptions-Enzymen übersetzt und neusynthetisiert werden.
- 3) Sie sind die einzigen Viren, die eine spezifische zelluläre tRNA benötigen, die bei der reversen Transkription als Primer an der neuzubildenden LTR notwendig ist.
- 4) Sie sind die einzigen plusstrangorientierten Viren, bei denen das Genom nicht sofort als Matrize (mRNA) bei der Infektion benützt werden kann.

1.1.4 Humane Retroviren

Der Mensch war im Verlauf seiner Evolution und ist weiterhin mit Retroviren verschiedensten Ursprungs konfrontiert. Das Ergebnis dieser Auseinandersetzung ist zum einen die Verankerung von humanen endogenen Retroviren (HERVs) im menschlichen Genom. Die Tatsache, dass bis zu 5% des menschlichen Genoms aus diesen Sequenzen besteht, lässt die Vermutung zu, dass sie zweckvoll konserviert wurden. Bisher konnte noch kein infektiöses humanes endogenes Retrovirus isoliert werden. Darüber hinaus sind vier pathogene exogene Retrovirusarten bekannt, die von Mensch zu Mensch weitergegeben werden können. Zwei davon, HIV-1 und HIV-2, sind pathogenetisch die Auslöser für das erworbene Immundefizienzsyndrom AIDS. Die beiden anderen humanpathogenen Retroviren sind HTLV-1 und HTLV-2. Sowohl HIV-1 und HIV-2 als auch HTLV-1 und HTLV-2 gehen auf Infektionen durch Viren von anderen Primaten zurück, die genetisch verwandt sind.

1.1.5 Durch Retroviren hervorgerufene Krankheiten

Die Retroviren verursachen bei verschiedenen Tieren Leukämien oder Sarkome. 1980 wurden die humanen Retroviren HTLV-1 und HTLV-2 als Erreger der T-Zell Leukämie des Erwachsenen erkannt. Zwei weitere Retroviren, HIV-1 und HIV-2, wurden als Erreger von AIDS nachgewiesen. Die Tumore werden durch zufällige Integration von Virus-DNA ins Zellgenom durch

Aktivierung zellulärer Protoonkogene und damit durch Beeinflussung des Teilungsverhaltens der Zelle hervorgerufen.

Manche Retroviren haben in Folge von selten vorkommenden Rekombinationsereignissen zelluläre Protoonkogene in ihr Genom aufgenommen, deren Expression nicht mehr zell- und entwicklungspezifisch reguliert wird, sondern durch die Enhancer-Elemente des Virus in den infizierten Zellen und somit zur Tumorgenese beitragen. Zusätzlich kann durch die Ausschaltung von Tumorsuppressorgen eine Transformation der Zelle bewirkt werden (Alberts, 1995).

1.2 Lentiviren

Die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2 gehören zu den Lentiviren. Verwandte Lentiviren kommen bei Affen (simiane Immundefizienzviren, SIV), bei Katzen, Pumas und Löwen (feline Immundefizienzviren, FIV) sowie Rindern (bovine Immundefizienzviren, BIV) vor. Während einfache Retroviren im Wesentlichen nur über die drei Gene (*gag*, *pol*, *env*) verfügen, zeichnen sich Lentiviren durch akzessorische Gene aus. Diese kodieren für regulatorische Proteine, die für eine erhöhte Virusreplikation oder die Pathogenese dieser Viren verantwortlich sind.

1.2.1 Genomische Struktur der Lentiviren

Als Primatenlentiviren zählen HIV und SIV zu den komplexen Retroviren. Wie oben erwähnt, verfügen sie über akzessorische Gene, die für regulatorische Proteine kodieren. Bei HIV werden neun Gene unterschieden (Abbildung 3).

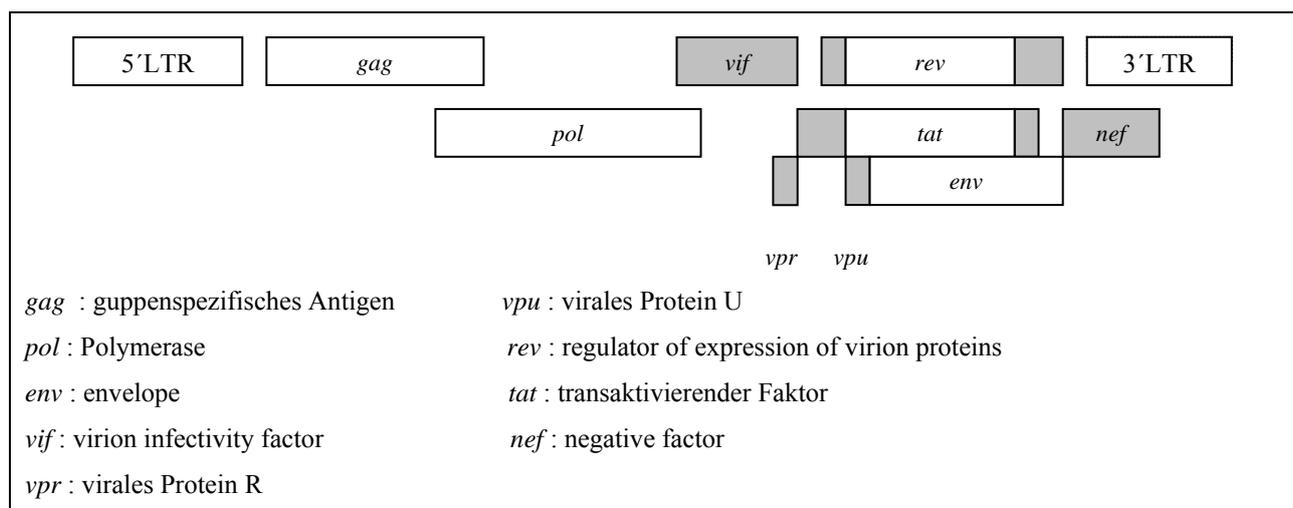


Abbildung 3 : Genomische Struktur der Lentiviren am Beispiel von HIV. Die grau gefärbten Bereiche bezeichnen Gene, die für regulatorische Proteine kodieren.

1.3 HIV und AIDS

1.3.1 AIDS: Geschichte

1981 wurden erste Fälle dieser neuen Krankheit in den USA beschrieben, 1982 tauchte die Krankheit dann auch in Europa auf. Später konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits 1950 Anti-HIV-1-Antikörper bei Untersuchten in Zentralafrika nachgewiesen wurden. In dem Zeitraum von 1970 bis 1975 musste sich das HIV in ganz Afrika ausgebreitet haben, bis es sich nach 1975 über Haiti in die USA und schliesslich nach Europa kam. Im Mai 1983 identifizierte der französische Wissenschaftler L. Montagnier das Virus bei einem Lymphadenopathie-Patienten. Er nannte das Virus LAV (Lymphadenopathie-assoziiertes Virus). Im selben Jahr identifizierte wiederum R. Gallo dasselbe Virus und nannte es HTLV-III (Human-T-Lymphotropic Virus III).

1985 wurde der erste HIV-1-Test auf den Markt gebracht. Er wies Antikörper gegen HIV-1-Oberflächenproteine nach. Seit 1985 werden Blutkonserven auf HIV-1-Antikörper untersucht.

1985/86 wurde der Rezeptor für HIV-1 entdeckt, CD4 auf den T-Helferzellen und Makrophagen.

1986/87 wurde der zweite AIDS-Erreger (HIV-2) nachgewiesen.

Der Ursprung von HIV-1, das weitaus verbreitete HIV, ist kaum noch umstritten. Seine enge Verwandtschaft zu dem SIV_{cpz}, welches aus Schimpansen isoliert wurde, und das gemeinsame Vorkommen in bestimmten Regionen lässt eine Transmission von Schimpansen auf den Menschen vermuten (Gao et al., 1999). Klarer ist der Ursprung von HIV-2, es ist das Ergebnis der Übertragung des SIVsm der Rauchgrauen Mangabe (sooty mangabey) auf den Menschen (Gao et al., 1994).

1.3.2 AIDS: Epidemiologie

40 Millionen Menschen Weltweit leben laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO vom 30.08.2002 mit HIV/AIDS. 37,2 Millionen davon sind Erwachsene (davon 17,6 Millionen Frauen) und 2,7 Millionen Kinder unter 15 Jahren. 5 Millionen Neuinfektionen wurden im Jahr 2001 registriert, davon 4,3 Millionen Erwachsene (davon 1,8 Millionen Frauen) und 800.000 Kinder unter 15 Jahren; das bedeutet 14.000 Neuinfektionen täglich.

Im Jahr 2001 sind drei Millionen Menschen an AIDS verstorben, davon 2,4 Millionen Erwachsene (davon 1,1 Millionen Frauen) und 580.000 Kinder unter 15 Jahre.

Die meisten Betroffenen (28,1 Millionen Menschen) leben im südlichen Afrika (Sub-Sahara). 6,1 Millionen in Süd- und Südost-Asien und 1,4 Millionen in Lateinamerika. In Westeuropa leben 560.000 Menschen mit HIV/AIDS.

1.3.3 HIV-Replikation

Das HIV kann CD4-positive Lymphozyten, aber auch andere Zellen, die den CD4-Marker an ihrer Oberfläche tragen, infizieren. Das CD4-Molekül ist der Hauptrezeptor für das HIV, an den das Oberflächenhüllprotein gp120 bindet. Daneben werden noch Chemokinrezeptoren, z.B. CCR5 oder CXCR4, als Korezeptoren benutzt. Personen mit homozygot fehlendem CCR5-Protein sind nahezu resistent gegen eine HIV-Infektion. Nach der Bindung wird HIV von der Zelle aufgenommen. Nach dem Uncoating erfolgt im Zytoplasma die reverse Transkription. Das Genom vom HIV wird in eine komplementäre DNA transkribiert. Die DNA wird zur dsDNA (doppelsträngige DNA) vervollständigt und ins Zellgenom eingebaut. Die Transkription zu Plus-Strang-RNA führt zu viraler mRNA und Genom-RNA der Virusnachkommen (Abbildung 4).

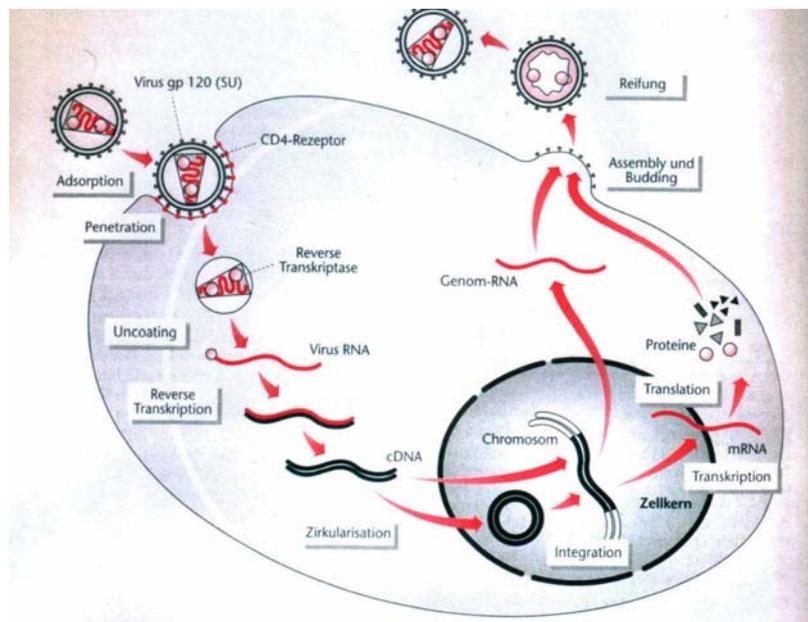


Abbildung 4: Replikationsschema von HIV-1 (Quelle: Medizinische Mikrobiologie; Köhler; Urban & Fischer Verlag)

1.3.4 Chemokinrezeptoren

1996 wurde entdeckt, dass HIV für die Bindung an der Zielzelle zusätzlich zum CD4-Rezeptor (Broder et al., 1993) einen Korezeptor benötigt (Doranz et al., 1997). Die Bindung an die Chemokinrezeptoren erfolgt nach der Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor und verursacht eine Konformationsveränderung in gp120. Diese Konformationsveränderung bewirkt eine strukturelle Umfaltung des gp41, die dann zur Fusion von HIV mit der Zielzelle führt. Die Unterschiede in Chemokinrezeptoren, die auf der Zelloberfläche existieren, erklären, wie unterschiedliche HIV-

Stämme die Zellen selektiv infizieren. Es gibt T-trope oder syncytiuminduzierende (SI) HIV-Stämme, die spezifisch mit dem Chemokinrezeptor CXCR4 interagieren und Lymphozyten infizieren (Doranz et al., 1996). M-trope Stämme dagegen interagieren mit dem CCR5-Chemokinrezeptor und infizieren Makrophagen. Diese Stämme induzieren keine Syncytien (NSI). Es gibt auch Dual-trope-Stämme, die sowohl T-Zellen als auch Makrophagen infizieren können (Rucker et al., 1996). Von den Korezeptoren ist der CCR5-Rezeptor der häufiger vorkommende. Durch einen Schalter wird CXCR4 eingeschaltet. In der Anfangsphase der Infektion sind vorwiegend R5-Stämme vorhanden, die durch eine Glykosylierung an einem der variablen Loops des gp120 (V3) vor neutralisierenden Antikörpern geschützt werden, allerdings weniger pathogen sind (Polzer et al., 2001). Erst später setzen sich nach und nach die pathogeneren X4 Stämme durch.

R5-Stämme sind früh im Infektionsablauf vorhanden und hauptsächlich verantwortlich für die Übertragung von HIV.

1.3.5 HIV-Pathogenese

AIDS liegt eine Unterdrückung der humoralen und zellvermittelten Immunität zugrunde. Nach Infektion mit HIV treten bei einigen Patienten Mononukleose-ähnliche Krankheitszeichen auf. Darauf folgt eine asymptomatische Phase (Latenzphase), die nach Monaten bis Jahren in eine generalisierte Lymphadenopathie (LAS, Lymph-Adenopathie-Syndrom) und schliesslich zum manifesten Immundefizienzsyndrom AIDS führt, das durch das Auftreten von opportunistischen-Infektionen und seltener Tumoren charakterisiert ist.

1.4 HIV-Oberflächenproteine

1.4.1 Funktion bei der Infektion

Die HIV-1-Hüllglykoproteine sind notwendig beim Eindringen des Virus in die Targetzelle. Der Komplex der Hüllproteine ist verantwortlich für die Bindung des Virus an die Zelloberfläche und für die Membranfusion, durch die das Virus in die Zelle eindringen kann.

Die Hüllproteine von HIV-1 werden zunächst als ein glykosylierter 160-kDa Vorläufer synthetisiert (gp 160). Durch die proteolytische Spaltung wird gp160 in zwei Proteine zerlegt:

Das Oberflächenhüllprotein (gp120) und das transmembrane Hüllprotein (gp41) (Luciw, 1996; Freed and Martin, 1995). Die Untereinheiten des Env-Komplexes bilden ein Oligomer (Trimer

aus drei gp120 und drei gp41) und sind durch nichtkovalente Interaktion auf der Oberfläche des Virions miteinander verbunden.

Auf der Oberfläche der Targetzelle bindet das gp120 zunächst an seinen Rezeptor CD4, was zu Konformationsänderungen innerhalb des gp120 führt und die Bindungsstelle für den Korezeptor freilegt. Die Bindung an den Korezeptor führt zu weiteren temperaturabhängigen Konformationsänderungen im gp120 und ermöglicht dem gp41 das Eindringen in die Zellmembran mit Hilfe des N-terminalen Fusionspeptid (Golding et al., 2002). Gp120 löst sich möglicherweise dabei durch die geschwächten hydrophoben Wechselwirkungen vom gp41 ab. Spezifische Regionen von der gp41-Ectodomäne müssen miteinander interagieren, um eine fusionsaktive Konformation zu bilden, bei der das Fusionspeptid exponiert ist. Das Oberflächenhüllprotein von HIV durchläuft ähnliche Umstrukturierungen wie das Hämagglutinin von Influenza, das allerdings pH-abhängig umgefaltet wird (Carr et al., 1997).

Das Fusionspeptid von Influenza-Virus scheint in der Anfangsphase des Fusionsprozesses in die Membran der Targetzelle einzudringen (Stegmann et al., 1991; Tsurudome et al., 1992).

Die Zugabe von löslichen CD4 verstärkt die Infektiösität einiger Virusisolate. Das zeigt, dass die gp120/gp41-Konformationsveränderung induziert durch CD4 eine wichtige Rolle bei der Membranfusion spielt. (Allan et al., 1990). Das Oberflächenhüllprotein von HIV-1 kann auch die Fusion von infizierten Zellen mit den nichtinfizierten begünstigen. Dieses Phänomen ist als Syncytiumbildung bekannt. Diese Syncytiumbildung wird in den mit HIV-1 infizierten Zellkulturen beobachtet, ist aber sicher nicht verantwortlich für die zytopathischen Effekte bei der Infektion. Der Eintritt des Virus in die Zelle ist ein komplexer Prozess, der viele Proteininteraktionen benötigt und jede dieser Interaktionen ist ein potenzielles Ziel für die Entwicklung von antiviralen Komponenten.

1.4.2 Struktur des transmembranen Hüllproteins gp41

Gp41 besteht aus drei Hauptdomänen: der extrazellulären, der transmembranen, und der intrazellulären Domäne.

Die Ectodomäne des gp41 enthält drei Bereiche, die direkt an der Membranfusion beteiligt sind. So befindet sich ein glycinreiches Fusionspeptid am N-Terminus. Dieser hydrophobe Bereich ist für die anfängliche Penetration während des Fusionsprozesses auf der Zielzelle sehr wichtig (Gallagher et al., 1987; Kowalski et al., 1991). Im Bereich von gp41, der sich zwischen dem Fusionspeptid und der transmembranen Domäne erstreckt, befinden sich zwei hydrophobe Regionen, sogenannte „heptad repeats“, zwischen denen ein Cystein-Cystein-Loop liegt. Dieser Cystein-

Cystein-Loop stellt eine immundominante Domäne dar (Gnann et al., 1987; Denner et al., 1994). Den Helices wird eine entscheidende Rolle bei der Fusion des Virus mit der Wirtszelle zugesprochen. Innerhalb der ersten Helix befindet sich auch die sogenannte immunsuppressive Domäne (ISU-Domäne) (Denner et al., 1994).

Im N-terminalen zytoplasmatischen Bereich von gp41 befinden sich zwei amphiphatische Domänen, LPP1 und LPP2, für die eine hohe Affinität zu Calmodulin nachgewiesen werden konnte (Miller et al., 1993) (Abbildung 5).

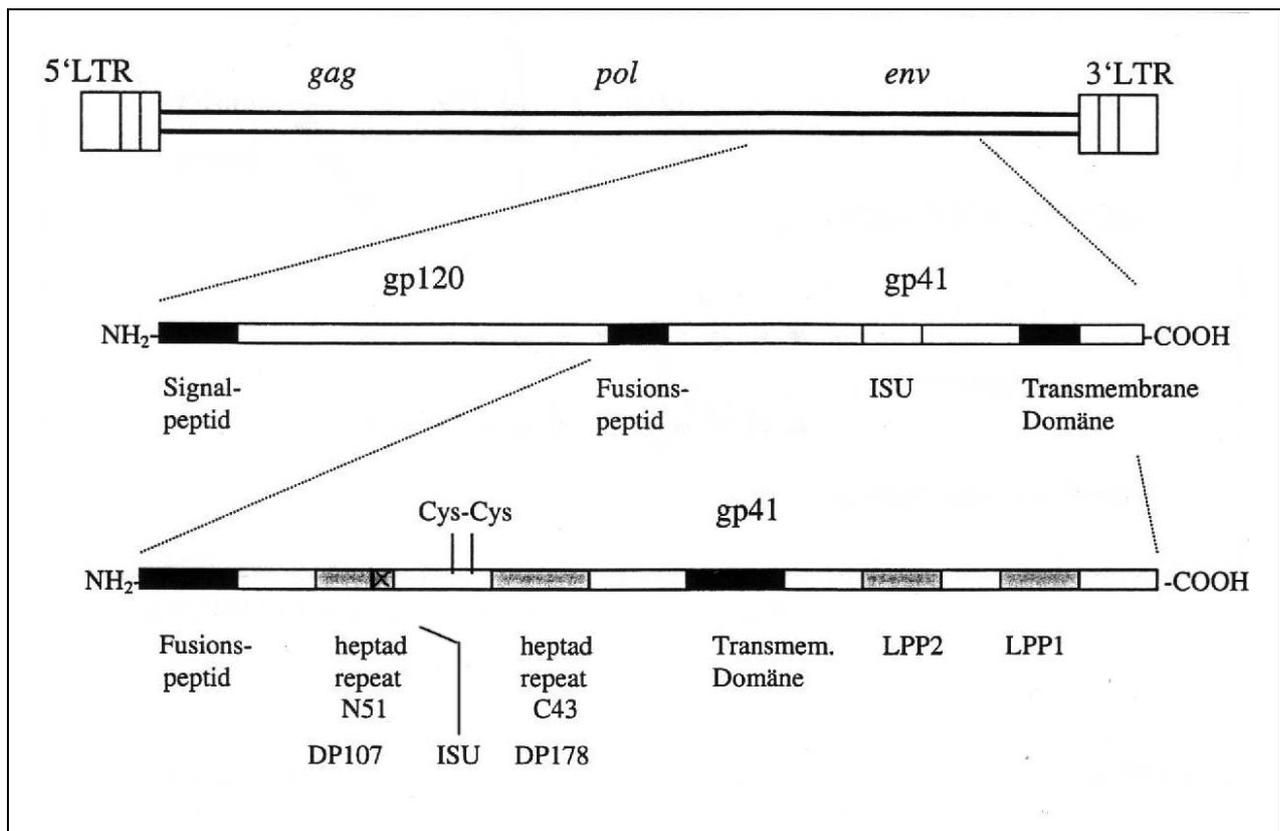


Abbildung 5 : Das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 und seine Domänen

1.4.3 Konformation des transmembranen Hüllproteins von HIV

Die „heptad repeats“ mit einer Länge von etwa 51 (N51) und 43 Aminosäuren (C43) sind helicale Regionen am N- bzw. C-Terminus von gp41. Zwischen diesen Bereichen liegt eine 33 Aminosäure grosse Region, die den Cystein-Cystein-Loop enthält. Die stabile Konformation ist eine Loop-Struktur, in der sich die „heptad repeats“ anti-parallel zueinander ausrichten. Diese Hairpin-Struktur bestehend aus 2 antiparallelen Helices repräsentiert mit hoher Wahrscheinlichkeit die fusionsaktive Konformation von gp41 (Lu et al., 1995).

Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass gp41 einen trimeren Komplex aus diesen antiparallelen Strukturen bildet. In der Mitte dieser Struktur befindet sich ein Trimer aus parallelen N51-Superhelices. Um diesen Kern sind drei C43-Superhelices angeordnet (Chan et al., 1997). Diese Struktur wird durch Interaktionen hydrophober Reste auf beiden Helices stabilisiert. Die Lage dieser hydrophoben Gruppen ist hoch konserviert, was die Bedeutung dieser Struktur bestätigt. Es wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um ein wesentliches Element des Fusionsprozesses handelt. Peptide mit homologen Sequenzen zu N51 (Dp107) und C43 (Dp178) inhibieren den Fusionsprozess, indem sie die Bildung dieses trimeren Komplexes verhindern (Wild et al., 1993). Ähnliche Befunde wurden auch für das immunsuppressive (ISU-) Peptid erhoben. Dieses Peptid entspricht einer Domäne am C-terminalen Ende von Dp107, die bei allen Retroviren hochkonserviert ist. Gekoppelt an ein Trägerprotein hemmt das entsprechende ISU-Peptid die Replikation von HIV-1 (Denner et al., 1994; Qureshi et al., 1990).

Die Trimerisierung und die Fusion der Virus- und Zellmembran nach der Interaktion der gp41 heptad repeats sind in Abbildungen 6 und 7 gezeigt.

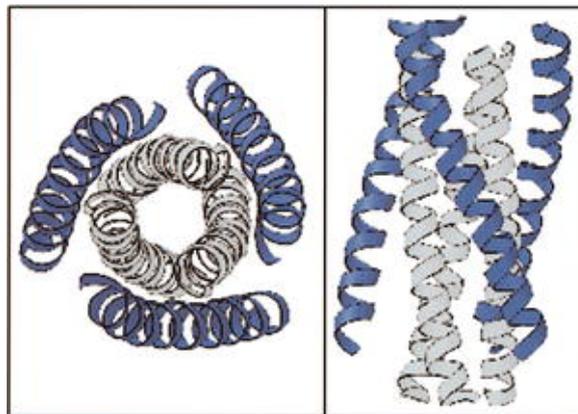


Abbildung 6 : Trimerisierung der Untereinheiten des transmembranen Proteins gp41 von HIV-1

(Quelle: Chan et al., 1997 ; Cell ; 89: 266)

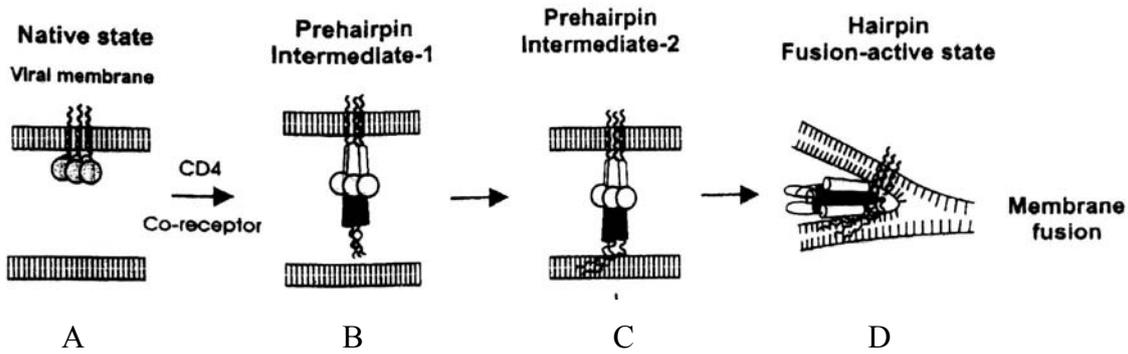


Abb.7: Der Mechanismus der Membranfusion. Nach der Bindung an CD4- und den Korezeptor (A) vollzieht gp41 eine Konformationsänderung (B), dadurch dringt das Fusionspeptid des gp41 in die Zellmembran der Zielzelle ein (C). Durch Zusammenklappen der Helices nähern sich die Membranen aneinander an und fusionieren miteinander (D)
(Quelle: *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8. S: 566)

1.4.4 Die Struktur des Oberflächenhüllproteins gp120

Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass gp120 in zwei Domänen aufgeteilt ist: eine innere, die dem gp41 zugewandt ist und eine äussere, die auf der Oberfläche dieses Komplexes exponiert ist. Diese beiden Domänen sind durch ein überbrückendes Blatt (β -Faltblatt-Struktur) voneinander getrennt. Die Bindung an CD4 induziert eine Konformationsänderung in gp120, was dieses Blatt aufdeckt und die innere und äussere Domäne zueinander bewegt. Die meisten Kohlenhydrat-Moleküle, die an gp120 binden, sind an der äusseren Domäne gebunden. Das entspricht der Beobachtung, dass das Virus die Kohlenhydrat-Reste benötigt, um Antigen-Epitope auf gp120 zu maskieren (Wyatt et al., 1998).

Die Bindungsstellen für CD4 und die Chemokinrezeptoren sind innerhalb verschiedener Virusstämme hoch konserviert und bestehen aus räumlich separierten Sequenzen, die sich in Folge einer Umstrukturierung des gp120 nähern.

Das HIV-1-gp120 enthält 5 konservierte Regionen (C1-C5) und 5 variable Regionen (V1-V5). Unter den variablen Domänen ist V3 besonders wichtig. Die V3-Sequenz wird in Folge der Bindung von gp120 an CD4 aufgedeckt und bindet dann an den Chemokinrezeptor (Choe et al., 1996; Trkola et al., 1996; Wu et al., 1996). Diese Schleife besteht aus 30 Aminosäuren und enthält zwei Cystein-Reste, die eine Disulfid-Brücke ausbilden. Auf dem Gipfel der V3-Schleife existiert eine konservierte Sequenz, der Rest ist variabel. Diese Variabilität ist verantwortlich dafür, dass verschiedene HIV-Stämme unterschiedliche Zielzellen infizieren, d.h. die V3-Schleife bestimmt die Bindung an den entsprechenden Chemokinrezeptor (Speck et al., 1997). Gp120 be-

inhaltet auch hoch konservierte Strukturen, die erst nach der Bindung an CD4-Rezeptor sichtbar werden und die möglicherweise an der Chemokin-Rezeptor-Bindung beteiligt sind. Diese durch CD4-Bindung induzierte Exposition kann durch Verwendung bestimmter Antikörper gegen gp120, die die Bindung des CD4-gp120 Komplexes an den Chemokinrezeptor blockieren, nachgewiesen werden (Wu et al., 1996). Die Bindung an CD4 löst eine Konformationsänderung in dem Oberflächenglykoprotein aus, die zu Konformationsänderungen auch im gp41 und zur Exposition des Fusionspeptids führt.

1.4.5 Bildung von Antikörpern gegen die Hüllproteine

Während der HIV-Infektion werden neutralisierende Antikörper gegen verschiedene Epitope von gp120 und gp41 gebildet.

Bei vielen HIV-1-Infizierten Individuen wurden zwei Klassen von neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen (Wyatt et al., 1998): Stammspezifische- und kreuzreaktive Antikörper.

Die stammspezifischen Antikörper erscheinen unmittelbar nach der Infektion und sind gegen lineare Determinanten innerhalb von gp120 (V3) gerichtet. Diese Antikörper können auch experimentell bei Primaten und anderen Tieren induziert werden, sie sind jedoch nicht allgemein schützend. Es gibt weitere neutralisierende Antikörper, die Konformationsepitope innerhalb von gp120 erkennen. Diese Epitope bestehen aus nichtkontinuierlichen Sequenzen, die in Folge einer Faltung zueinander kommen und das Epitop bilden. Solche Epitope werden allerdings erst nach der CD4/gp120-Bindung zugänglich. Die Induktion dieser allgemein-neutralisierenden Antikörper in tierischen Systemen durch Einsatz von Wild-Typ-gp120 als Immunogen stellt eine vaccinologische Herausforderung dar und war bisher nicht erfolgreich.

Die neutralisierenden Antikörper sind vorwiegend gegen konservierte bzw. variable Regionen gerichtet, die in der Nähe von Rezeptorbindungsstellen lokalisiert sind, während die Antikörper, die keine neutralisierende Aktivität besitzen, gegen andere Regionen gerichtet sind. Ausser den Sequenzen auf gp120, die von neutralisierenden Antikörpern erkannt werden, werden auch neutralisierende Antikörper gegen einige Elemente von gp41 gebildet wie z.B. die Aminosäuresequenzen 654-678 sowie 735-753 (Chanh et al., 1986; Broliden et al., 1992). Ein neutralisierender Antikörper wurde aus einem Patienten isoliert und als monoklonaler Antikörper (2F5) hergestellt. Dieser Antikörper erkennt die Sequenz ELDKWA (669-674) auf der C-terminalen Domäne von gp41 (Muster et al., 1993; Buchacher et al., 1994; Conley et al., 1994). ELDKWA-spezifische Antikörper wurden in den Seren der meisten HIV-infizierten Individuen nachgewiesen (Horal et al., 1991). Das 2F5-Epitop ist im Vergleich zu den gp120-Sequenzen, die von den

neutralisierenden Antikörpern erkannt werden, stärker konserviert. Untersuchungen haben gezeigt, dass das 2F5-Epitop kein lineares Epitop ist und die Sequenz ELDKWA in gp41 nur ein Teil vom 2F5-Epitop darstellt (Neurath et al., 1995).

1.5 HIV: Therapie

1.5.1 Anti-HIV-Substanzen

Der Replikationszyklus von HIV-1 ist in Abbildung 4 detailliert dargestellt. Die antiretrovirale Therapie kann an verschiedenen Stellen des Replikationszyklus angreifen, vor dem Eintritt in die Zielzelle, und nach dem Eintritt. Die seit 1996 eingesetzte hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) setzt sich aus mindestens drei Medikamenten zusammen. Es stehen zurzeit vier Medikamentenklassen zur Verfügung: die Proteasehemmer (PIs), die nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Hemmer (NRTIs), die nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Hemmer (NNRTIs) und die Fusionsinhibitoren (bisher noch nicht zugelassen, zurzeit in Phase III). Die derzeit angewandten antiviralen Substanzen haben allerdings einige Nachteile: Viele Patienten können die toxischen Effekte dieser Substanzen nicht tolerieren (Carr et al., 1999; Williamson et al., 1999), oder aufgrund von Mutationen entstehen Resistenzen gegen eine oder mehrere der Substanzen (Richmann, 1996; Wong et al., 1997; Gunthard et al., 1998).

Aus diesen Gründen war es notwendig, nach den Medikamenten zu suchen, die weniger toxisch, effektiver sind und den Virus-Eintritt verhindern. Der HIV-Eintritt in die Zielzelle besteht aus drei Schritten:

- (1) gp120/CD4-Bindung, eine kritische Phase für die Anheftung des Viruspartikels an der Zielzelle.
- (2) gp120/Korezeptor-Wechselwirkung, ein Ereignis in Folge der gp120/CD4-Bindung, durch die die Korezeptor-Bindungsstelle auf gp120 exponiert wird.
- (3) gp41-vermittelte Membranfusion.

Jeder von diesen drei Schritten kann als Ziel für Inhibitoren des Eintritts von HIV in die Zelle angesehen werden, dementsprechend gibt es drei Kategorien von Eintrittshemmer:

- (1) Hemmer der Bindung von gp120 an CD4
- (2) Hemmer der Bindung von gp120 an die Korezeptoren
- (3) Hemmer der Fusion.

Manchmal werden auch die ersten zwei Hemmer als Fusionshemmer bezeichnet, da sie auch keine Membranfusion erlauben, hier werden jedoch nur die Substanzen als Fusionshemmer bezeichnet, die die gp41-vermittelte Fusion hemmen.

1.5.2 Fusionshemmer

Die inhibitorische Aktivität der Peptide, die von den N- und C-terminalen Helices abgeleitet werden, basiert auf die Hemmung der Wechselwirkungen dieser Helices (Schu et al., 2000). Ähnliche Strukturen und Wechselwirkungen wurden auch für SIV beschrieben (Caffrey et al., 1998).

Die ersten Fusionshemmer stellten von gp41 abgeleitete Peptide, die den Domänen Dp107 und Dp178 entsprachen, dar (Wild et al., 1992; Wild et al., 1994b). Parallel dazu konnte gezeigt werden, dass auch kleinere Peptide, die hochkonservierten Sequenzen der N-terminalen Helix, der immunsuppressiven Domäne entsprachen, die Replikation von HIV hemmen können, wenn sie an ein Trägermolekül gekoppelt waren (Denner et al., 1994; Qureshi et al., 1990). Im Unterschied zu den Dp107 und Dp178 Peptiden waren sie ungekoppelt nicht aktiv, was sich durch die geringere Bindungsfläche erklären lässt.

Die Eigenschaften der Fusionshemmer können wie folgt zusammengefasst werden:

- (1) Beide Peptide hemmen die Fusion.
- (2) Die C-terminalen Peptide sind in der Hemmung der HIV-vermittelten Membranfusion effektiver als die N-terminalen. Zum Beispiel ist der IC_{50} -Wert (die Konzentration des Peptids, bei der die Infektion zu 50% gehemmt wird) des Peptids Dp178 mehr als 1000 fach kleiner als IC_{50} des Peptids Dp107 (Wild et al., 1992; Wild et al., 1994b). Das lässt sich damit erklären, dass die Dp107-Domäne des gp41 als trimerer Stamm vorliegt und deshalb weniger Dp178-Peptid benötigt wird, um das Zusammenklappen der Helices zu verhindern, als umgekehrt.
- (3) Die C-terminalen Peptide haben eine breitere Anti-HIV-Aktivität, die nicht auf Typ oder Subtyp des Virus beschränkt ist.
- (4) Die C-terminalen Peptide können die Infektion sowohl mit zellfreiem als auch mit zellassoziertem HIV hemmen (Jiang et al., 1993; Wild et al., 1994b).
- (5) Die C-terminalen Peptide haben ein Minimum an Längenforderung, um die Infektion hemmen zu können (≥ 28 Aminosäuren) (Shu et al., 2000). Die Verkürzung des C-terminalen Peptids beiden Enden reduziert die Hemmaktivität des Peptides. Längere C-Peptide scheinen eine höhere Hemmaktivität zu haben (Jiang et al., 1995).

Man vermutet, dass diese erhöhte Hemmaktivität der längeren Peptide auf tertiäre Strukturen zurückzuführen ist, die die Wechselwirkung zwischen den Helices im gp41 verhindern. Deshalb kann das immunupressive Peptid auch nur als Konjugat an ein Trägermolekül wirksam sein (Denner et al., 1994; Qureshi et al., 1990).

Tabelle 2 zeigt weitere Peptide, die gegen gp41 gerichtet sind.

Tabelle 2 : Fusionshemmer

Peptide***, die von der C-terminalen Helix abgeleitet wurden und mit der N-terminalen Helix bzw. dem Fusionspeptid interagieren	SJ-2176*	New York Blood Center, New York, USA
	Dp-178 (T20)**	Duke University and Trimeris, Inc. Durham, NC, USA
	T-1249	Trimeris, Inc. Durham, NC, USA
	C34	Weill Medical College of Cornell University, NY, USA
	D10-PX-2K	MIT, Cambridge, MA, USA
	ADS-J1***	New York Blood Center, New York, USA
Peptide, die von der N-terminalen Helix abgeleitet wurden und mit der C-terminalen Helix interagieren	Dp-107 (T21)	Duke University , Inc. Durham, NC, USA
	N36	Weill Medical College of Cornell University, NY, USA
	Helix-5	MIT, Cambridge, MA, USA
Peptide, die ein Teil der N-terminalen Helix darstellen und nur als Konjugat wirksam sind	ISU-Peptid	Denner et al., 1994, Qureshi et al., 1990.

* interagiert mit dem Fusionspeptid, ** könnte auch mit dem Fusionspeptid und der Dp107-Domäne interagieren, ***ADS-J1 ist kein Peptid

1.5.3 Klinische Studien mit Fusionshemmern und dem Antikörper 2F5

1.5.3.1 T20

T20 ist eine andere Bezeichnung für das Peptid Dp178, dessen Effektivität *in vitro* gezeigt worden war. In einer Studie (Kilby et al., 1998) erhielten 16 HIV-infizierte Patienten dieses Peptid in vier verschiedenen Dosierungen (3, 10, 30 und 100mg zweimal täglich) intravenös über 14 Tage. 7 Patienten waren vor dieser Studie noch nie mit antiretroviralen Substanzen behandelt, die übrigen hatten bereits eine antiretrovirale Therapie erhalten (danach im Mittel 33 Tage Therapiepause). Die mittleren Ausgangswerte hinsichtlich der HIV-RNA betragen 58884 Kopien/ml und die mittlere Zahl der CD4+ T-Zellen war 212/ml. Dosisabhängig zeigte sich ein Abfall der HIV-

RNA. Alle vier Patienten mit der Höchstdosis T20 (100mg) zeigten einen Abfall der Plasma HIV-RNA auf < 500 Kopien/ml, was einem mittlerem Abfall von $1.96 \log_{10}$ entsprach. Diese Studie zeigte erstmals, dass die Hemmung der gp41-vermittelten Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran der Zielzelle nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* mit T20 möglich ist und ist somit primär als "proof of principle" Studie zu verstehen. T20 ist die erste Substanz, die sowohl in den USA als auch in Europa zugelassen werden soll. Da bereits die erste Studie die Entwicklung von Resistenzen nach 15 Tagen zeigte, ist der Einsatz von T20 nur in Kombinationstherapien vorstellbar.

Um einen antiviralen Effekt mit den Peptiden zu erreichen, müssen sie in einer grossen Menge genommen werden. Sie können nicht oral verabreicht werden und sie haben extrem kurze Halbwertszeit (Eckert et al., 1999).

Das Ziel einer gentherapeutischen Studie war, diese Nachteile zu umgehen. In dieser Studie wurden die T-Helfer-Zellen mit einem retroviralen Vektor transfiziert, der die T20 entsprechende Sequenz trägt. Vor der kodierenden T20-Sequenz wurde eine Signal-Sequenz lokalisiert, die dazu führt, dass T20 nach der Expression auf die Zelloberfläche transportiert wird (Hildinger et al., 2001). Die HIV-Replikation konnte in diesen Zellen 100fach besser gehemmt werden, und die HIV-Stämme konnten gehemmt werden unabhängig davon, welchen Korezeptor sie verwenden.

Es kann sein, dass *in vivo* eine zytotoxische Antwort gegen die Zellen entwickelt wird, die das Konstrukt tragen oder Antikörper gebildet werden, die den Effekt von T20 aufheben, oder sogar die Zellen durch Antikörper-vermittelte Zellyse zerstören.

1.5.3.2 2F5

In einer klinischen Studie haben 7 HIV-1-positive Freiwillige, die bis dahin keine antivirale Therapie bekommen hatten und sich in der asymptomatischen Phase der Krankheit befanden, acht Infusionen Antikörper 2F5 und 2G12 intravenös, innerhalb von 28 Tage bekommen (1g je Antikörper pro Infusion). Vor dem Beginn der Studie haben die Patienten eine Viruslast von $3,83 \log_{10}$ im Durchschnitt gehabt, und während der Studie keine weitere antivirale Therapie bekommen. Am Ende der Studie (Tag 28) haben drei von sieben Patienten eine Virussenkung in Plasma bis über $1,46 \log_{10}$ Kopien/ml gezeigt. Bei zwei von sieben Patienten konnte eine vorübergehende Reduktion an Viruslast zum Beginn der Therapie beobachtet werden. Ein Patient hat in der gesamten Zeit der Therapie einen undetektierbaren Level an Virus gehabt, ein weiterer zeigte keine Antwort auf den Antikörper 2F5. Obwohl diese Studie auf eine kleine Gruppe be-

schränkt ist und keine Kontrollgruppe hat, zeigt sie, dass die Therapie mit dem HIV-1-spezifischen monoklonalen Antikörper Virusreplikation kontrollieren kann. Der Antikörper 2F5 wurde immer in Kombination mit einem neutralisierenden Antikörper gegen gp120, 2G12, appliziert (Stiegler et al, 2002).

1.5.3.3 T21

T 21 ist eine andere Bezeichnung von Dp107. Da das Peptid Dp107 weniger effektiv bei der Hemmung der HIV-Replikation ist und nur bei höheren Dosen wirkt, wurde T21 bisher noch nicht in der Klinik erprobt.

1.5.4 Resistenzbildung bei der HIV-Therapie

Die meisten antiretroviralen Medikamente wirken nicht viruszerstörend, sondern greifen in deren Replikation ein. Sie hemmen dabei für die Replikation notwendige Enzyme. Unabhängig davon, ob ein Individuum mit einem einzigen Stamm von HIV, sozusagen dem Wildtyp, oder mit einer Mischpopulation infiziert wurde, treten mit der Zeit Mutationen auf, die durch die Reverse Transkriptase (RT) beim Umschreibevorgang von RNA zu DNA im Laufe des HIV- Vermehrungszyklus verursacht wurden. Das einfach gebaute virale RT-Protein verfügt über keinen "proof-reading"-Mechanismus, der Umschreibevorgang ist dadurch mit einer hohen Fehlerrate behaftet. Es kann davon ausgegangen werden, dass pro Replikationszyklus mehrere falsche Nukleotide (Mutationen) in das Virusgenom eingebaut werden. Dies hat zur Folge, dass bei einem HIV-Infizierten eine Vielzahl genetisch unterschiedlicher Virustypen, sogenannte Quasispezies, nebeneinander existiert. Die Fähigkeit von HIV, durch Mutation sein Erbgut und damit seine Proteine zu verändern, bildet die Grundlage für den Wirkverlust antiretroviraler Medikamente. Unter einer Therapie mit antiretroviralen Substanzen haben HIV-Populationen mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber den eingesetzten Medikamenten einen Replikationsvorteil gegenüber dem Wildtyp. Durch den Selektionsdruck einer antiretroviralen Therapie werden resistente Viren als vorherrschende HIV-Quasispezies selektiert. Resistenz gegenüber Inhibitoren der Reversen Transkriptase und gegenüber Protease-Hemmern ist die Folge einer Akkumulation von Mutationen an den entsprechenden aktiven Zentren der viralen Enzyme. Häufige Ursachen einer Resistenzentwicklung sind unregelmässige Medikamenteneinnahmen, unzureichende Medikamentenspiegel (hohe intra- und interindividuelle Variabilität in der Resorption und Metabolisierung) sowie die Übertragung von resistenten Viren. Zur Durchführung einer optimalen Therapie ist die Resistenzbestimmung von grosser Wichtigkeit. Bei einer genotypischen Resistenz-

bestimmung wird virales Erbmaterial auf das Vorhandensein von bekannten Resistenzmutationen untersucht. Obwohl dieses Testverfahren einfach und schnell durchzuführen ist, gibt es Schwierigkeiten bei der Zuordnung einzelner Mutationen oder von Kombinationen von Mutationen zu einer Minderung der Empfindlichkeit für die einzelnen antiretroviralen Substanzen. Bei der phänotypischen Resistenzbestimmung wird das HI-Virus *in-vitro* auf die Sensibilität gegen eine oder alle antiretroviralen Wirkstoffklassen getestet. In diesem Testverfahren, das in Zellkulturen erfolgt, wird gemessen, wie hoch die Konzentration eines antiretroviralen Wirkstoffs ist, die zur Unterdrückung der Virusreplikation nötig ist. Auch für den Fusionshemmer T20 (Dp178) wurden Fluchtmutationen *in vitro* nachgewiesen. Die Mutationen traten im Bereich der N-terminalen Domäne auf, an die das Peptid bindet, um das Zusammenklappen der Helices zu verhindern (Rimsky et al., 1998). Die Mutationen führen dazu, dass Dp178 nicht stabil genug an die Dp107-Domäne von gp41 binden kann. Für den neutralisierenden Antikörper 2F5 sind Fluchtmutanten noch nicht untersucht. Sequenzanalysen von primären HIV-Isolaten zeigten jedoch, dass einige wenige durch 2F5 nicht neutralisiert werden. Die Analyse dieser nicht-suszeptiblen Isolate hat gezeigt, dass die wichtigsten Aminosäuren für die Bindung von 2F5 an sein Epitop (ELDKWA) LDKW sind (Purtscher et al., 1996). Die nicht-suszeptiblen Virusstämme zeigen Mutationen in D und K Positionen im ELDKWA-Epitop (Trkola et al., 1995). Dabei wurde also gezeigt, dass Aminosäureaustausche von D zu N, von D zu E, von K zu N und von K zu E die Bindung von 2F5 an sein Epitop verhindern (Purtscher et al., 1994 und 1996).

2 Zielsetzung der Diplomarbeit

Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll die Wirkung von zwei synthetischen Peptiden, die von Helices des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1 abgeleitet wurden, auf die Replikation von HIV-1 untersucht werden. Dabei soll die Wirkung des Peptids Dp178 (ein von der C-terminalen Helix des gp41 abgeleitetes Peptid), des Peptids Dp107 (ein von der N-terminalen Helix des gp41 abgeleitetes Peptid) und des ISU-Peptids (ein von der immunsuppressiven Domäne des gp41 abgeleitetes Peptid) analysiert werden.

Als Modell wurde HIV-1/IIIB auf lymphoiden C8166-Zellen gewählt. Die Infektion mit HIV-1 soll mittels p24Gag-Nachweis im ELISA und Provirusintegration in der PCR nachgewiesen werden.

Weiterhin soll die neutralisierende Aktivität des monoklonalen Antikörpers 2F5, der an ein Epitop in der C-terminalen Helix von gp41 bindet, und seine Wirkung in Kombination mit den Fusionshemmern auf die Replikation von HIV-1 untersucht werden.

Da die Resistenzbildung in der HIV-Therapie ein grosses Problem darstellt und es bekannt ist, dass nach Behandlung mit dem Peptid Dp178 *in vitro* resistente HIV-Stämme auftreten, soll untersucht werden, ob durch die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 in einer mit HIV-1/IIIB infizierten C8166-Zellkultur resistente HIV-Stämme selektiert werden.

Zusätzlich soll die Wirkung eines weiteren monoklonalen Antikörpers, B3, auf die HIV-1-Replikation untersucht werden. Der monoklonale Antikörper B3 bindet an das Epitop ILAVERYLKD in der immunsuppressiven Domäne von gp41. Da bei nichtinfizierten Personen mit hoher Exposition gegenüber HIV-1, IgA-Moleküle gefunden wurden, die das Epitop QARILAV erkennen, ist diese Untersuchung von grossem Interesse.

Neben der Behandlung mit fusionshemmenden Peptiden und neutralisierenden Antikörpern, ist ein gentherapeutischer Ansatz eine weitere Alternative für die HIV-Therapie. Es soll im Rahmen dieser Arbeit eine Zelllinie gewonnen werden, die rekombinante Proteine, die den Peptiden Dp107 bzw. Dp178 entsprechen auf ihrer Oberfläche exprimieren.

3 Material und Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 Kultivierung von C8166-Zellen

Bei C8166-Zellen handelt es sich um eine permanente, lymphoide T-Zelllinie humanen Ursprungs. Es handelt sich dabei um einen Subklon von CR63/R_{II}-4 Zellen, die durch *in vitro*-Fusion von primären Blutzellen aus der Nabelschnur und HTLV-1-produzierenden Zellen gewonnen worden sind. Die HTLV-1-produzierenden Zellen stammen von einem Patienten mit einer T-Zell-Leukämie. C8166-Zellen enthalten mindestens ein HTLV-1-Provirus und exprimieren p40 Tax, produzieren aber keine Viruspartikel, da sie alle anderen dafür notwendigen Gene von HTLV-1 nicht tragen. Sie sind sehr suszeptibel für die Infektion mit HIV-1, was sie zu einer geeigneten Basis für ein *In vitro*-Infektionsmodell macht (Ongradi et al., 2000).

C8166-Zellen

ATCC (American Type Culture Collection)

C8166-Medium

- 10ml L-Glutamin : 2mM (Biochrom KG)
- 5ml Streptomycin, Penicillin (SP 10000µg/ml, Biochrom KG)
- 5ml HEPES (1M, Biochrom KG)
- 50ml Fötale Kälbeserum :10% (Biochrom KG)
- 500ml RPMI-Medium (RPMI 1640 Medium1x, Biochrom KG)
- Zellkulturflaschen : NUNCLONTM Surface; Roskilde; Dänemark
- Inkubator : BBD 6220; Heraeus

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in Zellkulturflaschen bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchte von 95% in Kultur gehalten. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert und mit frischem Medium versorgt. C8166-Zellen bilden in der Kultur Zellaggregate.

Vor jeder Passage wurden diese Aggregate durch Aufrichten der Flaschen sedimentiert. Das alte Medium wurde abgenommen, die Zellen wurden vereinzelt und 1:3 bzw. 1:4 verdünnt und mit neuem, auf 37°C vorgewärmtem Medium versorgt.

3.1.1.2 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die HeLa-Zellen stellen eine epitheloide Zell-Linie dar, die von einem Zervix-Karzinom einer Patientin abstammt, es sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, Helene Lange zurück.

HeLa-Zellen : ATCC (American Type Culture Collection)

HeLa-Zellen-Medium

- 10ml L-Glutamin : 2mM (Biochrom KG)
- 5ml Streptomycin, Penicillin (SP 10000µg/ml; Biochrom KG)
- 7,5ml HEPES (Biochrom KG)
- 50ml Fötale Kälbeserum =10% (Biochrom KG)
- 500ml DMEM-Medium (Dulbeccos Minimal Essential Medium, Biochrom KG)

weitere Materialien und Chemikalien

- Trypsin/EDTA: 25%, pH=7,2 (DIFCO, USA)
- PBS Puffer (Phosphat Buffered saline) „ohne Ca²⁺, Mg²⁺“, pH 7,2: 8,0g/l NaCl, 0,20g/l KCl, 1,15g/l Na₂HPO₄*2H₂O, 0,2g/l KH₂PO₄
- Zellkulturflaschen : NUNCLON™- Surface; Roskilde; Dänemark
- Inkubator : BBD 6220; Heraeus

Da die HeLa-Zellen adhären wachen und ein Monolayer in der Flasche bilden, wird angestrebt, dass die Zellen nicht mehr als 90% Konfluenz in der Kulturflasche erreichen. Ist der Boden der Kulturflasche vollständig besiedelt, können die Zellen aufgrund einer Kontaktinhibierung nicht mehr wachsen. Aus diesem Grund wurden die Zellen dreimal in der Woche 1:5 passagiert. Dazu wurde zuerst das alte Medium komplett abgenommen und die Zellen wurden mit 10ml kalzium- und magnesiumfreiem PBS-Puffer gewaschen. Das FKS muss vollständig entfernt werden, weil es die Aktivität von Trypsin verringert, was zum Ablösen der Zellen von der Kulturflasche verwendet wurde. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 2ml Trypsin/EDTA Lösung für 3-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei zu langer Inkubation mit Trypsin wirkt dieses zytotoxisch, daher wurde die Trypsinierung unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Aktivität von Trypsin wurde dann durch Zugabe von 8ml Medium mit FKS gestoppt. Die Zellen wurden einzeln und 1:5 verdünnt und mit frischem, auf 37°C vorgewärmtem Medium versorgt.

3.1.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Trypanblaufärbetest verwendet, der eine Aussage über die Lebensfähigkeit bzw. Vitalität der Zellen erlaubt. Prinzip des Testes ist, dass bei lebenden Zellen bestimmte Farbstoffe aufgrund intakter Zellmembran nicht ins Zellinnere eindringen, während tote Zellen sich mit dem Farbstoff anfärben können. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann.

Materialien

Neubauerzählkammer

Chemikalien

Trypanblau 0,4% in PBS (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer mikroskopisch ermittelt. Dazu wurde ein Deckglas mit vorsichtigem aber kräftigem Druck auf die zuvor angehauchte Zählkammer aufgeschoben. Nachdem die Newton-Farbenringe auf beiden Deckglaträgern sichtbar geworden sind, wurde die Zählkammer mit der Zellsuspension beschickt. Dafür wurden die Zellen gut verteilt und mit der Trypanblau im Verhältnis 1:1 vermischt. Die Zellen in 4 grossen Quadraten der Netzteilung der Kammer wurden gezählt und der Mittelwert wurde ermittelt.

3.1.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Gefrierkonservierung erhält die Lebensfähigkeit, die physiologischen Eigenschaften, die biochemische Aktivität und die genetische Stabilität von Zellen über lange Zeiträume. Für das Überleben der Zellen sind vor allem die Abkühl- und Auftaugeschwindigkeiten wichtig. Man vermeidet einen Kälteschock durch Zusätze von Gefrierschutzmitteln, wie Dimethylsulfoxid DMSO, das als stark polare Verbindung Wasser bindet, die Bildung von Eiskristallen verhindert und dadurch auf Makromoleküle stabilisierend wirkt.

Materialien :

DMSO : Sigma Aldrich Deisenhofen, Deutschland

Einfriermedium: Serum (FKS) + 10% DMSO

Die Zellen wurden zuerst bei 1500 rpm (500xg) 8 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in serumhaltiges Medium gewaschen und nochmals 8 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in Einfriermedium aufgenommen, resuspendiert und in Kryoröhrchen abgefüllt. Da DMSO in ungefrorenem Zustand toxisch auf die Zellen wirken kann, wurden die Röhrchen sofort auf Eis gestellt. Um ein langsames Runterkühlen zu gewährleisten, wurden die Zellen in einem Styroporbehälter bei -80°C für 24 Stunde tiefgekühlt. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in den -196°C flüssigen Stickstoff überführt.

Adhärente Zellen wurden in einem 37°C warmem Wasserbad schnell aufgetaut und sofort in einer Kulturflasche mit auf 37°C vorgewärmtem Medium verdünnt. Nach vier Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C) wurde das Medium gewechselt. Suspensionzellen wurden nach dem Auftauen im Wasserbad unter der Sterilbank mit 10ml auf 37°C vorgewärmtem Medium versorgt und nochmal zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen.

3.1.2 Infektion der C8166-Zellen mit HIV

3.1.2.1 Infektionen durch Zugabe von Virus

Das Virusisolat HTLV/IIIB wurde von Fr. Dr. Kücherer (RKI) zur Verfügung gestellt. Zum Infizieren der C8166-Zellen wurden 100µl steril filtrierte Virusisolat auf 25ml Zellen in Kultur gegeben. Die Zellen wurden weiter kultiviert und täglich unter dem Mikroskop auf Synzytienbildung untersucht. Die Sterilfiltration wurde mit einem Filter mit einer Porengröße von 0,45µm durchgeführt. Kleinere Porengrößen haben grössere Schereffekte für die Oberflächenproteine des Virus und verringern damit die Infektionseffizienz.

3.1.2.2 Infektion durch Kokultivierung

Jedes Mal nach dem Passagieren der infizierten C8166-Zellen (alle 3-4 Tage) wurden sie mit vereinzelt nicht-infizierten C8166-Zellen versorgt. Durch Kokultivierung wurden die nichtinfizierten Zellen mit den Viruspartikeln, die von den infizierten Zellen produziert werden, infiziert.

3.1.2.3. Herstellung eines Virusstocks

Um ein einheitliches Virusstock für weitere Versuche herzustellen wurden zuerst 6 grosse (je 50ml) Flaschen mit infizierten C8166-Zellen angesetzt. Nach 3-maligem Passagieren und Versorgen mit frischen Zellen wurde der Überstand aus allen Kulturflaschen abgenommen, mitein-

ander vermischt und nach steriler Filtration (0,45µm) in Kryo-Eppendorf-Gefäßen aliquotiert (je 1ml), und bei flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.3 Isolieren von genomischer DNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von DNA aus menschlichen Zellen wurde ein QIAamp DNA Blood Mini Kit verwendet.

Materialien:

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, 01/99)

PBS

Proteinase K : 20mg/ml, Invitrogen)

Ethanol : 96-100% (Roth, Deutschland)

Die Zellen wurden zuerst bei 500xg für 10 min abzentrifugiert, das Pellet wurde mit PBS gewaschen und wieder pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200µl PBS aufgenommen, resuspendiert und in einem Eppendorftube mit 40µl Proteinase K überführt. Zu dieser Mischung wurden 200µl Puffer AL hinzugefügt und dreimal je 5 Sekunden gevortext bis eine homogene Mischung gebildet wurde. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 56°C wurde die Mischung abzentrifugiert und es wurden 200µl Ethanol (96%) dazugegeben. Die Mischung wurde durch dreimal je 5 Sekunden Vortexen gemischt und kurz abzentrifugiert. Diese Mischung wurde dann auf eine Säule gegeben (QIAamp DNA Blood Kit). Diese Säule beinhaltet einen Filter, der DNA durch ionische Wechselwirkungen bindet. Die Säule wurde in ein Eppendorftube platziert und bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschliessend wurde sie wie folgt behandelt: a) 500µl Puffer AW1 und zentrifugieren bei 8000 rpm für eine Minute. b) 500µl Puffer AW2 und Zentrifugieren bei 14000 rpm für 3 Minuten. c) eine zusätzliche Zentrifugation bei 14000 rpm für eine Minute, damit AW Puffer vollständig entfernt wurden. Die festgehaltene DNA im Filter der Säule wurde dann in 30µl destilliertes Wasser aufgenommen. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen, wurde die Säule nach der Zugabe vom Wasser für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde bei -20°C für weitere Versuche gelagert.

3.1.4 Transfektion der HeLa-Zellen

Transfektion bezeichnet das Einführen einer Fremd-DNA in eine Eukaryotenzelle. Die Expression der neu-aufgenommenen erfolgt durch den Proteinbiosynthese-Apparat der transfizierten Zelle.

Es gibt verschiedene Methoden, um fremde DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Das verwendete Transfast-Reagenz basiert auf kationischen Liposomen (Lipofektion). Die erste Beschreibung dieser Methode stammt von Felgner et al., 1987. Die Lipofektion der ersten Generation war noch ein Ein-Komponenten-System, bei dem nur das kationische Lipid N[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) verwendet wurde. Durch Mischen DOTMA mit einem ungeladenen Helferlipid, z.B. L-Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), kann die Fusion mit der Zelle erleichtert werden (Rose et al. 1991). Es folgt kein Einschluss der DNA in die Liposomen, sondern eine ionische Bindung an die Oberfläche der Liposomen (Kabanov et al., 1995 and Labat-Moleur et al., 1996). Durch die Bildung dieses DNA-Lipid-Komplexes wird die negative Ladung der DNA neutralisiert, was den Durchgang der DNA durch die negative Zellmembran erleichtert (Gao and Huang, 1995). Die DNA-Liposomen-Komplexe binden wahrscheinlich an negativ geladene Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche, allerdings ist Aufnahmeprozess im Detail noch nicht aufgeklärt.

Materialien:

TransFast™ Transfection Reagent : Promega USA

Geneticin : 50mg/ml (GIBCO)

Ein Tag vor der Transfektion wurden auf einer 24-Well-Platte 5×10^4 /Well HeLa-Zellen (1ml) ausgesät. Nach 24h waren die Zellen zu 80% konfluent und bereit für Transfektion. Die Transfektion wurde mit folgenden DNA-Konstrukten durchgeführt (s. Klonierung):

pDisplay-Dp107 (pDisplay-Vektor beinhaltet Dp107 als Insert)

pDisplay-Dp178 (pDisplay-Vektor beinhaltet Dp178 als Insert)

pDisplay-gp41 (pDisplay-Vektor beinhaltet komplettes gp41)

Die Transfektionsmischungen für jeweils 6 Well-Platten wurden bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Von den 24h vorher ausgesäten Zellen wurde das Medium abgenommen und in jedes Well wurden 200µl von der entsprechender Transfektions-Mischung gegeben (je Konstrukt 6 Wells). Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde jedem Well 1,8ml auf 37°C vorgewärmtes Medium zugegeben und weiter inkubiert.

3.1.4.1 Selektion der transfizierten Zellen

Nach der Transfektion wurden die Zellen in nichtselektivem Medium, anschliessend in einem selektiven Medium kultiviert (nach ca. 2 Tagen). In diesem Medium überleben nur die Zellen, die DNA aufgenommen haben. Die Selektion der transfizierten Zellen wurde mit Geneticin (G418) durchgeführt. Nach Bestimmung der idealen Konzentration zur Selektion durch eine Verdünnungsreihe mit Geneticin von 700µg/ml bis 200µg/ml wurden dem Medium 500µg/ml Geneticin zugesetzt.

3.1.4.2 Isolierung der transfizierten Klone

Um die transfizierten Klone zu isolieren, wurden sie auf 3 Petrischalen zu 10ml verteilt und mit 500µg/ml Geneticin inkubiert. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt bis sich einzelne Zellinseln ausgebildet hatten. Die Zellklone wurden einmal mit PBS gewaschen und mit trypsin-getränkten Filterplättchen (Cloning Discs, 3mm, steril, SIGMA) abgelöst. Anschliessend wurden sie in eine 12-Well-Platte überführt. Kolonien wurden isoliert und getrennt weiterkultiviert, um genetisch einheitliche Zelllinien zu erhalten. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden sie in Zellkulturflaschen überführt und weiter kultiviert. Um nachzuweisen, dass diese Klone das klonierte Insert tragen und das entsprechende Peptid exprimieren, wurde eine FACS-Messung durchgeführt bzw. im Immunfluoreszenzmikroskop analysiert.

3.1.4.3 Nachweis transfizierter Klone mit FACS

Im FACS (fluorescence activated cell sorting) wird die Zellsuspension in einem sehr feinen Strahl durch das Licht eines Anregungslasers geführt. Sobald der Laserstrahl auf markierte Zellen trifft, emittieren diese ihr Fluoreszenzsignal, das von empfindlichen Photomultipliern registriert und als Impuls aufsummiert wird. Mit diesem Gerät kann eine positive Zelle unter 1000 identifiziert werden.

Die zu analysierenden Zellen wurden nach der Abnahme des Mediums mit einem Zellschaber in 5ml Waschlösung (PBS + 2% FKS, Biochrom KG) abgelöst. Zum Ablösen der Zellen wurde kein Trypsin verwendet, da Trypsin die Oberflächenproteine zerstören könnte. Nach dem Ablösen wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und nochmal mit 5ml Waschlösung gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1ml Waschlösung aufgenommen und mit 1ml Erstantikörper gemischt. Zum Nachweis der Expression von Dp107 wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das immunsuppressive Peptid von HIV-1 (Antikörper B3, 5µg/ml), zum Nachweis der Expressi-

on von Dp178 ein monoklonaler Antikörper, der mit dem Epitop ELDKWA in gp41 reagiert (Antikörper 2F5, 1µg/ml), verwendet. Nach 45 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert und das Pellet wurde anschliessend in 1ml Waschpuffer aufgenommen und mit 1ml Zweitantikörper (Anti-Human-FITC-IgG, 1:1500 für den Antikörper 2F5, Anti-Maus-FITC-IgG, 1:1500 für den Antikörper B3) gemischt. Die Zellen wurden 45 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurden sie dreimal mit Waschpuffer gewaschen und das Pellet wurde komplett trocknen gelassen und in 500µl Paraformaldehyd (1%) fixiert. Danach folgte die Messung am FACS-Gerät (FACScalibur; Becton Dickinson).

3.1.4.4 Nachweis transfizierter Klone durch Immunfluoreszenzfärbung

Um die Transfizierten HeLa-Zellen unter Immunfluoreszenzmikroskop beobachten zu können, wurden sie zuerst von der Platte abgelöst (Zellschaber) und bei 500xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml Medium aufgenommen und auf 3-Loch Objektträger (je 200µl/Loch) gegeben. Die Objektträger wurden im Brutschrank inkubiert bis die Zellen zu 80% konfluent waren (ca. zwei Tage). Die Zellen wurden dann wie folgt für Immunfluoreszenzmikroskopie gefärbt:

Die Zellen samt Objektträger wurden mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und mit 2% Formaldehyd in PBS für 1h bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5min) mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) wurden die Objektträger in 5% Magermilchpulver in PBS für 1h bei Raumtemperatur blockiert. Zum Nachweis des Peptids Dp107 wurde 150µl/Loch Antikörper B3 (10µg/ml) und zum Nachweis des Peptids Dp178 ebenfalls 150µl/Loch Antikörper 2F5 (2µg/ml) verwendet und 1h bei 37°C inkubiert. Um den 1. Antikörper zu detektieren wurden 150µl/Loch anti-Maus-FITC-IgG (für den Antikörper B3) bzw. anti-Human-FITC-IgG (für den Antikörper 2F5) je 1:1000 eingesetzt und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jeder Inkubation erfolgte ein dreimaliges Waschen in PBS je 5min. Die Zellen wurden dann mit einem Tropfen Eindeckmedium (ProLong Antifade Kit) eingedeckt und mit einem Deckglas versehen. Nach einem Tag erfolgte die Mikroskopie.

3.1.5 Untersuchung der Resistenzbildung gegen den monoklonalen Antikörper 2F5

Materialien:

- Antikörper 2F5 (Stammlösung : 10mg/ml)
- C8166-Zellen infiziert mit HIV-1/IIIB (Wildtyp)

Um die Entwicklung eines resistenten Virusstammes verfolgen zu können, wurden die mit HIV/IIIB-Isolat infizierten C8166-Zellen in Anwesenheit von 0,3µg/ml Antikörper 2F5 kultiviert. Vorher wurde aus einem Teil der Zellen genomische DNA isoliert. Die anderen Zellen wurden alle 3-4 Tagen passagiert, nach jedem Mediumwechsel wurde die entsprechende Menge des Antikörpers dazu gegeben und die lysierten Zellen wurden mit frischen nicht-infizierten Zellen versetzt. Nach 4 Wochen wurde ein Teil der Zellen weiter, und der andere Teil ohne Antikörper kultiviert, um eine eventuelle Rückmutation zu beobachten. Dieser Versuch wurde zweimal mit derselben Konzentration an 2F5 durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurde eine höhere 2F5-Konzentration eingesetzt (300µg/ml). Zu allen Zeitpunkten wurde genomische DNA isoliert und sequenziert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Mullis and Faloona, 1987). Eine DNA-Polymerase synthetisiert einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäurenmatrize. Dazu werden Startermoleküle, kurze komplementäre DNA-Fragmente (Primer) benötigt, die am 5'-Ende der zu amplifizierenden Matrizen-DNA binden. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert die Polymerase den neuen DNA-Strang. Bei der PCR werden synthetische Oligonukleotide aus etwa 15 bis 30 Desoxynukleotiden verwendet. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares kann die DNA-Sequenz zwischen den Primern gezielt vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte. Die einzelnen Reaktionsschritte eines Zyklus sind:

Denaturierung: Bei etwa 90-95°C wird die Matrizen-DNA aufgeschmolzen. Es entstehen einzelsträngige DNA-Moleküle.

Hybridisierung: Die synthetischen Oligonukleotide binden bei Temperaturen, die spezifisch für die Primer sind (Annealingtemperatur), an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA (Template).

Polymerisation : Vom 3'-Ende der Primer ausgehend wird der Gegenstrang des Templates durch eine DNA-Polymerase synthetisiert. Die hier gewählte Temperatur entspricht in der Regel dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase.

Bei den Polymerasen für die PCR hat vor allem die hitzestabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* Verwendung gefunden. Ihr ungewöhnliches Temperaturoptimum von 72°C führt zur Reduktion unspezifischer Reaktionen. Ihre Fehlerquote ist mit 1/80.000 sehr gering.

Materialien:

- PCR-Puffer (10x) : 1,5mM MgCl₂, Roche
- Taq-Polymerase : Amplitaq gold : 5U/μl, Roche
- dNTP-Mix : 10mM, PE Applied Biosystems, Californien, USA
- Primer 1 u. 2 : s. jeweilige Durchführung
- PCR Gefässe : Micro Amp, Applied Biosystems; Californien; USA
- PCR Cycler : PTC-200, MJ Research

3.2.1.1 PCR für die Klonierung von selektierten Sequenzen von gp41

Um die Sequenzen, die den Helices Dp107 und Dp178 entsprechen, zu amplifizieren, wurde der Vektor pNL4-3, der ein komplettes HIV-Genom trägt, verwendet. Die Primer (SIGMA ARK, Darmstadt) trugen *Bgl*III - bzw. *Pst*I-Schnittstellen, um die amplifizierten Fragmente einfacher in den entsprechenden Vektor klonieren zu können. Die amplifizierten Fragmente hatten eine Grösse von 203bp (Dp107) bzw. 171bp (Dp178).

Materialien:

Primer zum Amplifizieren der Sequenz von Dp107 :

(15) Gp41-FPdel-HIS-forward-Bc (Länge : 41mer), T_m : 72,7°C

Sequenz : CCA GAT CTG GCT GCA CGT CAA TGA CGC TGA CGG TAC AGG CC

(I) Dp107 PstI rev (Länge : 39mer), T_m : 86,6°C

Sequenz : CCT GAG CTG CAG ACC CCA AAT CCC CAG GAG CTG TTG ATC

PstI-Schnittstelle

Primer zum Amplifizieren der Sequenz von Dp178 :

(II) Dp178 BglIII fw (Länge : 32mer), T_m : 68,6°C

Sequenz : GAA GAT CTA TGG AGT GGG ACA GAG AAA TTA AC

BglIII-Schnittstelle

(III) Dp178 PstI rev (Länge : 34mer) , T_m : 77,2°C

Sequenz : CCT GAG CTG CAG ATA CCA CAG CCA ATT TGT TAT G

PstI-Schnittstelle

PCR-Ansatz:

- 1 µl (~15ng) Template (pNL4-3)
- 12,5 pmol Primer (15) bzw. (II)
- 12,5 pmol Primer (I) bzw. (III)
- 2 µl dNTP-Mix (10mM)
- 2,5 µl 10x Polymerase-Puffer
- 0,5 µl Amplitaq gold

PCR-Programm:

- 5 min 95°C
 - 45 sec 95°C
 - 45 sec 50°C
 - 1 min 72°C
 - 5 min 72°C
 - ∞ 4°C
- } x25

3.2.1.2 Lysis-PCR

Um die Integration des Provirus in das Genom der Wirtszelle als Indikator für eine Infektion nachzuweisen, wurden die in 96-well Platten behandelten C8166 Zellen lysiert und mittels Proteinase K wurde die genomische DNA von Proteinen (Histonen) befreit. Die DNA wurde dann mittels PCR untersucht.

Materialien:

Lysispuffer : 8,9 ml ddH₂O, 1 ml 10x PCR-Puffer (1,5mM MgCl₂, Roche), 100 µl Proteinase K (20mg/ml, Invitrogen)

Peptide:

Dp107 : (JERINI AG, Deutschland)

Dp178: (Multiple Peptide Systems, Californien, USA)

Dp178Δ: (JERINI AG, Deutschland)

2F5 : 10mg/ml (Hermann Katinger, Institut für Angewandte Mikrobiologie, Wien)

Virus-Isolat HIV-1/III B

Die Lyse-PCR wurde als eine der Nachweismethoden für die Infektion und den Einfluss von Hemmstoffen auf die Infektion eingesetzt. Dafür wurden C8166-Zellen auf einer 96-Well-Platte ausgesät (100µl; 5x10⁴/Well). Die Zellen wurden auf der Platte mit 50µl vorverdünntem Virusisolat HIV/IIIB in Anwesenheit von verschiedenen Hemmstoffen infiziert. Die Hemmstoffe wie Dp107, Dp178 und der Antikörper 2F5 wurden separat und in Kombination auf der Platte ausverdünnt. Es wurde immer eine 3-fach-Bestimmung durchgeführt, um eine statistische Aussage treffen zu können. Die Platten wurden dann für 3 Tage im Brutschrank kultiviert.

Danach wurden die Zellen unter dem Mikroskop beobachtet und die Synzytienbildung analysiert. Anschliessend wurden die Platten bei 400g für 10 Minuten zentrifugiert (Plattenrotor) und der Überstand wurde abgenommen. Die Zellen wurden 3-4 Mal eingefroren und wieder aufgetaut, um die Plasmamembran durch Bildung von Eiskristallen zu perforieren. Nach Zugabe von 50µl/Well Lysispuffer wurden die Platten bei 56°C für 3 Stunden inkubiert (Aktivitätstemperatur von Proteinase K). Danach wurde die Aktivität von Proteinase K durch Inkubation für 30 Minuten bei 95°C gestoppt.

Um die unspezifischen Primerbindungen, die aufgrund von Sequenzähnlichkeiten eventuell zu Stande kommen, auszuschliessen, wurde zusätzlich eine Nested-PCR durchgeführt. Hierfür wurden Primer eingesetzt, deren Bindungsstellen sich innerhalb der *Pol*- bzw. *Int*-Sequenzen befinden.

Primer zum Nachweis von HIV

Pol-Primer:

(A) **gp40F1** (Länge: 28 ; Tm: 73,6°C)

Sequenz : TCT TAG GAG CAG CAG GAA GCA CTA TGG G

(B) **gp41R1** (Länge: 28 ; Tm: 71,2°C)

Sequenz : AAC GAC AAA GGT GAG TAT CCC TGC CTA A

Pol-Nested-Primer:

(C) **gp46F2** (Länge: 30 ; Tm:68,4°C)

Sequenz : ACA ATT ATT GTC TGG TAT AGT GCA ACA GCA

(D)**gp47R2** (Länge: 30 ; Tm: 63,7°C)

Sequenz : TTA AAC CTA TCA AGC CTC CTA CTA TCA TTA

Int-Primer:

(F) **intF1** (Länge: 30 ; Tm: 79,1°C)

Sequenz : AGT GCT GCA GTT AAG GCA GCC TGT TGG TGG

(G)**intR1** (Länge: 30 ; Tm: 77,6°C)

Sequenz : CTA CCT GCC ACA CAA TCA TCA CCT GCC ATC

Int-Nested-Primer:

(H)**intF2** (Länge: 30 ; Tm: 68,1°C)

Sequenz : AAG AGA TCA AGC TGA ACA TCT TAA GAC AGC

(I) **intR2** (Länge: 29 ; Tm: 70,8°C)

Sequenz : TGT ATT ACT ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA

Mittels einer Gradienten-PCR wurden die Annealingtemperaturen der Pol- und Int-Primer optimiert. Hierfür wurde ein Temperaturgradient von 50-70°C eingesetzt. 60°C wurde als Tempera-

turoptimum für die Pol-Primer und 63°C für die Int-Primer ermittelt. Die Menge an eingesetztem Template (Zelllysate) wurde durch einen PCR-Ansatz mit verschiedenen Mengen an Template optimiert (4µl).

PCR-Ansatz: (Beispiel : mit Pol-Primer)

- 4µl Template
- 2,5µl 10x PCR-Puffer
- 2µl dNTP-Mix (10mM)
- 12,5pmol Primer A
- 12,5pmol Primer B
- 0,5µl Amplitaq-Gold (5U/µl)
- ad. 25µl

PCR-Programm:

10min	95°C	} x35
1min	95°C	
1min	60°C	
1min	72°C	
10min	72°C	
∞	4°C	

3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld. Agarose besteht aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose und dient als interne Matrix, in dem DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld wegen ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode wandern.

Zur Detektion werden die Gele mit Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid), einem DNA-interkalierenden Farbstoff gefärbt.

Materialien:

- Agarose : Agarose NEEO, Ultra Qualität; (Roth)
- Probenpuffer: BlueJuice, Gel loading buffer, (Invitrogen)
- Tris-Acetat-Puffer: 0,04M Tris-Acetat (Merck), 0,01M EDTA
- Gelkammer: Mini SUB Cell, (BioRad)
- UV-Detektor: Geldoc 2000 ; (BioRad)
- Marker: 100 bp DNA Ladder (GIBCO BRL), 1 kb Plus DNA Ladder (GIBCO BRL)
- Ethidiumbromid: 10mg/ml (Sigma Aldrich , Deisenhofen, Deutschland)

Die DNA-Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese charakterisiert. Je nach Größe der zu trennenden DNA wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,7-1,5% (w/v) hergestellt. 20µl der DNA-Lösung wurden mit 2µl Probenpuffer versehen und aufgetragen. Probenpuffer erhöht die Dichte der Lösung und damit kann DNA-Lösung besser in die Geltaschen sinken.

6µl DNA-Standard (1:4 verdünnt) wurden aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung wurde bei einer Spannung von 100-110V durchgeführt. Die Färbung der DNA erfolgte mittels Ethidiumbromid (0,5µg/ml Wasser).

3.2.2 Klonierung

3.2.2.1 Restriktionsanalyse von DNA

DNA kann mittels Restriktionsenzymen (Restriktionsendonukleasen) an spezifischen Nukleotidsequenzen hydrolysiert werden. Diese Enzyme sind Teil eines vom jeweiligen Organismus kontrollierten Restriktions-Modifikations-Systems. Es werden in der Regel Endonukleasen des Typs II verwendet. Sie benötigen im Gegensatz zu den Gruppen I und III kein NAD oder ATP als Kofaktor und sie besitzen nur eine nukleolytische Aktivität. Bei den Nukleasen der Klasse II (sowie Klasse III) sind Enzymbindestelle und Hydrolyseort identisch oder benachbart und nur die Enzyme der Klasse II spalten die DNA sequenzspezifisch. Die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung in beiden DNA-Strängen kann symmetrisch oder um bis zu vier Nukleotide versetzt ablaufen (glatte Enden oder blunt ends und überstehende Enden oder sticky ends). Die Nomenklatur der Restriktionsenzyme leitet sich von dem Organismus ab, aus dem das Protein isoliert wurde.

Materialien (NEB , New England Biolabs)

- *Bg*III: 10.000U/ml
- *Pst*I: 20.000U/ml
- *Eco*RI: 20.000U/ml
- Xho*I: 20.000U/ml
- Puffer 3; Puffer 2, BSA 10x

Zur Klonierung der Sequenzen, die den Domänen Dp107 und Dp178 entsprechen, sowie von gp41 in den pDisplay-Vektor wurden Vektor und PCR-Produkte mit *Bg*III und *Pst*I inkubiert.

Restriktionsansatz für PCR-Produkte (Dp107 und Dp178):

10µl Template	}	1,5 h 37°C	die entstandenen Fragmente : 191bp (Dp107) und 159bp (Dp178)
1µl <i>Bg</i> III			
1µl <i>Pst</i> I			
2µl 10x Puffer 3 (NEB)			
2µl 10x BSA			
ad. 20µl			

Restriktionsansatz für pDisplay-rgp41:

2µg pDisplay	}	2,5h 37°C die entstandenen Fragmente: 5,3 und 1 kb
2µl 10x BSA		
2µl 10x Puffer3 (NEB)		
1µl <i>Pst</i> I		
1µl <i>Bgl</i> III		
ad. 20µl		

3.2.2.2 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel

Durch dieses Verfahren kann eine DNA-Bande aus einem Agarosegel isoliert werden, so dass die gewonnene DNA frei von Puffern, Primern, Enzymen und Kofaktoren wie BSA oder Mg^{2+} ist. Dazu wurden die DNA-Banden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH; Hilden) aus dem Agarosegel nach den Angaben des Herstellers (QIAquick^R Spin Handbook, 03/2001: S.23) aufgereinigt.

3.2.2.3 Reinigung von DNA mittels Qiagen-Kit

Diese Methode eignet sich ebenso zur Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten zwischen 100bp bis 10kb nach einem Restriktionsverdau.

Die Aufreinigung von DNA nach Restriktionsverdau und von PCR-Produkten wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach den Angaben des Herstellers (QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Handbook 03/2001: S.18) durchgeführt.

3.2.2.4 Dephosphorylierung des Vektors

Nach dem Restriktionsverdau bleiben an den 5'-Enden der DNA-Fragmenten Phosphatreste zurück, die entfernt werden müssen, um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Das Fragment, das man in den Vektor klonieren möchte, besitzt dagegen beide Phosphatreste und kann daher mit dem Vektor ligieren.

Um die Selbstligation des pDisplay-Vektors zu verhindern bzw. zu minimieren, wurde der Vektor mit Hilfe von SAP (Shrimp-Alkaline-Phosphatase) dephosphoryliert.

Dephosphorylierungsansatz:

- | | | |
|--|---|-------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - 30µl Vektor (pDisplay nach Verdau) - 4µl 10x SAP-Reaktionspuffer - 2µl SAP - ad. 40µl | } | 1h bei 37°C |
|--|---|-------------|

Nach der Inkubation wurde SAP bei 65°C für 15min inaktiviert

3.2.2.5 Ligation

Bei der Ligation wird unter Verbrauch von ATP oder NAD eine kovalente Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe der einen Kette (Donor) und der 3'-Hydroxylgruppe der zweiten Kette (Akzeptor) gebildet (Phosphodiesterbindung). Das Enzym DNA-Ligase katalysiert diesen Prozess. DNA-Ligase kann ausschliesslich doppelsträngige DNA-Stränge miteinander verknüpfen. Es wird meistens DNA-Ligase aus T4-infizierten *E. coli*-Zellen benutzt, die ATP als Kofaktor benötigt.

Materialien:

T4-DNA-Ligase : T4-DNA-Ligase 1U/µl ; (GIBCO BRL)

T4-DNA-Ligase-Puffer 5x : (GIBCO BRL)

Für die Ligation der mit *BglIII/PstI* verdauten PCR-Produkte (Dp107, Dp178) mit dem pDisplay-Vektor wurde T4-Ligase (1U) bei Raumtemperatur für 3h eingesetzt. Für einen 20µl Ansatz wurde 2µl T4-Ligase und 4µl Ligase-Puffer 5x verwendet. 10µl (~4µg) PCR-Produkte (Insert) und 3µl (~1,5µg) pDisplay-Vektor waren die Ausgangsmaterialien für die Ligation. Die ligierte DNA wurde dann mittels PCR-Purification aufgereinigt.

3.2.3 Transformation**3.2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien**

Die Fähigkeit von Zellen, DNA aufzunehmen, wird als Kompetenz bezeichnet. Bei Behandlung der Zellen mit mono- oder divalenten Kationen (z.B. Li^+ , Ca^{2+}) wird die Aufnahme nackter DNA erleichtert. Das Einschleusen von DNA kann zusätzlich durch hydrophile Polymere wie Polyethylenglykol (PEG), durch Lipidvesikel oder durch starke elektrische Felder (Elektroporation) ermöglicht werden.

Materialien:

- Top10-*E.coli*-Zellen
- LB-Medium : 10g/l Bacto Pepton, 10g/l NaCl, 5g/l Hefeextrakt
- TFB 1 Puffer (pH 5,5): 100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30mM Kaliumacetat, 10mM CaCl₂
15% (v/v) Glycerin
- TFB 2 Puffer (pH 6,8) : 10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin
- The QIAexpressionist

Ein Tag vor der Transformation wurde eine Vorkultur von Top10-Zellen angesetzt (37°C, 225 rpm). Danach wurde 1ml aus dieser Vorkultur in 100ml LB-Medium überführt und bei 37°C und 225 rpm inkubiert bis eine optische Dichte (OD) von 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht war. Danach wurde die Herstellung kompetenter Zellen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.3.2 Transformation kompetenter Top10-Zellen mit pDisplay-Dp107 bzw. pDisplay-Dp178

Die Einführung von DNA in Bakterien wird als Transformation bezeichnet.

Materialien:

- LB-Medium: 10g/l Bacto Pepton, 10g/l NaCl, 5g/l Hefeextrakt
- LB-Ampicillin-Platten :LB-Medium, 15g/l Bacto Agar, 100µg/ml Ampicillin
- Thermoblock: Eppendorf Thermomixer Comfort
- SOC-Medium : 20g/l Bacto Pepton, 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl
- Inkubationsschüttler: Innova 4330; New Brunswick Scientific

Zur Transformation der kompetente *E.coli*-Zellen mit den DNA-Konstrukten wurden 200µl der bei -80°C gelagerten kompetenten Top10-Zellen (*E.coli*) aufgetaut, 10µl des Ligationsansatzes wurden dazugegeben. Nach 30min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz 30s einer Temperatur von 42°C ausgesetzt, danach für weitere 2min auf Eis inkubiert. 500µl 37°C warmes SOC-Medium wurden zugegeben und der Transformationsansatz 1h bei 37°C und 225rpm inkubiert, anschliessend wurden die Zellen zentrifugiert (8000rpm) und das Pellet wurde in 50µl SOC-Medium aufgenommen. Davon wurden 30µl auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)

Hierbei wird eine Bakterienkultur von 4-6ml unter alkalischen Bedingungen lysiert. Das Lysat wird nach Neutralisation in einem Puffer von hoher Salzkonzentration auf eine Silica-Gel-Membran aufgetragen. Die Plasmid-DNA bindet an diese Membran. Die Elution der DNA erfolgt bei niedrigen Salzkonzentrationen und neutralem pH-Wert. Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde ein QIAprep^R-Miniprep-Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (QIAprep DNA Miniprep Kit Protocol, Handbook, 2001: S.22)

3.2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Maxiprep)

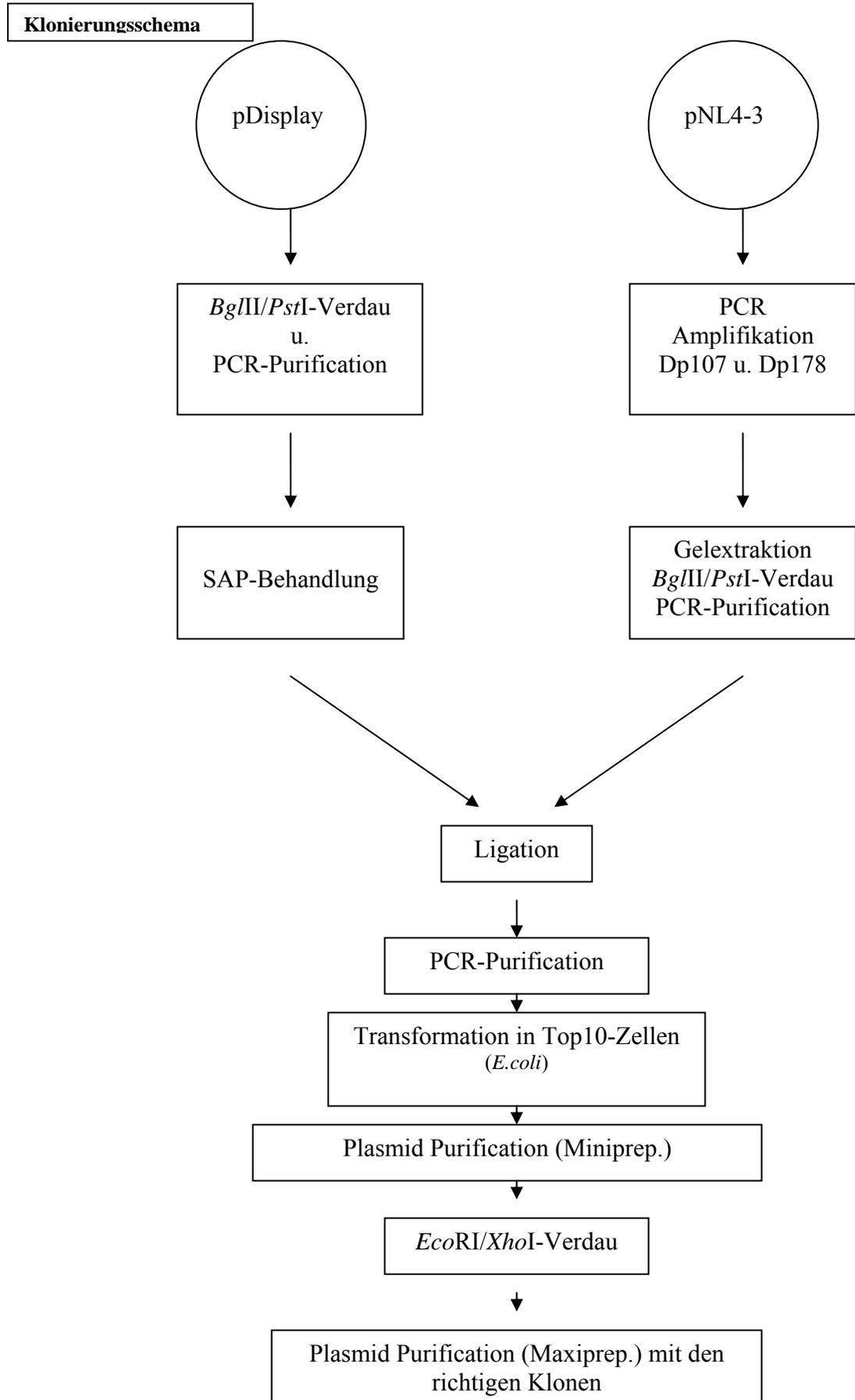
Zur Gewinnung grösserer Mengen von Plasmid-DNA wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit verwendet. Dafür wurde eine Vorkultur von 6ml (LB-Medium+Ampicillin) mit den transformierten Top10-Klonen angesetzt und über Nacht bei 37°C und 225rpm inkubiert. 100ml LB-Medium+Ampicillin wurden dann mit 1ml Übernachtskultur beimpft und erneut über Nacht bei 37°C und 225rpm inkubiert. Die Durchführung der Maxipräparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers (QIAGEN Plasmid Maxiprep Protocol).

3.2.3.5 DNA-Sequenzierung

Durch die DNA-Sequenzierung (Firma MediGenomics GmbH, Martinsried) wurde die korrekte Sequenz der DNA-Konstrukte sichergestellt. Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen erfolgte photometrisch (UV-1202 UV-VIS-Spectrophotometer; SHIMADZU).

3.2.3.6 Klonierungsschema

Das Ziel dieser Klonierung war die Herstellung von HeLa-Zellen, die die HIV-Peptide Dp107 und Dp178 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Der pDisplay-Vektor wurde eingesetzt, weil er vor der Insertionsstelle eine Signalsequenz trägt, das den Transport der exprimierten Peptide auf die Zelloberfläche ermöglicht. Das folgende Schema zeigt eine Übersicht von der gesamten Klonierung.



3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford dient zur quantitativen Analyse von Proteinkonzentrationen. Sie beruht auf einer Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue in saurer Lösung an das Protein, wodurch sich dessen Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm verschiebt (Bradford, 1976). Eine zuverlässige Proteinbestimmung im Konzentrationsbereich 0,2mg/ml bis 1,2mg/ml wird durch einen nahezu konstanten Extinktionskoeffizienten innerhalb dieser Konzentration möglich (Spector, 1978).

Materialien:

- Dye-Konzentrat: BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate
- Photometer: Tecan-Spectra Reader; TECAN

Es wurden 4µl von der Proteinlösung auf 196µl Dye-Reagenz (Dye-Konzentrat 1:5 in ddH₂O verdünnt) gegeben und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die optische Dichte wurde dann bei OD₅₉₅ mit einem Tecan Classic™ Spectrometer gemessen. Als Referenz diente eine BSA-Verdünnungsreihe von 0,2-1,2mg/ml.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Grösse eines Proteins und seine Zusammensetzung aus Untereinheiten können durch SDS_Polyacrylamidgelelektrophorese ermittelt werden. Bei diesem Verfahren wird eine inerte Matrix aus einem stark vernetzten Polyacrylamidgel aufgebaut, durch die die Proteine in einem angelegten elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Proteine selbst befinden sich in einer Lösung die ein starkes, negativ geladenes Detergens enthält, das Natriumdodecylsulfat (SDS), was an hydrophobe Regionen der Proteinmoleküle bindet. Dadurch entfalten sich die Proteine zu gestreckten Polypeptidketten. β-Mercaptoethanol löst die Disulfidbrücken im Protein. Je nach Konzentration des Acrylamids entstehen Gele mit unterschiedlicher Porengrösse.

SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow, 1987

Materialien:

- **10% Trenngel** : 5ml Gelpuffer, 5ml ddH₂O, 5ml Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe), 100µl Ammoniumperoxodisulfat, APS (SIGMA), 10µl Tetramethylethylendiamin, TEMED (Amersham)
- **4% Sammelgel** : 2ml Gelpuffer, 3,2ml ddH₂O, 0,8ml Acrylamid Lsg. (Rotiphorese 30, Roth, Karlsruhe), 100µl Ammoniumperoxodisulfat (SIGMA), 10µl 1 N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin TEMED (Amersham)
- **GelPuffer**: 3,0M Tris-HCl, 0,3% Na-SDS, pH 8,4
- **Kathodenpuffer**: 0,1M Tris, 0,1M Tricin, 0,1% Na-SDS, pH 8,25
- **Anodenpuffer**: 0,2M Tris-HCl, pH 8,9
- **Probenpuffer**: 50mM TrisHCl, 12% Glycerin, 4% w/v SDS, 5% v/v β-Mercaptoethan 0,01% w/v Coomassie Blue G250
- **Färbelösung**: 50% Methanol, reinst (Merck), 10% Essigsäure 96% (Merck), 0,2% Coomassie Brilliant Blue (Serva Blue R; SERVA C.I. 42660)
- **Entfärbelösung**: 10% Essigsäure 96% (Merck), 25% Methanol, reinst (Merck)
- **Gelsystem** : Miniprotean 2 (BioRad)

Hierzu wurden Proteinbestimmungen der jeweiligen Proben durchgeführt, um das Volumen von 5µg Protein zu ermitteln. Dieses Volumen wurde 1:1 mit Probenpuffer (Tricine Sample Buffer, BioRad) versetzt und 5 min auf 95°C gehalten. Durch diese Prozedur kommt es zu einer Entfaltung von Sekundär und Tertiärstrukturen, womit man ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis aller Proteine sicherstellt.

Diese Probelösung wurde auf das Gel, gleichzeitig mit 10µl eines vorgefärbten Grössenstandards (SeeBlue Plus, Invitrogen) aufgetragen, der die Bestimmung des Molekulargewichtes möglich macht. Die Auftrennung wurde bei einer Spannung von 80V gestartet und die Spannung wurde nach 10min auf 120V erhöht.

Die Gele wurden mit Coomassie Blue G250 gefärbt, mit Entfärber (10% Essigsäure, 25% Methanol) entfärbt und mit dem Novex Geldry System getrocknet.

3.3.3 Western Blot

Die Western-Blot-Technik erlaubt den spezifischen Nachweis von Proteinen in komplexen Proteingemischen. Zunächst erfolgt die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches mittels der SDS-PAGE. Anschliessend werden die aufgetrennten Proteinbanden elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) durch Anlegen eines elektrischen Feldes, das senkrecht zum Gel ausgerichtet ist, überführt (Abbildung 8).

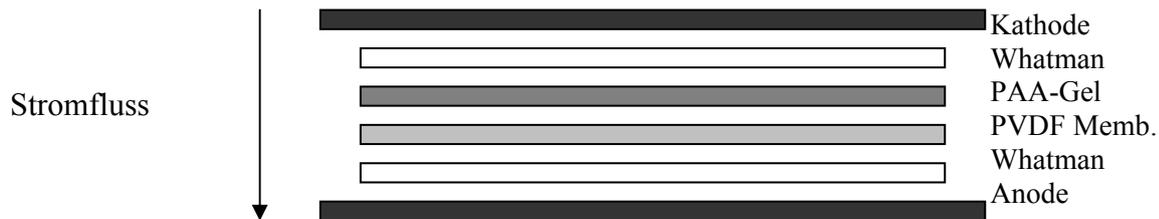


Abbildung 8: Aufbau eines Westernblots

Die nicht belegten Bindungsflächen auf der PVDF-Membran werden durch Blockierung mit einer proteinhaltigen Lösung (Blockierungspuffer) unspezifisch gesättigt. Zur Detektion der gesuchten Proteine wird die Membran mit einem spezifischen Antikörper in Blockierungspuffer inkubiert. Ein Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper bindet den Primärantikörper, was durch Bindung von mehreren Zweitantikörpern pro Erstantikörper zu einer Verstärkung des Signals führt. Durch die Spezifität des Western Blots können lineare Epitope eines Proteins nachgewiesen werden (Burnette, 1981).

Materialien:

- **Transferpuffer** : 48mM Tris base (Merck), 39mM Glycin (Merck), 3,75% (w/v) SDS
- **Waschpuffer** : 50mM Tris base (Merck), 150mM NaCl, 0,5% Tween 20 (Sigma Aldrich)
- **Blockierungspuffer** : Waschpuffer + 2% BSA (Roth, Karlsruhe)
- **Substratlösung**: 25mM Tris pH 8, Spatelspitze DAB- Diaminobenzidin- (Sigma)
- **Membran** : PVDF Membran von Millipore 0,22 µm Porengrösse
- **Transfer Kammer** : BioRad Trabs Blot SD, Semi Dry Transfer Cell (BioRad)
- **Whatman Papier**: (BioRad)
- **1. Antikörper**: 2F5 (10mg/ml) 1:20000 oder B3 1:5 oder anti Gag p24 1:1000
- **2. Antikörper**: POD-Anti human- IgG bzw. POD-Anti mause-IgG 1: 2000 (Sigma)

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamid(PAA)-Gel für 15min in Transferpuffer, die PVDF-Membran zunächst in Methanol dann ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte auf die Anode in dieser Reihenfolge: durch Transferpuffer angefeuchtetes Blotpapier, in Transferpuffer äquilibrierte Membran, das Polyacrylamidgel, durch Transferpuffer angefeuchtetes Blotpapier, Kathode (Abbildung 8).

Der Proteintransfer erfolgte für 20min bei 15V. Im Anschluss an den Elektroblot wurde die Membran 1h in Blockierungspuffer inkubiert. Der Erstantikörper wurde in Blockierungslösung je nach Konzentration der Ausgangslösung 1:5 bis 1:20000 verdünnt eingesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der Sekundärantikörper in Blockierungspuffer 1:2000 verdünnt und aufgetragen. Nach 2h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer je 10min gewaschen und mit einer 25mM Tris-HCl-Lösung (pH 8) für 10min äquilibriert. Die Detektion erfolgte durch Zugabe des DAB-Substrats (Diaminobenzidin) und 25µl 30%-Wasserstoffperoxid/25ml Detektionslösung innerhalb weniger Minuten.

3.3.4 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Diese Nachweismethode gehört zu den empfindlichsten Methoden zur spezifischen Detektion von Proteinen. Das zu bestimmende Protein wird von einem Erstantikörper spezifisch gebunden. Es wird ein Enzym als markiertes Molekül verwendet, das an einen sekundären Antikörper gebunden ist. Das Enzym bildet in Anwesenheit seines Substrates einen gefärbten Niederschlag, der eine Quantifizierung der durch Erstantikörper gebundenen Proteine erlaubt. Da jedes Enzymmolekül auf katalytischem Wege viele tausend Produktmoleküle bildet und jeder Erstantikörper durch mehrere Zweitantikörper gebunden wird, können selbst kleinste Mengen von Antigen nachgewiesen werden. Der Sandwich-Elisa ist ein Verfahren, bei dem das quantitativ zu bestimmende Antigen mit zwei Antikörpern detektiert wird, die unterschiedliche Epitope des Antigens binden. Die ELISA-Platte wird mit einem Antikörper gegen das gesuchte Protein beschichtet. Das gesuchte Protein bindet an diesem Antikörper und wird mit einem zweiten Antikörper, über ein weiteres Epitop detektiert. Dieser Komplex wird durch einen weiteren Antikörper, der den zweiten Antikörper erkennt und markiert ist, nachgewiesen.

Materialien:

- ELISA-Platten: Probind ELISA plates (Falcon 353915)
- PBS
- AG 3.0 MoAb: (AG Dr. Norley, RKI)
- HIV-1 plasma pool: (AG Dr. Norley, RKI)
- 2% v/v Tween 20: (Sigma Aldrich, Deutschland)
- PM: 2% w/v Milchpulver in PBS
- PMT: PM + 0,05% v/v Tween 20
- Anti-human IgG HRPO Konjugat (Sigma)
- Substratlösung: PBS (pH 6) + 1mg/ml OPD (tablets, Sigma) + 1µl/ml H₂O₂
- 1M Schwefelsäure
- Wascher: (Firma: Tecan) Waschpuffer: PBS + 0,05% Tween 20

Der Capture-Elisa wurde zum HIV-Infektionsnachweis als eine Alternativmethode zur Lyse-PCR eingesetzt. Es wurden 5000 Zellen/Well mit 1:2000 verdünntem Virus (mutiert bzw. Wildtyp) in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an Hemmstoffen wie das Peptid Dp107, das Peptid Dp178, der Antikörper 2F5 (separat und in Kombination) infiziert. Dafür wurden die Hemmstoffe auf der Platte ausverdünnt (50µl/Well), Virus dazugegeben (50µl/Well) und anschliessend für 15min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 100µl C8166-Zellen dazugegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach 4Tagen wurde die Syncytienbildung ausgewertet und die Platten wurden eingefroren. Die Elisa-Platten wurden mit 50µl/Well 1:200 verdünntem AG 3.0 (Anti-p24Gag) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden dann mit 100µl/Well PM für 1h bei 37°C blockiert. Die eingefrorenen Zellen wurden nach dem Auftauen mit 30µl 2%igem Tween 20 versetzt und 15-30min (Mikroskopkontrolle) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100µl/Well von diesen lysierten Zellen auf blockierte Elisa-Platten überführt und 2h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50µl/Well HIV-1-Plasma pool (1:2500 in PMT) dazugegeben (1. Antikörper) und 1h bei 37°C inkubiert. Zur Detektion des im Plasma vorhandenen Anti-HIV-Antikörpers wurden 50µl/Well Anti-Human-IgG (1:1000 in PMT) eingesetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Es wurden 50µl/Well Substratlösung dazugegeben und im Dunkeln inkubiert bis der farbige Niederschlag sichtbar war. Die Reaktion wurde mit 25µl/Well Schwefelsäure unterbrochen. Die Absorptinen wurden im Tecan Classic Spectrometer (Firma: Tecan) bei einer Wellenlänge von 492/620nm gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Infektionshemmende Wirkung von Fusionshemmern

Peptide, die von den N- und C-Helices der Ectodomäne des gp41 abgeleitet wurden, hemmen die Fusion der Zellmembran mit der HIV-Hülle (Wild et al., 1992; Wild et al., 1994b). Sie verhindern die Bildung einer fusionsaktiven Konformation des gp41 (s. Abbildung 7) und verhindern dadurch die Infektion. Da die meisten Hemmversuche mit PBMCs durchgeführt wurden, sollte hier der Einfluss der Peptide auf die Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen untersucht werden.

4.1.1 Infektionshemmende Wirkung des Peptids Dp178 (T20)

Das Peptid Dp178 hemmte bei 1,4ng/ml die HIV-1/LAI-vermittelte Zell-Zell-Fusion in den AA5, CEM und PBMCs und bei 6ng/ml die Infektion der genannten Zellen mit HIV-1/LAI (IC₉₀) (Wild et al., 1994b). Um eine 90%ige Hemmung von HIV-1/MN in diesen Zellen zu erreichen, mussten allerdings 51ng/ml Peptid Dp178 eingesetzt werden.

Um die Konzentration des Peptids Dp178 zu bestimmen, die die Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen hemmt, wurden verschiedene Konzentrationen des Peptids eingesetzt (Tabelle 3).

Die Konzentration des Peptids Dp178, die die Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen hemmte, betrug 3,12 µg/ml (Tabelle 3) und ist damit weit höher als die von Wild et al., (1994b) in den anderen Virus-Zell-Systemen beschriebene Konzentration.

Tabelle 3: Hemmung der Syncytienbildung und Infektion durch das Peptid Dp178

Peptidkonzentration µg/ml	Syncytienbildung	p24-Capture-ELISA
6,25	keine	negativ
3,12	keine	negativ
1,56	positiv	positiv
0 (Negativkontrolle)	positiv	positiv

Die Negativkontrolle (ohne das Peptid Dp178) zeigte Syncytien und Infektion (p24-Nachweis mittels ELISA).

4.1.2 Infektionshemmende Wirkung des Peptids Dp107 (T21)

Das Peptid Dp107 ist das erste, von der N-terminalen Helix des HIV-1-gp41 abgeleitete Peptid, das als Fusionshemmer beschrieben wurde (Wild et al., 1992). Es ist ein 38 Aminosäure grosses Peptid, das der Sequenz 558-595 des transmembranen Proteins von HIV-1 entspricht. Das Peptid Dp107 konnte die Virus-vermittelte Fusion der nichtinfizierten MOLT-4-Zellen mit den HIV-1/IIIB-Infizierten CEM-Zellen bei 6µg/ml inhibieren. Die Zellfusion durch die HIV-1-Isolate MN, RF und SF2 konnte ebenfalls durch Dp107 gehemmt werden, ebenso die Infektion der AA5-Zellen durch das HIV-1/LAI-Isolat. Die Konzentration des Peptids Dp107 zur Hemmung der Infektion war fast genauso hoch wie die zur Hemmung der Zellfusion (6µg/ml) (Wild et al., 1992).

Um zu testen, ob das Peptid Dp107 die Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen hemmt, wurde das Peptid ausverdünnt und anschliessend wurden die Zellen und das Virus dazugegeben. Die Infektion wurde mittels p24-Capture-ELISA nachgewiesen (Abbildung 9). Es zeigte sich, dass selbst bei Konzentrationen bis 50µg/ml keine Hemmung der Infektion nachgewiesen werden konnte (Abbildung 9).

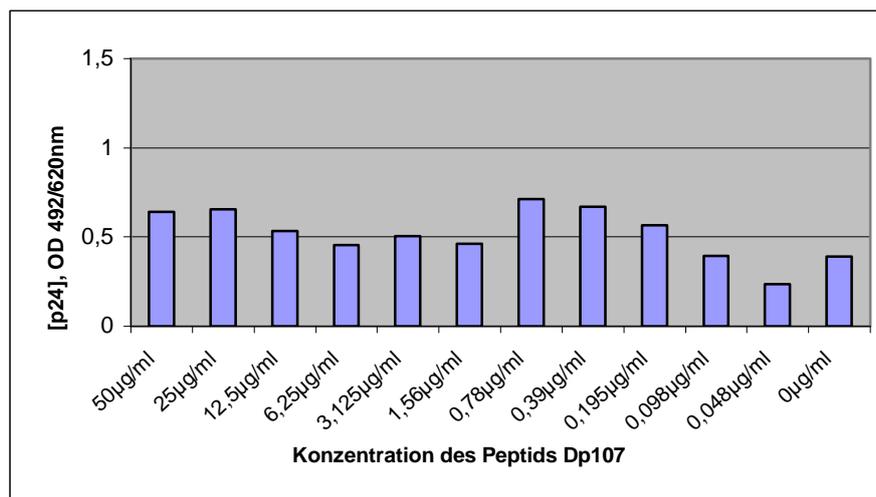


Abbildung 9: p24-Capture-ELISA zur Analyse der Wirkung des Peptids Dp107 auf die HIV-Replikation. Das Peptid Dp107 wurde von links nach rechts 1:2 ausverdünnt und der letzte Balken zeigt die Infektion ohne das Peptid (Negativkontrolle).

4.1.3 Infektionshemmende Wirkung des Dextran6-ISU-Peptids

Die ISU-Domäne des gp41 überlappt mit dem C-Terminus der dem Peptid Dp107 entsprechenden Sequenz. Ein von dieser Region abgeleitetes synthetisches Peptid, das ISU-Peptid, besitzt immunsuppressive Eigenschaften und hemmt gekoppelt an BSA die HIV-Replikation (Denner et al., 1994).

Um die Aktivität des ISU-Peptids genauer zu untersuchen, wurde die Wirkung des Dextran6-ISU-Peptids auf die HIV-Replikation in den C8166-Zellen getestet. Bei diesen Konjugaten war das ISU-Peptid an Dextran mit dem Molekulargewicht 6000 gekoppelt worden. Das Dextran hat den Vorteil, dass es im Gegensatz zu BSA nicht immunogen ist.

Das ISU-Peptid hat gegenüber dem Peptid Dp107 den Vorteil, dass es viel kleiner, und dementsprechend kostengünstiger zu produzieren ist. Um eine mit dem Peptid Dp107 vergleichbare Menge an Dextran-ISU-Peptid-Konjugat einzusetzen, wurde es so verdünnt (1:30), dass es mit der gleichen molaren Masse, die einer Ausgangskonzentration von 50µg/ml des Peptids Dp107 entspricht eingesetzt wurde. Die Infektion der C8166-Zellen durch HIV-1/IIIB wurde mittels p24-Capture-ELISA gemessen (Abbildung 10).

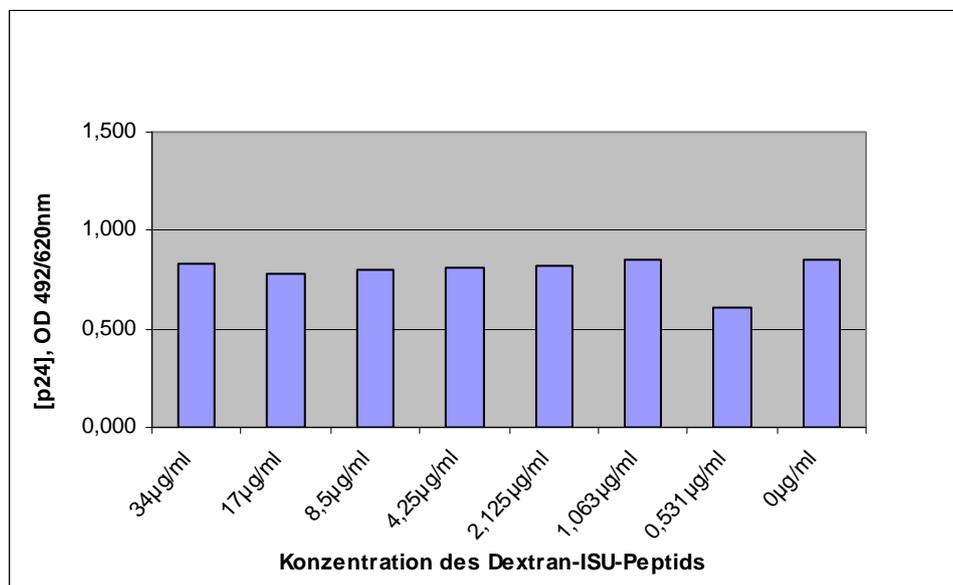


Abbildung 10: p24-Capture-ELISA zur Analyse der Wirkung des Dextran6-ISU-Peptid-Konjugats. Die Ausgangskonzentration entspricht einer molaren Menge von 50µg/ml des Peptids Dp107. Der letzte Balken zeigt die Infektion ohne das Dextran6-ISU-Peptid (Negativkontrolle).

Aus Abbildung 10 ist zu ersehen, dass das verwendete Dextran6-ISU-Peptid-Konjugat bei den eingesetzten Konzentrationen bis 34µg/ml die Infektion der C8166-Zellen durch HIV-1/IIIB nicht hemmen konnte.

4.2 Der monoklonale Antikörper 2F5 hemmt die HIV-Replikation

Der humane monoklonale Antikörper 2F5 hemmt die Syncytienbildung und Membranfusion bei der HIV-Infektion (Muster et al., 1993; Purtscher et al., 1994). Um zu testen, ob der Antikörper 2F5 auch im C8166-Zellsystem eine neutralisierende Wirkung zeigt, wurden diese Zellen im Gegenwart des Antikörpers 2F5 mit HIV-1/IIIB-Isolat infiziert und die Infektion wurde mittels p24-Capture-ELISA untersucht (Abbildung 11).

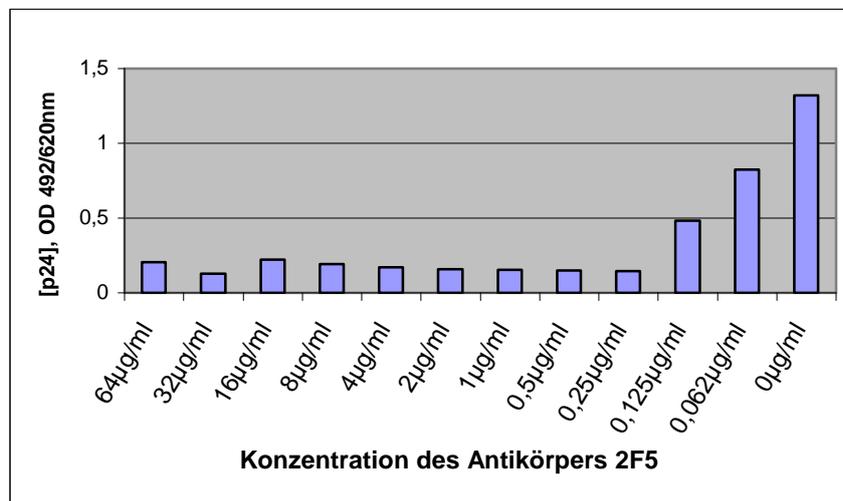


Abbildung 11: p24-Capture-ELISA zum Nachweis der neutralisierenden Wirkung des Antikörpers 2F5 auf die HIV-Replikation. Der letzte Balken zeigt die Infektion ohne den Antikörper (Negativkontrolle).

Der Antikörper 2F5 hemmte die Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen dosisabhängig (Abbildung 11) bei vergleichbaren Konzentrationen, die auch von Muster et al. (1993) beschrieben wurden.

4.3 Kooperation zwischen den Fusionshemmern und dem monoklonalen Antikörper 2F5

Nachdem gezeigt wurde, dass ein Fusionshemmer und der neutralisierende Antikörper 2F5 die HIV-Replikation hemmen, sollte untersucht werden, ob diese Substanzen zusammen eine bessere Hemmaktivität zeigen.

Ein Vorteil einer Kombination von Hemmstoffen zur Hemmung der HIV-Infektion ist, dass durch Zugabe von mehr als einem Hemmstoff die Resistenzbildung minimiert werden könnte.

Das Passagieren von HIV-1/IIIB infizierten CEM-4 Zellen (eine T-lymphoblastoide Zelllinie) im Beisein des Peptids Dp178 hatte zu resistenten HIV-Stämmen geführt (Wild et al., 1994; Rimsky et al., 1998).

Auf der Basis dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob das Peptid Dp178 und der monoklonale Antikörper 2F5 in Kombination eine stärkere Hemmaktivität zeigen (additive oder synergistische Wirkung). Um diese Frage zu beantworten, wurden das Peptid Dp178 und der Antikörper 2F5 in Kombination zur Hemmung der HIV-1/IIIB-Replikation in den C8166-Zellen eingesetzt. Sowohl das Peptid Dp178 als auch der Antikörper 2F5 wurde ausverdünnt und anschliessend wurden 5000 Zellen und das Virus dazu gegeben. Die Infektion wurde mittels p24-Capture-ELISA analysiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Konzentrationen des Peptids Dp178 und des Antikörpers 2F5, einzeln und in Kombination, die zur Hemmung der HIV-Replikation führten. Nullwerte zeigen die Infektion ohne Hemmstoff (Negativkontrolle).

Hemmstoff	Konzentration	Infektion
Dp178	3,12µg/ml	-
	1,56µg/ml	+
	0µg/ml	+
Antikörper 2F5	4µg/ml	-
	2µg/ml	+
	0µg/ml	+
Dp178 und Antikörper 2F5	1,56µg/ml und 8µg/ml	-
	0,78µg/ml und 4µg/ml	+
	0µg/ml und 0µg/ml	+

Die Versuche zeigten, dass das Peptid Dp178 und der Antikörper 2F5 keine kooperative Wirkung bei der Hemmung der Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen hatten. Es wurde zwar die Hälfte des Peptids Dp178 in Kombination benötigt, aber dafür musste die doppelte Menge des Antikörpers 2F5 eingesetzt werden, um eine Hemmung zu erzielen.

Die Kooperation des Peptids Dp107 mit dem neutralisierenden Antikörper 2F5 konnte nicht getestet werden, weil das Peptid Dp107 selbst bei 50µg/ml die Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen nicht hemmen konnte (Abbildung 9).

4.4 Analyse der Wirkung von Antikörpern gegen die ISU-Domäne auf die HIV-Replikation

Der Antikörper B3 ist ein monoklonaler Antikörper, der durch Immunisierung von Mäusen mit dem ISU-Peptid gekoppelt an ein Trägermolekül gewonnen wurde (Denner et al., unveröffentlicht). Es konnte gezeigt werden, dass das ISU-Peptid die Replikation von HIV hemmen konnte, wenn es an einem Trägermolekül gekoppelt war (Denner et al., 1994; Qureshi et al., 1990).

Das Epitop, das von dem monoklonalen Antikörper B3 erkannt wird, konnte durch ein Epitop-mapping mit überlappenden Peptiden bestimmt werden. Seine Sequenz ist ILAVERYLKD (Denner et al., unveröffentlicht). In der ersten Untersuchung konnte allerdings keine neutralisierende Wirkung des Antikörpers B3 auf die HIV-Replikation gefunden werden (Denner et al., unveröffentlicht).

Unlängst wurde jedoch die Hemmung der Replikation verschiedener HIV-Isolate durch IgAs von nichtinfizierten Menschen mit hoher Exposition zu HIV-Infizierten gezeigt. Diese Antikörper erkennen das Epitop QARILAV im gp41 (Clerici et al., 2002). Die beschriebenen IgAs wurden bei nichtinfizierten Personen gefunden, die häufigen Kontakt mit HIV-infizierten Partnern hatten. Aufgrund der Überlappung der Epitope sollte untersucht werden, ob der Antikörper B3 gegen das ISU-Peptid die Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen hemmen kann.

Der Antikörper war mittels Affinitätschromatographie mit einer Protein-G-Säule aufgereinigt worden und verschiedene Konzentrationen wurden zu den C8166-Zellen und HIV-1/IIIB dazugegeben. Die Infektion wurde mittels p24-Capture-ELISA analysiert (Abbildung 12).

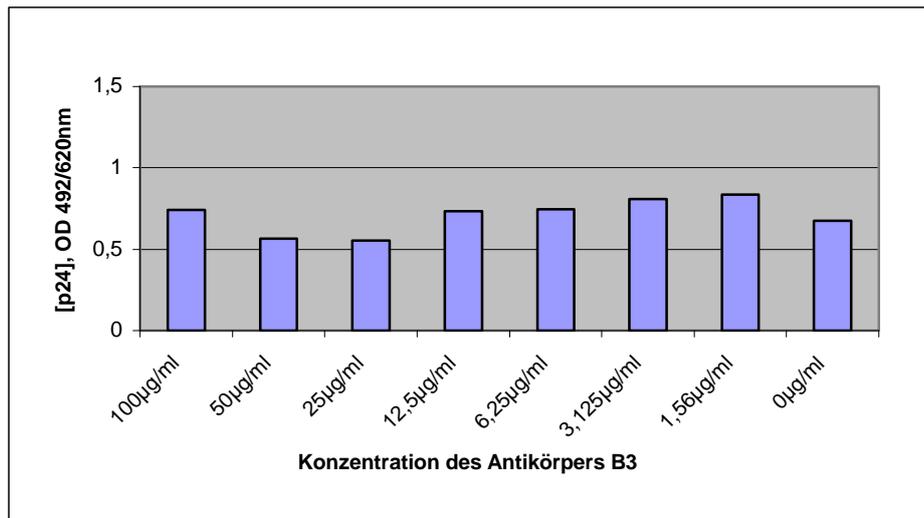


Abbildung 12: p24-Capture-ELISA zur Analyse der Wirkung des Antikörpers B3. Der Antikörper wurde 1:2 ausverdünnt. Der letzte Balken zeigt die Infektion ohne den Antikörper (Negativkontrolle).

Abbildung 12 zeigt, dass der Antikörper B3 bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml die Replikation von HIV-1/IIIB in C8166-Zellen nicht hemmte. Damit wurden frühere Befunde, die zeigten, dass der Antikörper B3 keine neutralisierende Aktivität hat (Denner et al., unveröffentlicht) bestätigt.

4.5 Resistenzbildung nach der Behandlung mit dem Antikörper 2F5

Der Antikörper 2F5 hemmt die Replikation von verschiedenen HIV-1-Isolaten (Abbildung 11) (Muster et al., 1993; Purtscher et al., 1994). Aufgrund seiner neutralisierenden Eigenschaften wurde der Antikörper 2F5 bereits als Immun-Therapeutikum in einer klinischen Studie der Phase I eingesetzt (Stiegler et al., 2002). Da bei jeder Therapie die Selektion resistenter HIV-Stämme ein grosses Problem darstellt und es noch keine Literaturdaten für Selektion von Resistenzen durch den Antikörper 2F5 gibt, sollte dieses Problem untersucht werden. Dafür wurden Untersuchungen mit zwei verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers 2F5 durchgeführt.

4.5.1 Resistenzbildung bei suboptimaler Antikörperkonzentration

Im Falle einer HIV-Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 müsste der Antikörper in einer Konzentration verabreicht werden, die eine vollständige Hemmung der Infektion

bewirkt. Die Konzentration des Antikörpers wird allerdings im Körper nicht überall gleich hoch bleiben, und potentielle Therapiepausen oder –abbrüche würden ebenfalls zu einer Unterschreitung des neutralisierenden Spiegels des Antikörpers 2F5 im Serum der Patienten führen. Die Fragestellung war, ob sich bei suboptimaler Konzentration des Antikörpers 2F5 resistente Stämme durchsetzen können.

Um eine suboptimale Konzentration für diese Untersuchung festzustellen, wurde der monoklonale Antikörper 2F5 in unterschiedlichen Konzentrationen zu den C8166-Zellen und HIV-1/IIIB dazugegeben. Die Höchstkonzentration des monoklonalen Antikörpers betrug 0,75µg/ml. Es wurden 50000 C8166-Zellen verwendet und HIV-1/IIIB wurde 1:2000 verdünnt und eingesetzt. Nach drei Tagen wurde die Infektion durch Lyse-PCR nachgewiesen. Bei dieser Form der PCR wurden die infizierten Zellen lysiert und es wurde eine PCR mit Primern gegen Pol-Sequenzen direkt im Lyseansatz durchgeführt. Die niedrigste Konzentration des monoklonalen Antikörpers 2F5, bei der eine Infektion stattgefunden hatte, betrug 0,3µg/ml (Abbildung 13). Im Unterschied dazu konnte diese Konzentration des monoklonalen Antikörpers 2F5 *in vitro* HIV-1/IIIB in einem anderen Zellsystem (AA2-Zellen) noch hemmen (Stiegler et al., 2001).

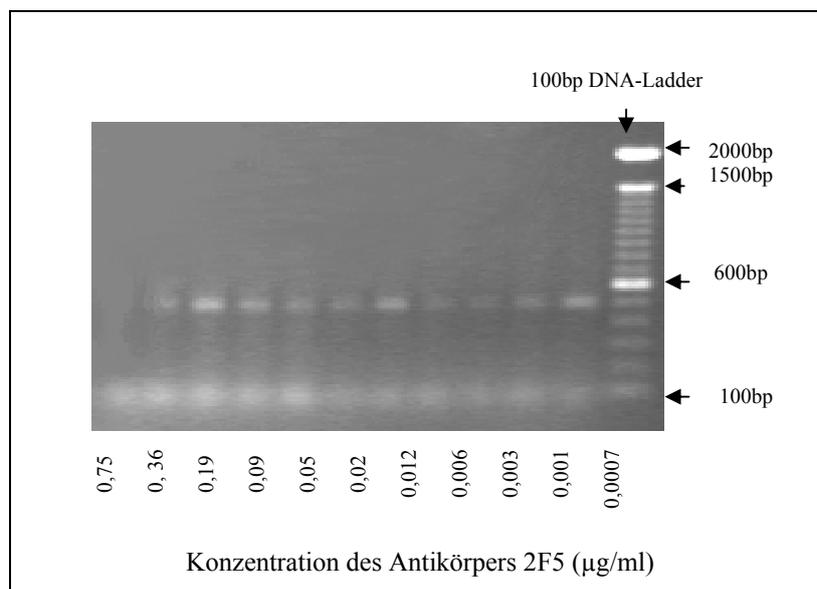


Abbildung 13: Nachweis der Hemmung der HIV-1/IIIB-Infektion durch den monoklonalen Antikörper 2F5. Es wurde eine Lyse-PCR und anschliessend Agarosegelelektrophorese der Amplifikate durchgeführt.

Die PCR-Analyse zeigte, dass bei einer Konzentration des monoklonalen Antikörpers 2F5 von 0,75µg/ml keine Provirus-Integration und somit keine Infektion stattgefunden hat, während bei 0,36µg/ml eine Infektion nachgewiesen werden konnte. Deshalb wurde für die Untersuchung der Resistenzinduktion die suboptimale Konzentration von 0,3 µg/ml verwendet.

Eine schematische Darstellung des ersten Resistenzbildungstests bei einer Konzentration von 0,3µg/ml des monoklonalen Antikörpers 2F5 ist in der Abbildung 14 gegeben. Vor und nach der Zugabe des Antikörpers 2F5 wurden Zellen aus der Kultur entnommen, DNA wurde isoliert, mit Primern aus der Pol-Region amplifiziert und die Amplifikate wurden dann sequenziert.

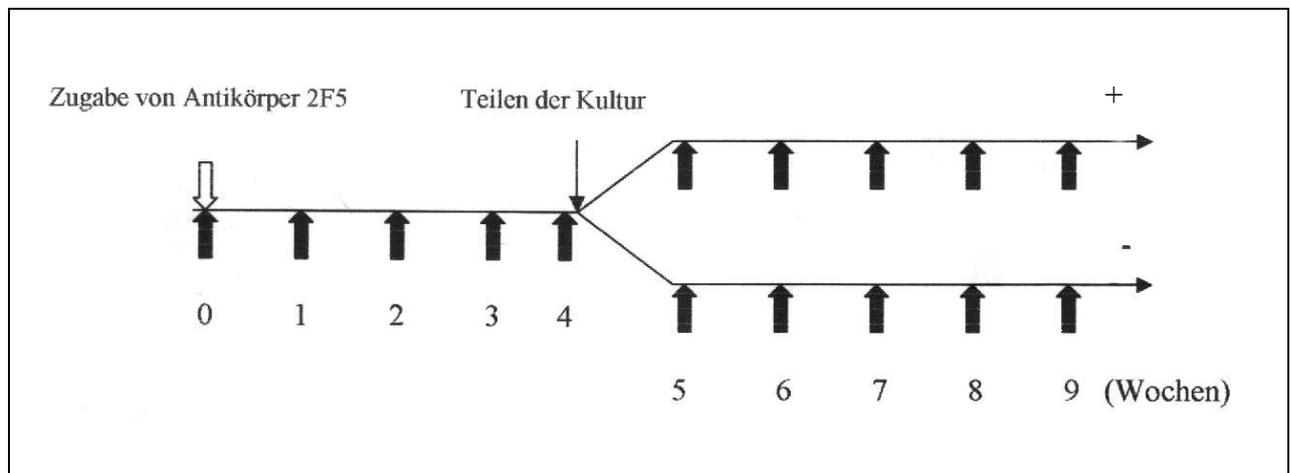


Abbildung 14 : Schematische Darstellung des ersten Versuchs zur Selektion von Resistenzen. Der monoklonale Antikörper 2F5 wurde zu den C8166-Zellen, die mit HIV-1/IIIB infiziert waren, dazugegeben (weisser Pfeil). Nach vier Wochen wurde die Kultur geteilt. Die eine Hälfte wurde weiterhin mit, und die andere Hälfte ohne Antikörper kultiviert. Proben für die DNA-Isolierung und PCR zum Provirus-Nachweis wurden wöchentlich entnommen (schwarze Pfeile).

Die Sequenz der späteren Kultur wurde mit der Ausgangssequenz verglichen. In Abbildung 15 sind als Beispiel die Sequenz des Ausgangsvirus und des Virus nach vier Wochen Behandlung mit dem Antikörper 2F5 gezeigt.

In Abbildung 16 sind die Aminosäuresequenzen mehrerer Proviren vor und nach der Behandlung mit dem Antikörper 2F5 dargestellt. Zur Vereinfachung wurde nur eine kurze Sequenz, die das Epitop ELDKWA enthält, abgebildet.

Woche 0 (vor der 2F5-Zugabe):
 TGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTG**GAA**
TTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCT
 GTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAA
 GAATAGTTTTTGTCTACTTTCTGTAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATAT
 TCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGG

Woche 4 (nach der 2F5-Zugabe):
 TGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTG**GAA**
TTAGATGAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCT
 GTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAA
 GAATAGTTTTTGTCTATACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATAT
 TCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGG

Abbildung 15: Sequenzvergleich von HIV-Proviren vor der Zugabe des Antikörpers 2F5 (Woche 0) und vier Wochen nach der Inkubation mit dem Antikörper 2F5. Die Punktmutation ist rot und die Sequenz des 2F5-Epitops ist gelb markiert.



Abbildung 16: Vergleich einer ausgewählten Region des gp41, die das von dem monoklonalen Antikörper 2F5 erkannte Epitop (ELDKWA) enthält. Vor (Woche 0) und wöchentlich nach der Zugabe des Antikörpers 2F5 wurde die DNA aus den Proben amplifiziert und sequenziert. Das 2F5-Epitop ohne Mutation ist gelb und die Sequenzen mit einer Mutation ist grün markiert.

Die Sequenzen zeigen, dass ab 4. Woche nach der Zugabe des Antikörpers eine Punktmutation im 2F5-Epitop auftauchte (ELDEWA), und bis zum Ende des Tests unverändert blieb. Hierbei handelte es sich um einen Lys (K) zu Glu (E) Austausch. Auch vier Wochen nach dem Absetzen

des Antikörpers 2F5 wurde keine Rückmutation des mutierten Epitops ins ursprüngliche Epitop (ELDKWA) beobachtet. Nach vier Wochen wurden ausser im Epitop des Antikörpers 2F5 auch andere Mutationen (Valin zu Isoleucin) an zwei Positionen der beispielhaft abgebildeten Sequenzen beobachtet.

4.5.2 Charakterisierung der mutierten Viren

Um zu untersuchen, ob neben der Mutation im Epitop ELDKWA noch weitere Mutationen im transmembranen Hüllprotein gp41 auftauchen, die zur Resistenzbildung mitverantwortlich sein können, wurde die Sequenz von gp41 vor (Woche 0) und nach vier Wochen Behandlung mit dem Antikörper 2F5 vollständig sequenziert.

A:

Fusionspeptid	Dp107	immunsuppressive Domäne
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQ	NNLLRAIEAQOHLLOLTVWGIKQLOARILAVERY	
LKDQOLLGIWGCSSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNNTWMEWDREINN	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL	Dp178
2F5-Epitop	Transmembrandomäne	
ELDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLSVNVNRVVRQGYSPFSFQTHLPIPRGPDRPEGIEEE	Cytoplasmatischer Bereich	
GGERDRDRSIRLVNGLSLALIWDDLRSCLFSYHRLRDLLLIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSA		
VSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQGAXRAIRHIPRRIRQGLERILL		

B:

Fusionspeptid	Dp107	immunsuppressive Domäne
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQ	NNLLRAIEAQOHLLOLTVWGIKQLOARILAVERY	
LKDQOLLGIWGCSSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNNTWMEWDREINN	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL	DP178
2F5-Epitop	Transmembrandomäne	
ELDEWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAILSIVNVNRVVRQGYSPFSFQTHLPIPRGPDRPEGIEEE	Cytoplasmatischer Bereich	
GGERDRDRSIRLVNGLSLALIWDDLRSCLFSYHRLRDLLLIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSA		
VSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQGACRAIRHIPRRIRQGLERILL		

Abbildung 17: Vollständige Aminosäuresequenz von gp41 des Ausgangsvirus (HIV-1/IIIB) vor der Zugabe des Antikörpers 2F5 (A) und vier Wochen nach der Behandlung mit dem Antikörper 2F5 (B).

Das Fusionspeptid (blau), die dem Dp107-Peptid entsprechende N-terminalen Helix (grün), die dem Dp178-Peptid entsprechende C-terminalen Helix (grau), die immunsuppressive Domäne

(unterstrichen), die transmembrane Domäne (fett) und das Epitop ELDKWA (A) und die mutierte Sequenz ELDEWA (B) (gelb) sind entsprechend markiert.

Der Vergleich der Sequenzen zeigt, dass eine relevante Mutation nur im Epitop ELDKWA (Veränderung zu ELDEWA) auftritt. Abgesehen von zwei konservativen Austausch (Valin zu Isoleucin) wurden keine weiteren Mutationen festgestellt.

Um zu untersuchen, ob der monoklonale Antikörper 2F5 noch an die mutierte Sequenz im gp41 bindet, wurden das Wildtyp-Virus und das mutierte Virus im Western-Blot untersucht. Dafür wurden Lysate von 1×10^5 C8166-Zellen (infiziert mit Wildtyp-Virus bzw. mit mutiertem Virus) eingesetzt. Es wurden drei verschiedene Antikörper bei dieser Untersuchung verwendet. Zum einen der monoklonale Antikörper 2F5 (1 μ g/ml), zum anderen das Serum einer Ratte (F1) (1:100), die mit dem ISU-Peptid gekoppelt an BSA immunisiert worden war und das im ELISA mit dem ISU-Peptid reagierte. Drittens ein Anti-Gag-Antikörper (AG 3.0) (1:100).

Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper 2F5 (Abbildung 18) zeigt, dass der Antikörper das gp41 im Wildtyp-Virus erkennt, im mutierten Virus jedoch nicht. Die Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper gegen die ISU-Domäne (Abbildung 19) und das Gag-Protein p24 (Abbildung 20) zeigen zum einen, dass diese Antikörper das entsprechende Protein im Wildtyp-Virus und mutierten Virus erkannten, zum anderen, dass die Beladung des Western-Blots beider Viren gleichmässig erfolgte.

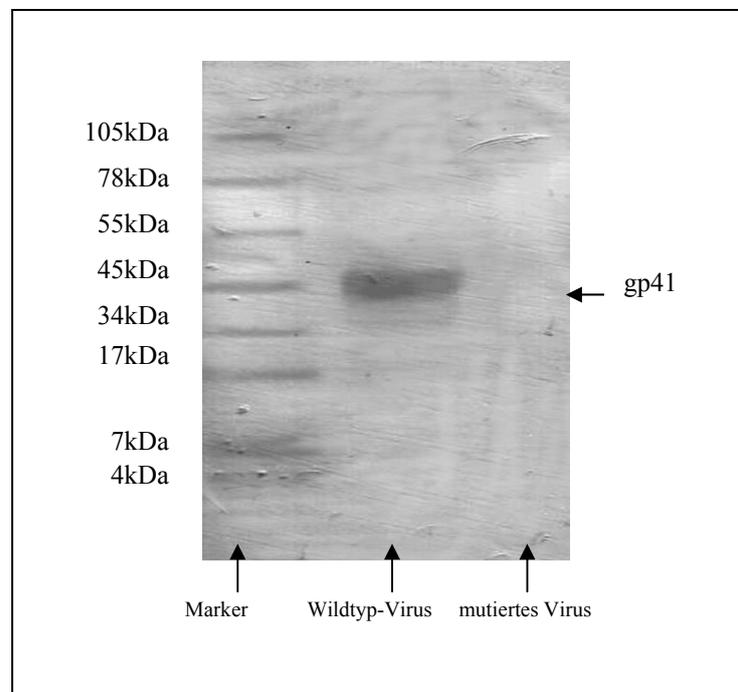


Abbildung 18: Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 2F5 mit Wildtyp-Virus (ELDKWA) und mutiertem HIV (ELDEWA) in der Western-Blot-Analyse. Marker: SeeBlue Plus, Invitrogen.

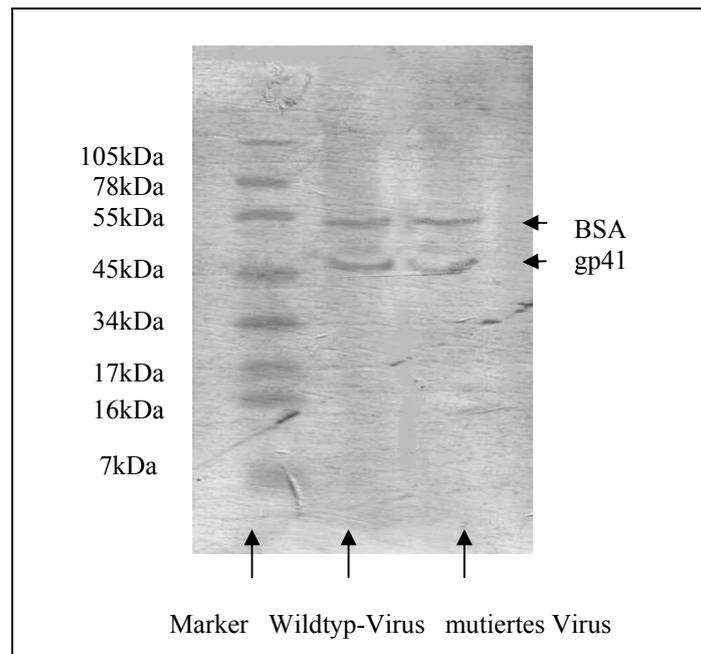


Abbildung 19: Reaktivität des Rattenserums F1, das gegen das ISU-Peptid, ein Bestandteil des Dp107 im gp41 gerichtet ist. Marker: SeeBlue Plus, Invitrogen.

Da die Ratte F1 mit einem BSA-ISU-Peptid-Konjugat immunisiert wurde, bildet sie auch Antikörper gegen BSA und weil die Virusproben im FKS-haltigem Medium waren und FKS auch BSA beinhaltet, wurde hier im Western-Blot auch BSA nachgewiesen.

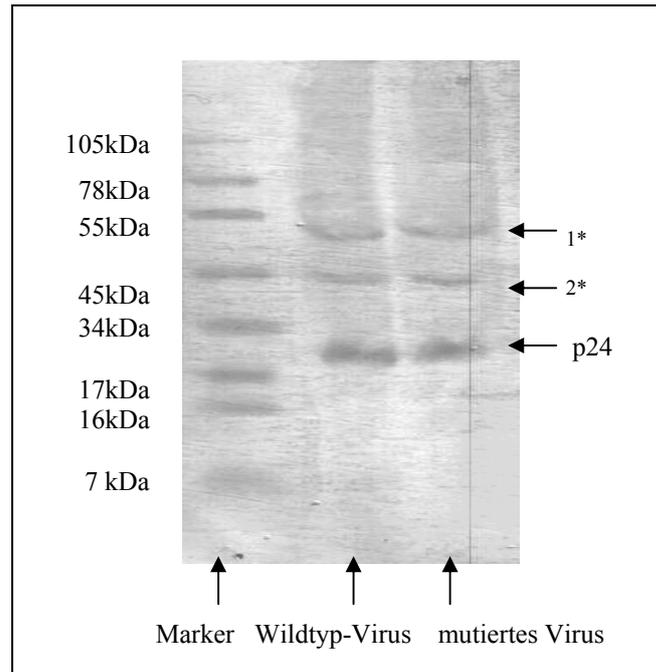


Abbildung 20: Reaktivität des Antikörpers gegen Gag (AG 3.0). Marker: SeeBlue Plus, Invitrogen. Die Banden 1* und 2* zeigen die p24-Vorläufer-Proteine, die ebenso durch den Antikörper gegen Gag detektiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Aminosäureaustausch im Epitop des Antikörpers 2F5 die Bindung des Antikörpers an sein Epitop verhindert.

4.5.3 Wirkung des Peptids Dp178 und des Antikörpers 2F5 auf die Replikation des mutierten Virus

Um zu zeigen, dass die Mutation im Epitop (ELDKWA→ELDEWA), die zum Verlust der Antikörperbindung im Western-Blot führte, eine echte Resistenz darstellt, wurde untersucht, ob der Antikörper 2F5 das mutierte Virus noch hemmen kann. Dazu wurde eine hohe Konzentration des Antikörpers 2F5 (128µg/ml) eingesetzt (Abbildung 21).

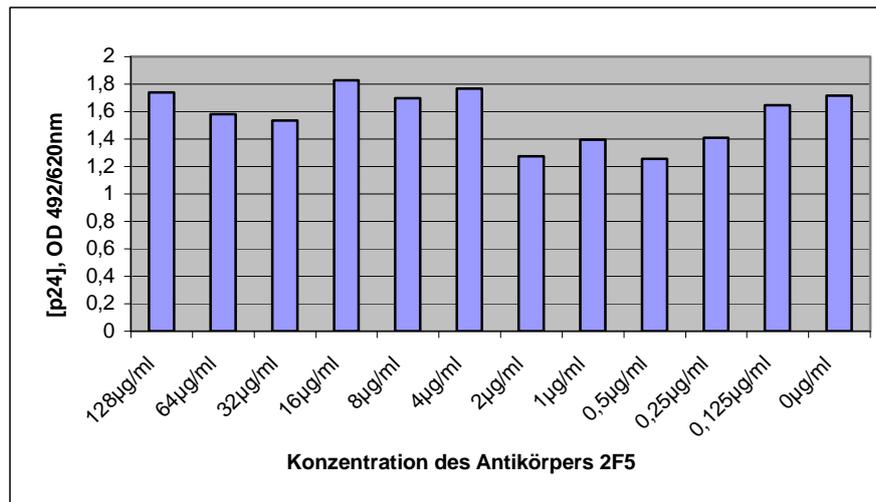


Abbildung 21: Analyse der Wirkung des Antikörpers 2F5 auf die Replikation des mutierten Virus. Der letzte Balken zeigt die Infektion ohne den monoklonalen Antikörper 2F5 (Negativkontrolle).

Die Analyse erfolgte mittels p24-Capture-ELISA. Die Daten zeigen, dass selbst bei 128µg/ml der Antikörper 2F5 die Infektion des mutierten Virus nicht mehr hemmen kann (Abbildung 21). Die Selektion der resistenten Viren erfolgte bei 0,3µg/ml und das Wildtyp-Virus konnte bei 0,75µg/ml gehemmt werden (Abbildung 13).

Damit wurde gezeigt, dass die Mutationen im Epitop ELDKWA zum Verlust der Antikörperbindung im Western-Blot und zu einer Resistenz gegenüber der neutralisierenden Wirkung des Antikörpers 2F5 führen.

4.5.4 Reproduzierbarkeit der Resistenzbildung bei suboptimaler Konzentration des Antikörpers 2F5

Um die erhaltenen Daten zu prüfen, wurde ein zweiter Versuch durchgeführt, bei dem ebenso eine suboptimale Konzentration des monoklonalen Antikörpers 2F5 (0,3µg/ml) eingesetzt wurde. Eine schematische Darstellung des Versuchs ist in Abbildung 22 gezeigt.

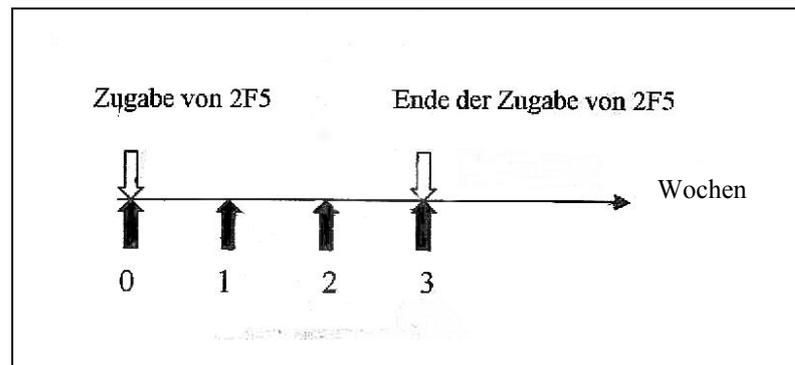


Abbildung 22: Schematische Darstellung des zweiten Versuchs zur Selektion von Resistenzen. Der monoklonale Antikörper 2F5 wurde zu den C8166-Zellen, die mit HIV-1/IIIB infiziert waren, dazugegeben (weisse pfeil). Proben für die DNA-Isolierung und PCR zum Provirus-Nachweis wurden wöchentlich entnommen (schwarze Pfeile).

Obwohl dieser Versuch nach drei Wochen aus technischen Gründen (Bakterienkontamination) abgebrochen wurde, wurde auch hier eine Mutation im Epitop festgestellt (Abbildung 23). Die Abbildung 23 zeigt nur die Aminosäuresequenzen des Ausgangsvirus (Woche 0) und des Provirus nach drei Wochen Behandlung mit dem Antikörper 2F5.

Woche 0 (vor der 2F5-Zugabe):
 ...EESQNQQEKNEQELL **ELDKWA**SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAXLS
 VNVRVRQGYSPFSQTHLPIPRGPDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDLLRS....

Woche 3:
 ...EESQNQQEKNEQELL **ELNKWA**SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLS
 VNVRVRQGYSPFSQTHLPIPRGPDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDLLRS....

Abbildung 23: Vergleich einer ausgewählten Region von gp41, die das von dem monoklonalen Antikörper 2F5 erkannte Epitop (ELDKWA) enthält. Vor (Woche 0) und drei Wochen nach der Zugabe des Antikörpers 2F5 wurde die DNA aus den Proben amplifiziert und sequenziert. Das Ausgangs-Epitop ist gelb und das mutierte 2F5-Epitop ist grün markiert.

Abbildung 23 zeigt die Mutation des Epitops von ELDKWA zu ELNKWA. In Ergänzung zu der Mutation im Epitop wurde ein konservativer Austausch (I→V) in Position 68 festgestellt (Abbildung 23).

4.5.5 Resistenzbildung bei hoher Antikörperkonzentration

In der ersten klinischen Studie zur Anwendung des Antikörpers 2F5 bei HIV-Infizierten Patienten betrug die Konzentration des Antikörpers im Plasma der Patienten während der Therapie 304-700µg/ml (Stiegler et al., 2002).

Deshalb wurde nach der Untersuchung der suboptimalen Dosis von 0,3µg/ml eine Dosis von 300µg/ml ausgewählt. Der Versuchsablauf war ähnlich wie in den Abbildungen 14 und 22 dargestellt.

Woche 0 (Vor der Zugabe des Antikörpers 2F5):
 ...EESQNQQEKNEQELL**ELDKWA**SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLS
 IVNRVRQGYSPFSFQTHLPIPRGPDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDLLRS....

Woche 4:
 ...EESQNQQEKNEQELL**ELDKWA**SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLS
 IVNRVRQGYSPFSFQTHLPIPRGPDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDLLRS....

Abbildung 24: Vergleich einer ausgewählten Region von gp41, die das von dem monoklonalen Antikörper 2F5 erkannte Epitop (ELDKWA) enthält. Vor (Woche 0) und drei Wochen nach der Zugabe des Antikörpers 2F5 (300µg/ml) wurde die DNA aus den Proben amplifiziert und sequenziert. Das 2F5-Epitop ist gelb markiert.

Der Vergleich der Sequenzen zeigt, dass bei Verwendung der höheren Konzentration (300µg/ml) des Antikörpers 2F5 in einem Zeitraum von vier Wochen keine Mutationen im Epitop nachgewiesen werden konnten (Abbildung 24).

4.6 Wirkung des Antikörpers 2F5 in Kombination mit dem Peptid Dp178 auf die Replikation des mutierten Virus

Nachdem gezeigt worden war, dass die Mutation im Epitop (ELDKWA) zu einer Resistenz gegen 2F5 führte, wurde untersucht, ob das Peptid Dp178, das der C-terminalen Helix des gp41 entspricht, die Replikation des mutierten Virus hemmen kann. Eine replikationshemmende Wirkung auf Wildtyp-Virus wurde im Kapitel 4.3 gezeigt. Bei Zugabe des Peptids Dp178 wurde ein hemmender Effekt auf das mutierte Virus noch bei 1,56µg/ml beobachtet (Tabelle 5). Beim Wildtyp-Virus lag die Konzentration des Peptids, die zur Hemmung geführt hat in derselben Größenordnung (3,12µg/ml, Tabelle 4). Diese Daten zeigen, dass die Mutation im Epitop

(ELDKWA→ELDEWA) die Bindung des Peptids Dp178 an die N-terminale Helix, die als Ursache der Infektionshemmung angesehen wird, nicht beeinträchtigt.

Dass der Antikörper 2F5 die Replikation des mutierten Virus nicht hemmen kann, war bereits in Abbildung 21 gezeigt und erneut bestätigt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Minimale Konzentration des Peptids Dp178 und des Antikörpers 2F5 (einzeln oder in Kombination), die die Replikation des mutierten HIV-1 hemmt. Nullwerte zeigen die Infektion ohne Hemmstoffe (Negativkontrolle)

Hemmstoff	Konzentration	Mutiertes Virus
Dp178	1,56µg/ml	Hemmung
	0,78µg/ml	Infektion
	0µg/ml	Infektion
Antikörper 2F5	128µg/ml	Infektion
	4µg/ml	Infektion
	0µg/ml	Infektion
Dp178 und Antikörper 2F5	6,25µg/ml und 16µg/ml	Hemmung
	3,11µg/ml und 8µg/ml	Infektion
	0µg/ml und 0µg/ml	Infektion

Bei simultaner Gabe des Peptids Dp178 und des Antikörpers 2F5 ist die minimale Konzentration des Peptids, die zu einer Hemmung führt, grösser (6,25µg/ml gegenüber 1,56µg/ml), was möglicherweise durch Interaktion des Antikörpers 2F5 mit dem Peptid Dp178 erklärt werden kann. Das 2F5-Epitop ist Bestandteil des Peptids Dp178.

Um diesen Umständen entgegen zu treten wurde eine verkürzte Form des Peptids Dp178 verwendet (Dp178Δ). Die deletierte Form enthält die letzten 12 Aminosäuren des Peptids Dp178 nicht (Abbildung 25).

Dp178	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLEELDKWASLWNWF
Dp178Δ	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL

Abbildung 25: Sequenz des Peptids Dp178 und des Peptids Dp178Δ. Das Epitop des Antikörpers 2F5 ist gelb markiert

Das Peptid Dp178Δ wurde einzeln und in Kombination mit dem Antikörper 2F5 auf Wildtyp- und mutiertes Virus getestet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Minimale Konzentrationen des Peptids Dp178Δ und des Antikörpers 2F5, die zur Hemmung der Replikation des Wildtyp-Virus und des mutierten Virus führen. Nullwerte zeigen die Infektion ohne Hemmstoff (Negativkontrolle).

Hemmstoff	Konzentration	Wildtypvirus	Konzentration	Mutiertes Virus
Dp178Δ	800µg/ml	Infektion	800µg/ml	Infektion
	25µg/ml	Infektion	25µg/ml	Infektion
	0µg/ml	Infektion	0µg/ml	Infektion
Antikörper 2F5	4µg/ml	Hemmung	128µg/ml	Infektion
	2µg/ml	Infektion	4µg/ml	Infektion
	0µg/ml	Infektion	0µg/ml	Infektion
Antikörper 2F5 und Dp178Δ	2µg/ml und 50µg/ml	Hemmung	128µg/ml und 800µg/ml	Infektion
	1µg/ml und 12,5µg/ml	Infektion	4µg/ml und 25µg/ml	Infektion
	0µg/ml und 0µg/ml	Infektion	0µg/ml und 0µg/ml	Infektion

Die Ergebnisse zeigen, dass das Peptid Dp178Δ bei hoher Konzentration bis 800µg/ml weder die Infektion durch das Wildtyp-Virus noch durch das mutierte Virus hemmen kann. Der Antikörper 2F5 hemmt wie erwartet das Wildtyp-Virus, jedoch nicht das mutierte Virus, selbst bei hoher Konzentration. Die Kombination des Antikörpers 2F5 und des Peptids Dp178Δ (2µg/ml und 50µg/ml) führt zu einer Hemmung, allerdings kann aufgrund der geringen Zahl der Versuche keine Aussage getroffen werden, ob das Peptid Dp178Δ in Kombination mit dem Antikörper 2F5 einen additiven Effekt zeigt. Das mutierte Virus wird von der Kombination beider Komponente nicht gehemmt.

4.7 Expression von Fusionshemmern auf der Zelloberfläche als gentherapeutischer Ansatz

Wenn das Peptid Dp178 (T20) in der Lage ist, HIV-Infektion zu verhindern, müsste die Expression dieses Peptids als rekombinantes Protein auf der Oberfläche einer uninfizierten Zelle einen therapeutischen Nutzen bringen. Deshalb wurden Expressionsvektoren mit den Sequenzen, die Dp107 und Dp178 entsprechen, entwickelt und auf der Zelloberfläche exprimiert. Als Vektor wurde pDisplay verwendet, der eine Signalsequenz enthält, mit deren Hilfe das rekombinante Protein auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann. Als Zielzellen wurden CD4⁺-HeLa-Zellen verwendet.

4.7.1 Klonierung von Sequenzen, die Dp107 bzw. Dp178 entsprechende rekombinante Proteine kodieren

4.7.1.1 Amplifikation dieser Sequenzen aus dem pNL4-3-Vektor

pNL4-3-Vektor enthält ein komplettes HIV-Provirus. Es wurden Primer konstruiert, die ausserhalb der entsprechenden Sequenzen binden und am 5'-Ende eine *Bgl*III- und am 3'-Ende eine *Pst*I-Schnittstelle ergänzen. Die PCR-Produkte sind in Abbildung 26 dargestellt. Die Amplifikate der Sequenz, die die Region von Dp107 enthielt, waren 203bp lang und die, die die Region von Dp178 enthielten, waren 171bp lang (Abbildung 26).

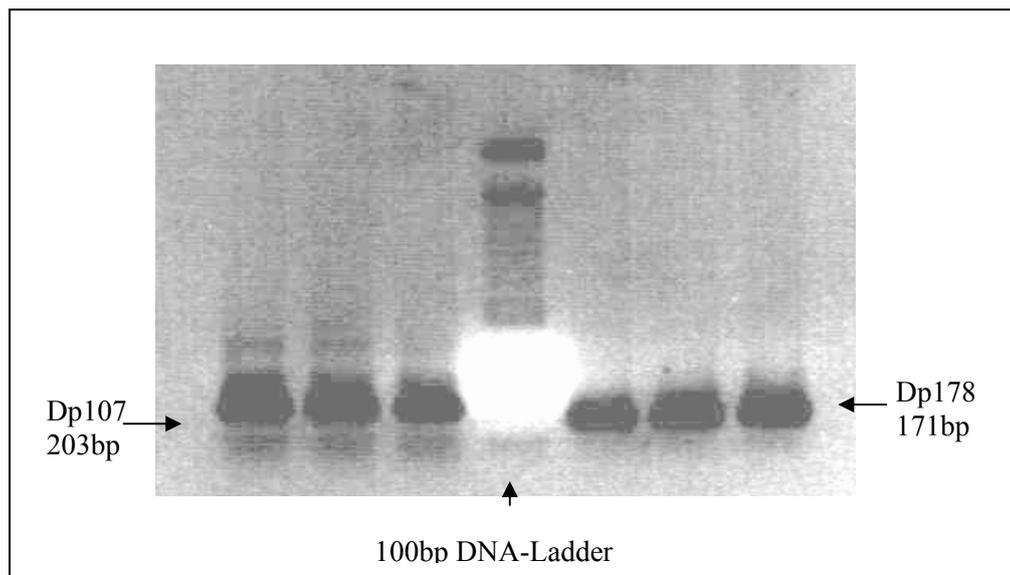


Abbildung 26: Agarosegelelektrophorese der Amplifikate nach der PCR mit Primern, mit deren Hilfe die Sequenzen amplifiziert wurden, die den Sequenzen von Dp107 und Dp178 entsprechende Regionen enthalten. Grössenstandard: 100bp-Ladder

4.7.1.2 Klonierung der PCR-Produkte in den pDisplay-Vektor

Die unter dem Punkt 4.7.1.1 erhaltenen PCR-Produkte und der pDisplay-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Pst*I inkubiert. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschliessend aus dem Gel isoliert und aufgereinigt.

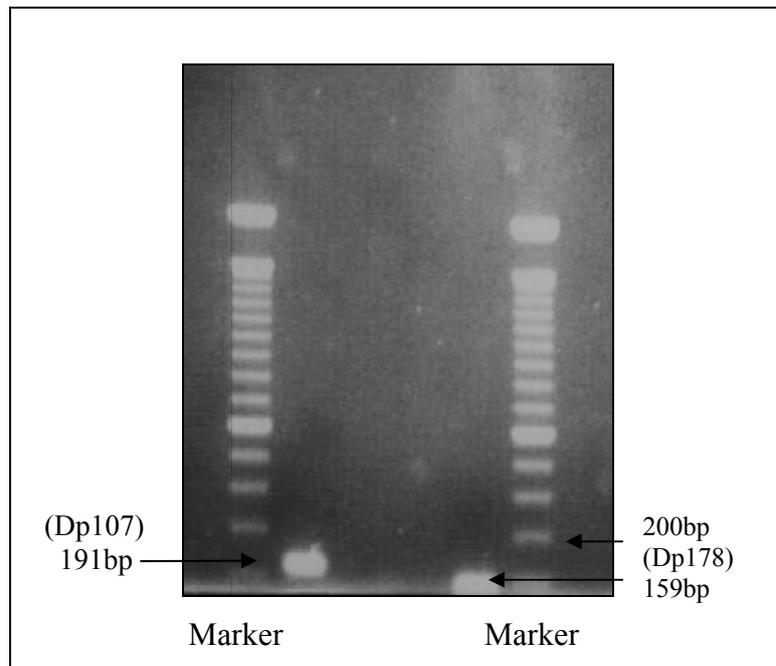


Abbildung 27: Agarosegelelektrophorese der Amplifikate nach der PCR mit Primern, mit deren Hilfe die Sequenzen amplifiziert wurden, die den Sequenzen von Dp107 und Dp178 entsprechende Regionen enthalten, nach der Inkubation mit BglIII und PstI. Grössenstandard: 100bp-DNA-Ladder

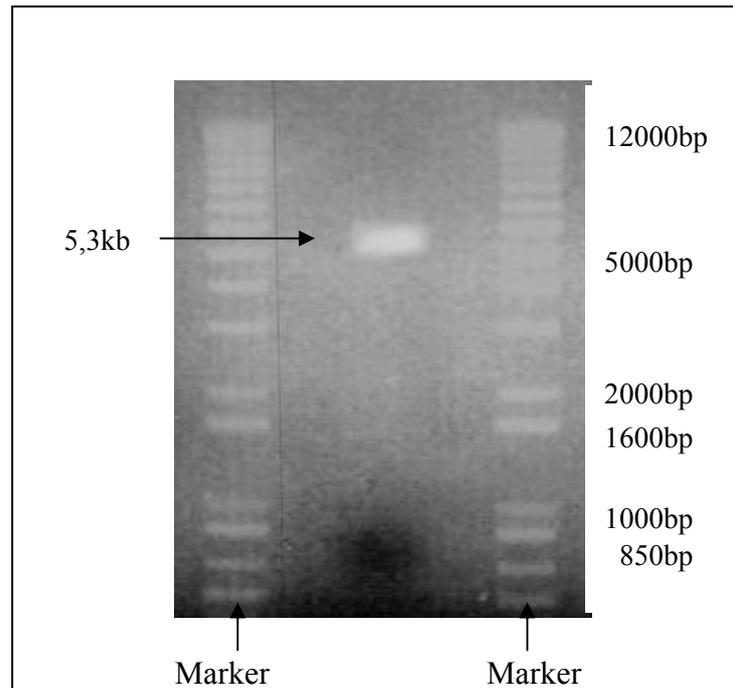


Abbildung 28: Agarosegelelektrophorese des pDisplay-Vektors nach der Inkubation mit *BglII* und *PstI*. Grössenstandard: 1kb Plus

4.7.1.3 Transformation von Top10-*E.coli*-Zellen

Die unter dem Punkt 4.7.1.2 erhaltenen Produkte nach der Inkubation mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *PstI* wurden miteinander ligiert, anschliessend in Top10 *E.coli*-Zellen transformiert und auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert. Aus einzelnen Kolonien wurde Plasmid-DNA im Miniprep-Verfahren isoliert und mittels Restriktionsanalyse untersucht. Dafür wurden die Enzympaare *EcoRI/XhoI* und *BglII/PstI* eingesetzt.

Die Klone, die nach der Inkubation mit *EcoRI/XhoI* ein Produkt von 542bp bzw. 510bp ergaben, enthielten die Sequenzen von Dp107 bzw. Dp178. Die Analyse des Leervektors ergab ein 351bp grosses Produkt (Abbildung 29). Ein zusätzlicher Verdau mit *BglII/PstI* reduzierte die Produkte auf 215bp für die Sequenz, die Dp107 entspricht, und 183bp für die Sequenz, die Dp178 entspricht (Abbildung 29).

Die Restriktionsanalyse zeigte, dass die untersuchten Klone die entsprechenden Plasmide enthielten. Der Vektor, der die Sequenz Dp107 enthielt, wurde als pDisplay-Dp107 und der, der die Sequenz Dp178 enthielt, als pDisplay-Dp178 bezeichnet.

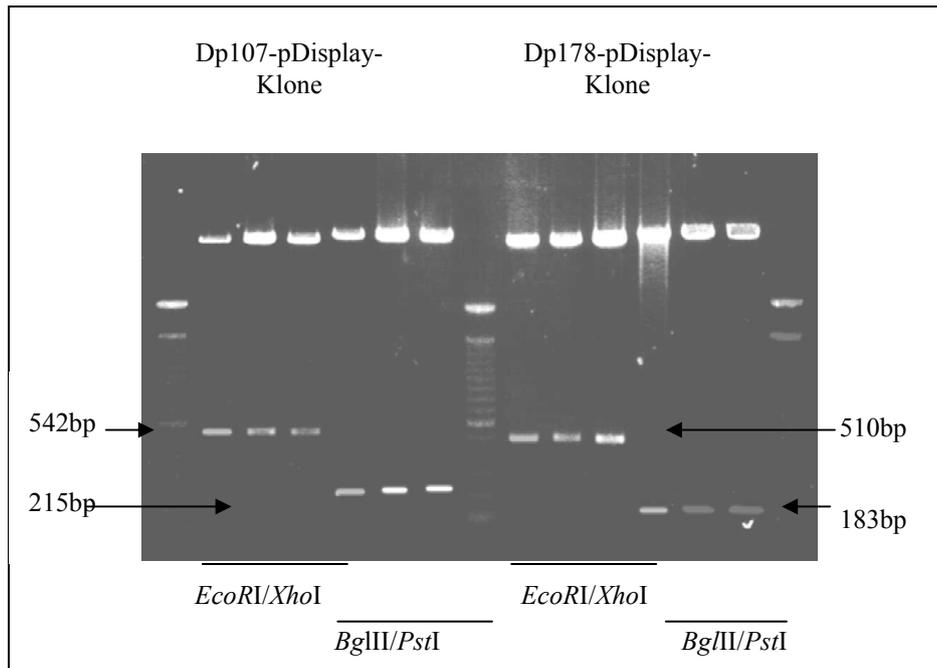


Abbildung 29: Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli* Klonen nach der Inkubation mit *BglII/PstI* bzw. *EcoRI/XhoI*. Grössenstandard: 100bp-DNA Ladder.

Aus diesen *E.coli* Klonen wurde erneut mittels Maxiprep-Verfahren DNA isoliert und für Transfektion der CD4⁺-HeLa-Zellen verwendet. Die DNA-Konstrukte, pDisplay-Dp107 und pDisplay-Dp178 wurden mittels Primer, die die Dp107 bzw. Dp178 entsprechende Sequenzen erkennen, amplifiziert und sequenziert. Damit wurde bestätigt, dass die Klone die entsprechenden Sequenzen enthalten.

4.7.2 Transfektion der HeLa-Zellen mit pDisplay-Dp107 bzw. pDisplay-Dp178

Die DNA-Konstrukte pDisplay-Dp107 und pDisplay-Dp178 wurden durch Zugabe von Transfast-Reagenz in CD4⁺-HeLa-Zellen transfiziert. Da der verwendete Vektor das *neo*-Gen enthielt, das die Genitacin-Resistenz verleiht, wurden die transformierten Zellen mittels Genitacin selektiert und Genitacin-Resistente Klone wurden dann auf Expression der gp41 entsprechenden Sequenzen analysiert. Dazu wurden eine FACS- und eine Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Zur Detektion des rekombinanten Proteins, das die Domäne enthält, die Dp178 entspricht, wurde der monoklonale Antikörper 2F5 verwendet. Für die Detektion der Zellen, die ein rekombinantes Protein exprimieren, das der Region Dp107 entspricht, wurde der monoklonale Antikörper B3

verwendet, dessen Epitop in der immunsuppressiven Domäne, die mit der Dp107-Region überlappt, liegt.

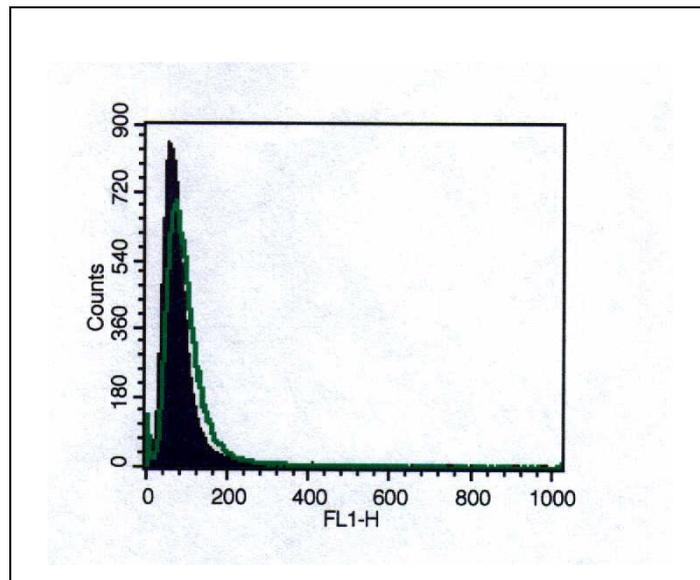
Der monoklonale Antikörper B3 reagiert im ELISA und im Western-Blot mit dem Peptid Dp107 und der monoklonale Antikörper 2F5 mit dem Peptid Dp178.

Die FACS-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 und FITC-markiertem Anti-Humanem IgG zeigten, dass die mit pDisplay-Dp178 transfizierten HeLa-Zellen das rekombinante Protein (Dp178) auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Abbildung 30). Die Untersuchung der mit pDisplay-Dp107 transfizierten HeLa-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper B3 ergab ein leicht positives Ergebnis (Abbildung 31). Da der Antikörper B3 im ELISA und Western-Blot nur schwach mit dem ISU-Peptid bzw. mit dem Peptid Dp107 reagierte und kein anderer Antikörper zur Detektion der Dp107-Domäne vorlag, kann dieses Ergebnis nicht vollständig bewertet werden.

Die Analyse der mit pDisplay-Dp178 transfizierten HeLa-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 mittels Immunfluoreszenz zeigte ebenfalls eine positive Anfärbung dieser Zellen (Abbildung 32), während die Analyse der mit pDisplay-Dp107 transfizierten HeLa-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper B3 wiederum nur eine sehr schwache Reaktivität zeigte (Abbildung 33).

Damit wurde eindeutig gezeigt, dass die mit pDisplay-Dp178 transfizierten HeLa-Zellen auf ihrer Oberfläche rekombinantes Protein exprimieren, dessen Sequenz eine Domäne enthält, die der Dp178-Domäne entspricht. Die Ergebnisse der Analyse der mit pDisplay-Dp107 transfizierten HeLa-Zellen ist weniger eindeutig, was auf die Schwäche des Antikörpers zurückzuführen ist.

A:



B:

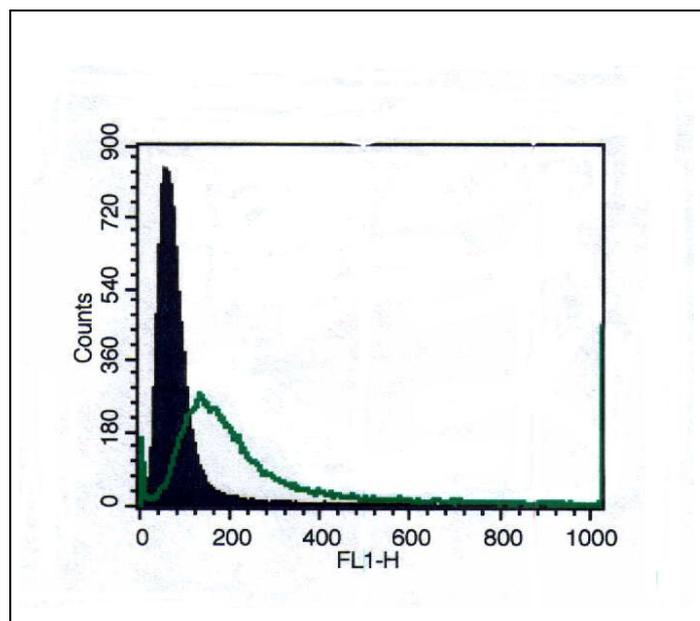
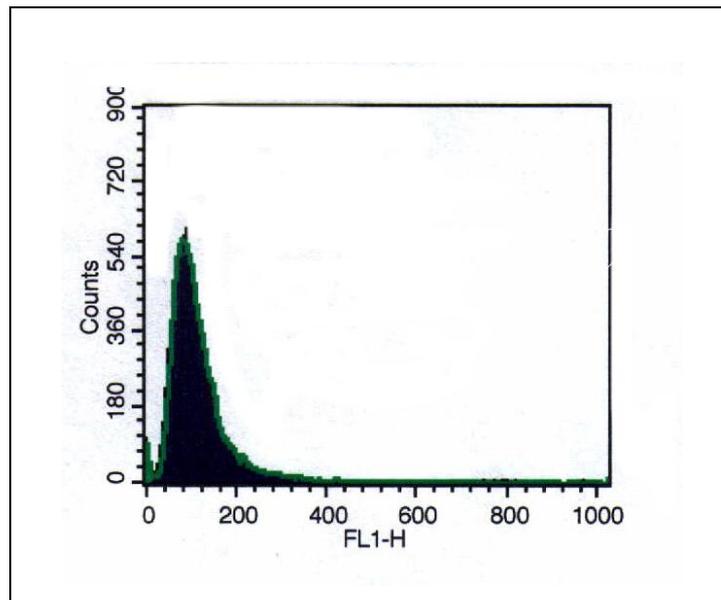


Abbildung 30: FACS-Analyse nichttransfizierter (A) und mit pDisplay-Dp178 transfizierter HeLa-Zellen (B) mit dem monoklonalen Antikörper 2F5.

A:



B:

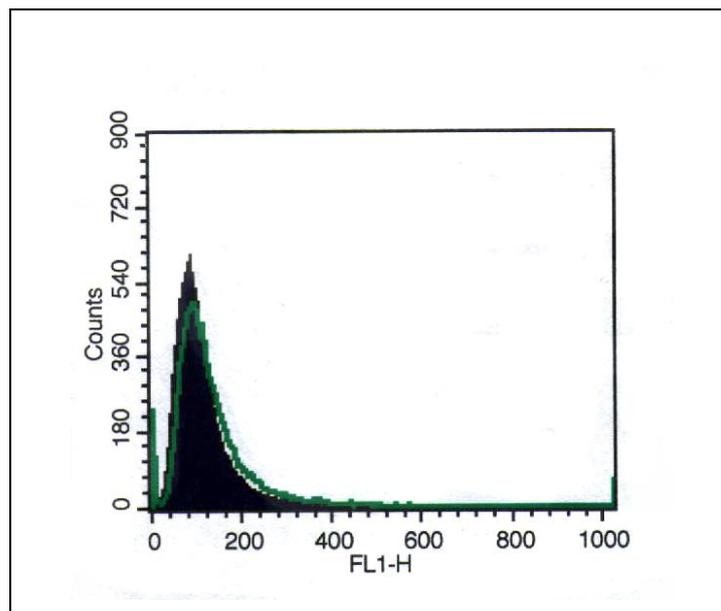


Abbildung 31: FACS-Analyse nichttransfizierter (A) und mit pDisplay-Dp107 transfizierter HeLa-Zellen (B) mit dem monoklonalen Antikörper B3.

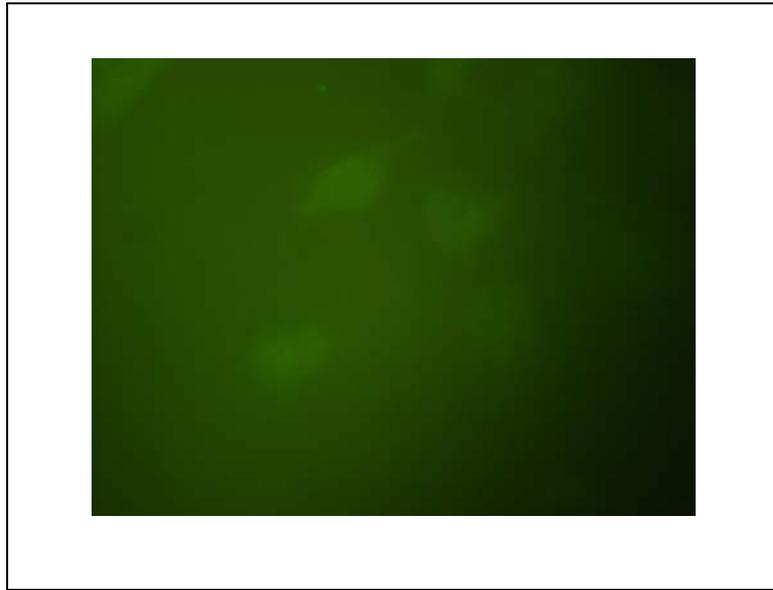
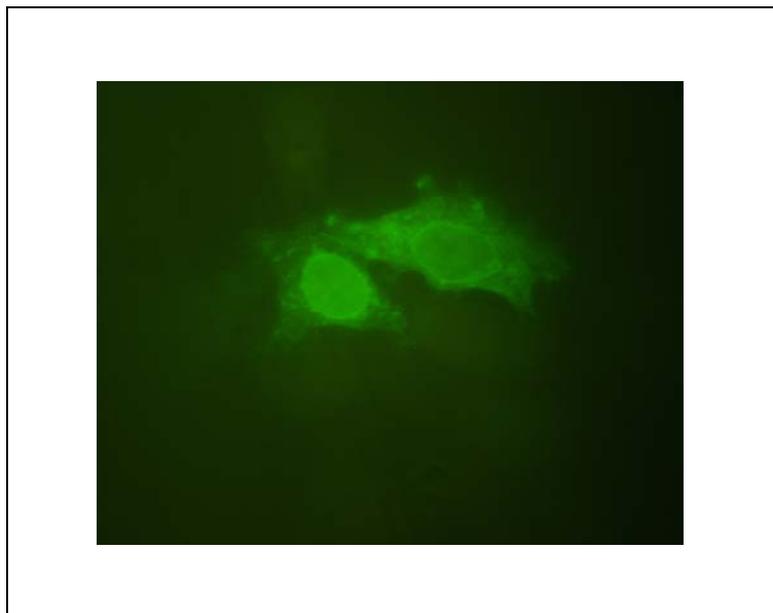
A:**B:**

Abbildung 32: Immunfluoreszenzanalyse nichttransfizierter (A) und mit pDisplay-Dp178 transfizierter HeLa-Zellen (B) mit dem monoklonalen Antikörper 2F5.

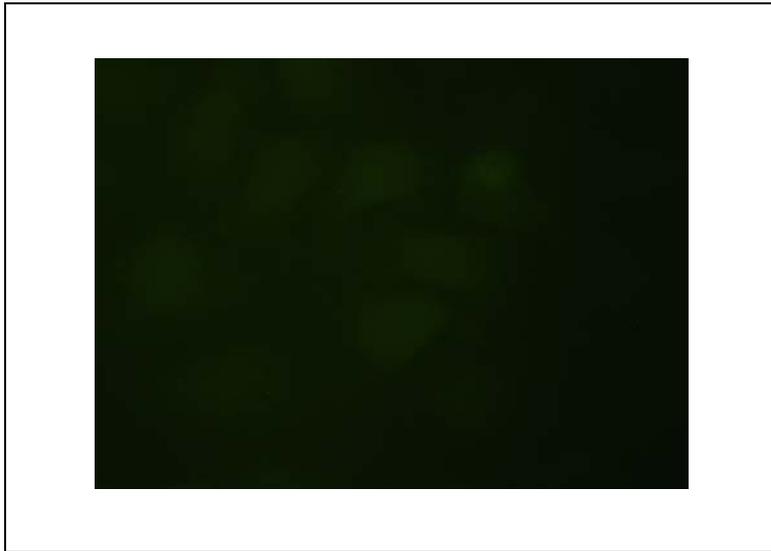
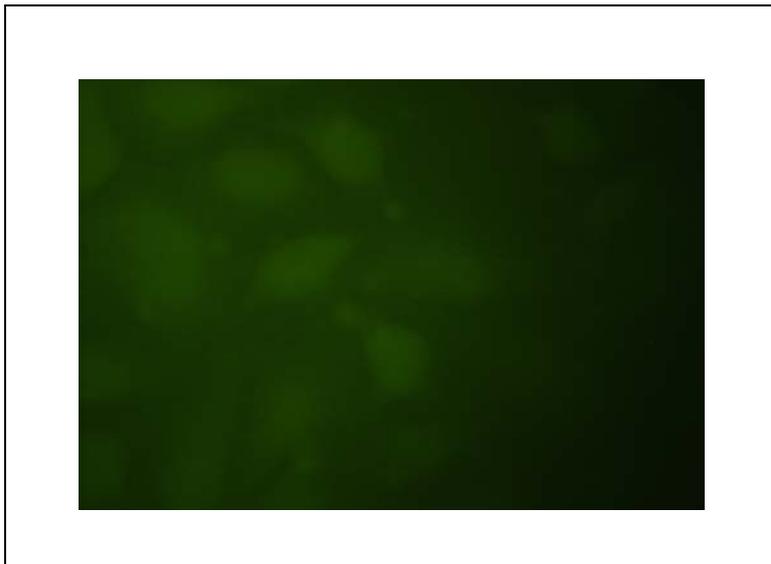
A:**B:**

Abbildung 33: Immunfluoreszenzanalyse nichttransfizierter (A) und mit pDisplay-Dp107 transfizierter HeLa-Zellen (B) mit dem monoklonalen Antikörper B3.

5 Diskussion

5.1 Wie hemmt das Peptid Dp178 (T20) die HIV-Replikation?

Das Peptid Dp178 wurde von der C-terminalen Helix des gp41 abgeleitet und hemmt die Replikation von HIV (Wild et al., 1994b). Es bindet an die N-terminale Helix im gp41 und verhindert die Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran.

Während in dem C8166-Zellsystem das Peptid Dp178 die Replikation von HIV-1/IIIB bei 3,12µg/ml hemmen konnte, hemmte Dp178 in einem anderen *In vitro*-System HIV-1/LAI-vermittelte Zell-Zell-Fusion in CEM-Zellen bei 1,4ng/ml und die Infektion mit HIV-1/LAI bei 6ng/ml.

Um die 90%ige Hemmung eines anderen HIV-Isolats, HIV-1/MN, in CEM-Zellen zu erreichen, mussten allerdings 51ng/ml eingesetzt werden (Wild et al., 1994b). Diese Daten zeigen, dass die Aktivität des Peptids Dp178 von dem verwendeten Virusisolat und den eingesetzten Zellen abhängig ist. Diese Abhängigkeit könnte eine Erklärung dafür sein, dass zur Hemmung der Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen mehr Peptid Dp178 notwendig war als zur Hemmung von HIV-1/LAI bzw. HIV-1/MN in den CEM-Zellen.

5.2 Wie hemmt das Peptid Dp107 und das ISU-Peptid die HIV-Replikation?

Das Peptid Dp107, ein von der N-terminalen Helix des HIV-1-gp41 abgeleitetes Peptid, ist das erste synthetische Peptid, für das eine hemmende Wirkung gezeigt wurde. Ein weiteres Peptid, Dp116 (17mer) aus demselben Bereich des gp41 konnte die Infektion nicht hemmen (Wild et al., 1992). Es ist bekannt, dass die Peptide, die von der N-terminalen Helix des gp41 abgeleitet wurden, wie z.B. das Peptid Dp107, weniger effektiv die HIV-Infektion hemmen als die Peptide, die der C-terminalen Helix des gp41 entsprechen, wie das Peptid Dp178. Das Peptid Dp107 bildet durch Selbst-Assoziation Dimere oder Tetramere, die als Sekundärstruktur stabilisiert sind (Wild et al., 1992). Das Leucine-zipper ähnliche Motiv auf dem Peptid Dp107 ist verantwortlich für diese Oligomerisation (Gallaher et al., 1989).

Das Peptid Dp107 konnte die Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen selbst bei höheren Konzentrationen bis zu 50µg/ml nicht hemmen (Abbildung 9), während in einer anderen Studie (Wild et al., 1992) das Peptid Dp107 die Replikation von HIV-1/IIIB in CEM-Zellen schon bei 6µg/ml hemmte. In dieser Studie wurden uninfizierte MOLT-4-Zellen mit HIV-1/IIIB

infizierten CEM-Zellen kokultiviert und die Wirkung von dem Peptid Dp107 wurde auf die Zellfusion und Infektion getestet.

Es gibt zwei Möglichkeiten wie das von der N-terminalen Helix abgeleitete Peptid Dp107 die Infektion unterbinden kann. Die erste Möglichkeit ist, dass das Peptid sich an exponierte C-terminale Helices im gp41 bindet und dadurch die Bildung der fusionsaktiven Konformation behindert. Die zweite Möglichkeit ist, dass es sich mit den N-terminalen Helices zusammenlagert und heterotrimere Coiled-Coil-Strukturen bildet, und dadurch mit der Bildung der Coiled-Coil-Struktur im gp41 des Virus interferiert. Im Vergleich zu den von der C-terminalen Helix abgeleiteten Peptide, wie das Peptid Dp178, die als Monomer vorliegen, müssen sich die von der N-terminalen Helix abgeleiteten Peptide als Dimere oder Tetramere zwischen den Kern aus N-terminalen Helices und die aussen liegenden C-terminalen Helices lagern, um die Bildung der fusionsaktiven Struktur des gp41 verhindern zu können, was aus sterischen Gründen schwierig ist. Das führt dazu, dass die von der N-terminalen Helix abgeleiteten Peptide weniger effektiv die HIV-Infektion hemmen können.

Parallel zur Analyse der Wirkung des Peptids Dp107 wurde gezeigt, dass zur Hemmung von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen mit dem Peptid Dp178 ca. 1500 Mal mehr Peptid eingesetzt werden musste als zur Hemmung von HIV-1/LAI bzw. HIV-1/MN in den CEM-Zellen. Im Fall des Peptids Dp107 könnte eventuell auch die Peptid-Konzentration, die zur Hemmung von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen führt, viel höher liegen. Diese Hemmversuche sollten daher mit grösseren Mengen des Peptids wiederholt werden.

Ein anderes Peptid, das ebenso von der N-terminalen Helix und zwar von der immunsuppressiven Domäne des transmembranen Proteins abgeleitet wurde, ist das ISU-Peptid. Die ISU-Domäne des gp41 überlappt mit dem C-Terminus der dem Peptid Dp107 entsprechenden Sequenz (Abbildung 5), und besitzt zusätzlich zu der antiretroviralen Aktivität immunsuppressive Eigenschaften (Denner et al., 1994). Das ISU-Peptid kann nur gekoppelt an ein Trägermolekül wirksam sein (Qureshi et al., 1990; Denner et al., 1994).

Obwohl das ISU-Peptid gegenüber dem Peptid Dp107 eine kleinere „Bindungsfläche“ aufweist, da das ISU-Peptid weniger hydrophobe Reste zur Wechselwirkung mit der C-terminalen Helix im gp41 von HIV bietet, wird durch das Trägermolekül und die Bindung mehrerer ISU-Peptid-Moleküle ein entsprechend grosses Molekül erreicht. Ein Vorteil des ISU-Peptids könnte in den geringeren Produktionskosten liegen.

Das Dextran-ISU-Peptid konnte die Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen selbst bei 34µg/ml (entspricht der molaren Masse wie 50µg/ml des Peptids Dp107) nicht hemmen (Abbil-

dung 10), während die Aktivität eines anderen ISU-Peptid-Konjugats, BSA-ISU-Peptid, gezeigt werden konnte (Denner et al., 1994).

Es könnte sein, dass das Dextran-ISU-Konjugat weniger effektiv ist als BSA-ISU-Konjugat oder andere ISU-Konjugate, weil sich hier eine andere Anordnung der Peptide auf der Oberfläche des Dextranmoleküls ergeben könnte. Hier muss auch hervorgehoben werden, dass das verwendete Dextran-ISU-Konjugat auch keine immunsuppressive Aktivität aufweist (Denner et al., unveröffentlicht).

5.3 Wie hemmt der monoklonale Antikörper 2F5 die HIV-Replikation?

Die HIV-Hüllproteine werden als ein glykosylierter Vorläufer, gp160, gebildet, der proteolytisch in gp120 und gp41 gespalten wird. Viele Antikörper, die nach der HIV-Infektion gebildet werden, sind gegen diese Hüllproteine gerichtet, haben aber keine neutralisierende Aktivität. Die Antikörper, die neutralisierende Aktivität besitzen, kommen nur in kleineren Titern vor. Ungeachtet dessen wurde in Patienten ein monoklonaler Antikörper, 2F5, gefunden, der an gp41 bindet und eine Reihe von HIV-Stämmen neutralisiert (Muster et al., 1993; Purtscher et al., 1994). Das Epitop von dem Antikörper 2F5 wurde als ELDKWA (Aminosäure 662 bis 667) am C-Terminus der gp41-C-terminalen Helix beschrieben und das ist bei 72% aller HIV-Stämme vorhanden (Muster et al., 1993). Das zeigt, dass das 2F5-Epitop bei den HIV-Stämmen hoch konserviert ist.

Der Antikörper 2F5 konnte die Replikation von HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen bei 0,25µg/ml hemmen (Abbildung 11).

Stiegler et al. (2001) zeigten, dass der monoklonale Antikörper 2F5 die Infektion durch HIV-1/IIIB in den AA-2 Zellen bei 0,3µg/ml, also bei einer vergleichbaren Konzentration, hemmte. Verschiedene Primärisolate von HIV-1 wurden in einem weiteren Neutralisationstest in PBMCs untersucht. Die notwendige Konzentration des monoklonalen Antikörpers 2F5, um 50% Hemmung der Infektion zu erzielen, betrug 2,6µg/ml. Durch eine klinische Phase I Studie wurde die Wirkung des neutralisierenden Antikörpers 2F5 in Kombination mit dem Antikörper 2G12 auch *in vivo* gezeigt (Stiegler et al., 2002). Diese Studie hat sich zwar auf eine kleine Gruppe von HIV-Infizierten beschränkt und dabei wurde keine Kontrollgruppe getestet, aber sie zeigte eine signifikante Senkung der Viruslast bei den Patienten durch Zugabe der monoklonalen Antikörper 2F5 und 2G12.

Diese Daten zeigen, dass der Antikörper 2F5 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Replikation von HIV unterbinden, und dadurch eine effektive Anti-HIV-Substanz für die HIV-Chemotherapie darstellen kann.

Mit welchem Mechanismus der monoklonale Antikörper 2F5 die HIV-Infektion hemmt, ist noch unklar. Eine Möglichkeit ist, dass der Antikörper 2F5 an sein Epitop in der C-terminalen Helix (ELDKWA) bindet, bevor das gp120 an den CD4-Rezeptor gebunden hat, weil das 2F5-Epitop auch in diesem Zustand exponiert sein könnte. Die Bindung des Antikörpers 2F5 an sein Epitop behindert durch seine Grösse die Bindung des gp120 an den CD4-Rezeptor auf der Zielzelle, wodurch keine Fusion der Virushülle mit der Zellmembran stattfinden kann. Eine zweite Möglichkeit ist, dass der Antikörper 2F5 nach der Bindung des gp120 an den CD4-Rezeptor und den Korezeptor auf der Zielzelle an sein Epitop bindet, und dadurch sterisch das Zusammenklappen der Helices und die Bildung der fusionsaktiven Konformation des gp41 behindert. Die dritte Möglichkeit ist, dass der Antikörper 2F5 sowohl die C-terminale als auch an ein noch unbekanntes Epitop auf der N-terminalen Helix bindet und dadurch die Hairpinstrukturen stabilisiert und verhindert, dass die Zellmembran mit der Virushülle fusioniert. Es wurde gezeigt, dass die Sequenz ELDKWA nur einen Teil des 2F5-Epitops darstellt (Neurath et al., 1995). Voraussetzung dafür wäre aber, dass der Antikörper 2F5 sowohl die N-terminale- als auch die C-terminale Helix binden könnte. Die Bindung des monoklonalen Antikörpers 2F5 an sein Epitop könnte auch die Konformationen an anderen Stellen des gp41 ändern, die für erste Phase der Infektion verantwortlich sind.

5.4 Entstehen resistente HIV-Stämme nach der Behandlung mit dem neutralisierenden Antikörper 2F5?

Im Laufe einer HIV-Infektion treten Mutationen auf, die durch die Reverse Transkriptase (RT) beim Umschreibevorgang von RNA zu DNA verursacht wurden. Die Fähigkeit von HIV, durch Mutation sein Erbgut und damit seine Proteine zu verändern, bildet die Grundlage für den Wirkverlust antiretroviraler Medikamente.

Für den Fusionshemmer T20 (Dp178) wurden Fluchtmutanten nachgewiesen (Wild et al., 1994). Die Mutationen traten im Bereich der N-terminalen Domäne auf, an die das Peptid bindet und somit das Zusammenklappen der gp41-Helices behindert (Rimsky et al., 1998). Die Mutationen führen dazu, dass das Peptid Dp178 nicht mehr stabil genug an die N-terminale Helix im gp41 binden, und dadurch die Infektion nicht mehr hemmen kann.

Für den neutralisierenden Antikörper 2F5 sind die Fluchtmutanten noch nicht untersucht worden. Es wurden jedoch primäre HIV-Stämme isoliert, die von vornherein gegen den neutralisierenden Antikörper 2F5 resistent waren (Purtscher et al., 1996; Trkola et al., 1995). Die Analyse der Aminosäuresequenzen hat gezeigt, dass die wichtigsten Aminosäuren im 2F5-Epitop (ELDKWA) LDKW sind (Purtscher et al., 1996). Es wurde auch gezeigt, dass Aminosäureaustausche von D zu N, von D zu E, von K zu N und von K zu E die Bindung von 2F5 an sein Epitop verhindern (Purtscher et al., 1994 und 1996).

Aufgrund dieser Daten stellte sich die Frage, ob durch die Behandlung mit dem Antikörper 2F5 resistente HIV-Stämme selektiert werden können. Um diese Frage zu beantworten wurden zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Zum einen eine suboptimale Konzentration, bei der gerade eine Infektion stattfinden konnte und zum zweiten eine hohe Konzentration, die zur vollständigen Hemmung der HIV-Infektion führen sollte.

Eine suboptimale Konzentration des Antikörpers 2F5 wurde ausgewählt, weil im Falle einer HIV-Therapie mit dem neutralisierenden Antikörper 2F5 der Antikörper-Titer im Körper nicht überall gleich hoch bleibt. Daher sollte untersucht werden, ob sich die resistenten HIV-Stämme bei einer Konzentration, die nicht zur 100%igen Hemmung führt, durchsetzen können.

Als suboptimale Konzentration wurde 0,3µg/ml ausgewählt. Das war die geringste Konzentration, bei der noch eine Infektion stattgefunden hat (Abbildung 13).

Die Analyse der Aminosäuresequenzen hat gezeigt, dass vier Wochen nach der Behandlung mit dem Antikörper 2F5 eine Mutation in seinem Epitop (ELDKWA→ELDEWA) nachzuweisen war. Hierbei handelte es sich um einen K→E Austausch. Vier Wochen nachdem die Mutation im Epitop nachgewiesen wurde, blieb die neue Sequenz (ELDEWA) unverändert (Abbildung 16).

Selbst nach dem Absetzen des Antikörpers 2F5 blieb das mutierte Epitop erhalten (Abbildung 16). Die Tatsache, dass ohne den Antikörper 2F5 (Selektionsdruck) keine Rückmutation zum ursprünglichen Epitop stattgefunden hat, könnte darauf hindeuten, dass das ursprüngliche Epitop (ELDKWA) keinen Selektionsvorteil für das Virus darstellt.

Dieses Ergebnis wurde durch einen zweiten Test mit derselben suboptimalen Konzentration (0,3µg/ml) bestätigt. Hier konnte allerdings bereits nach drei Wochen eine Mutation, und zwar eine andere als bei dem ersten Test im 2F5-Epitop festgestellt werden (ELDKWA→ELNKWA). Die Analyse der Aminosäuresequenzen zeigte, dass es sich in diesem Fall um einen D→N Austausch handelte (Abbildung 23).

Nachdem gezeigt wurde, dass durch die Behandlung mit dem Antikörper 2F5 bei einer suboptimalen Konzentration Mutationen in seinem Epitop auftreten, sollte der Einfluss einer hohen Konzentration des Antikörpers auf die Resistenzbildung im 2F5-Epitop analysiert werden.

Als hohe Konzentration des Antikörpers 2F5 wurde 300µg/ml ausgewählt. Diese Konzentration entspricht etwa dem niedrigsten Antikörper-Titer, der in der ersten klinischen Studie mit dem Antikörper 2F5 im Plasma der Patienten gemessen wurde (304-700µg/ml) (Stiegler et al., 2002). Die Analyse der Aminosäuresequenzen hat gezeigt, dass nach der Behandlung der infizierten C8166-Zellen mit 300µg/ml Antikörper 2F5, die zur vollständigen Hemmung führen sollte, nach vier Wochen keine Mutationen im 2F5-Epitop nachzuweisen waren (Abbildung 24).

Um zu untersuchen, ob die Mutationen durch die Behandlung mit dem Antikörper 2F5 nur im 2F5-Epitop auftreten, wurde die komplette Sequenz des gp41 vor der Behandlung mit dem Antikörper 2F5 mit der gp41-Sequenz nach vier Wochen Behandlung mit dem Antikörper verglichen (Abbildung 17). Dieser Vergleich zeigte, dass neben der relevanten Mutation im Epitop ELDKWA nur konservative Aminosäureaustausche (z.B. Valin zu Isoleucin) in den anderen Regionen beobachtet wurden.

Die Western-Blot-Ergebnisse haben gezeigt, dass die Mutation im Epitop des Antikörpers 2F5 die Bindung des Antikörpers 2F5 an sein Epitop verhindert, während das Wildtyp-Virus gebunden wird (Abbildung 18).

Die mutierten 2F5-Epitope, ELDEWA bzw. ELNKWA, sind bereits bei natürlich vorkommenden HIV-Stämmen, die gegen den Antikörper 2F5 resistent waren, gefunden worden (Trkola et al., 1995; Purtscher et al., 1996). Die Selektion dieser Fluchtmutationen durch die Behandlung mit dem Antikörper 2F5 wurde hier zum ersten Mal gezeigt.

5.5 Könnte das Peptid Dp178 in Kombination mit dem Antikörper 2F5 synergistische oder additive Wirkungen auf die HIV-Replikation haben?

Wenn HIV trotz einer antiretroviralen Therapie mit Anti-HIV-Substanzen wie der Reverse Transkriptase Hemmer oder die Protease Hemmer repliziert, hat die Viruspopulation Resistenzen gegenüber einem oder mehreren der verabreichten Therapeutika entwickelt. Die Resistenz gegenüber einem HIV-Therapeutikum hat zur Folge, dass die Viruslast eines Patienten ansteigt. Eine Kombinationstherapie kann die Entwicklung resistenter HIV-Stämme gegen einzelne Anti-HIV-Substanzen minimieren. Daher werden die antiretroviralen Substanzen meist in Kombination verabreicht. Es ist bekannt, dass die antiretroviralen Substanzen dosisabhängig starke Nebenwirkungen mit sich bringen. Durch eine Kombinationstherapie können die einzelnen Komponenten in kleineren Mengen verabreicht, und dadurch können die Nebenwirkungen reduziert werden.

T20 (Dp178) kommt als erster Fusionshemmer höchstwahrscheinlich anfangs 2003 auf den Markt (www.Roche.com). Da die Entwicklung von Resistenzen bereits gezeigt wurde (Wild et

al., 1994; Rimsky et al., 1998), ist der Einsatz von T20 nur in Kombinationstherapien vorstellbar. So stellt sich die Frage, ob das Peptid Dp178 (T20) als Fusionshemmer gemeinsam mit dem Antikörper 2F5 eine bessere Hemmung auf die HIV-Replikation haben könnte. Sie greifen beide in der Phase vor dem Eintritt des Virus in die Zielzelle ein.

Das Peptid Dp178 und der Antikörper 2F5 zeigten keine additive oder synergistische Wirkung bei der Replikation von HIV-1/IIIB in C8166-Zellen. Das Peptid Dp178 einzeln konnte bei 3,12µg/ml und der Antikörper 2F5 bei 4µg/ml die Infektion hemmen. In der Kombination waren 1,56µg/ml des Peptids Dp178 und 8µg/ml des Antikörpers notwendig, um eine Hemmung zu erzielen. Das zeigte, dass um die Hälfte des Peptids Dp178 einsetzen zu können, mussten zwei fache Menge von dem Antikörper eingesetzt werden, was nicht auf eine additive oder synergistische Aktivität hindeutet.

Da der Antikörper 2F5 und das Peptid Dp178 an unterschiedlichen Stellen des gp41 binden, sollten sie sich theoretisch bei der Hemmung der Fusion nicht behindern. Das Peptid Dp178 bindet an die N-terminale Helix, während der Antikörper 2F5 an sein Epitop in der C-terminalen Helix bindet. Es ist aber gezeigt worden, dass ELDKWA nur einen Teil des 2F5-Epitops darstellt (Neurath et al., 1995). Wenn der Antikörper 2F5 eine Konformationsepitop besitzt und sich eventuell ein Teil davon auf der N-terminalen Helix befindet (wo das Peptid Dp178 bindet), könntedarauf hinweisen, dass das Peptid Dp178 und der Antikörper 2F5 sich gegenseitig bei der Hemmung der Fusion behindern. Der Antikörper 2F5 könnte auch an sein Epitop auf dem Peptid Dp178 binden und dadurch seine therapeutisch aktive Konzentration reduzieren.

Das Peptid Dp178 und der Antikörper 2F5 haben auch keine verstärkte Wirkung bei der Replikation des mutierten Virus gezeigt (Mutation im 2F5-Epitop). Der Antikörper 2F5 zeigte selbst bei 128µg/ml keine Hemmung des mutierten Virus. Das war allerdings zu erwarten, weil die Westernblot-Ergebnisse gezeigt haben, dass der Antikörper 2F5 an mutiertes Virus nicht binden konnte. Das Peptid Dp178 konnte das mutierte Virus bei 1,56µg/ml hemmen. Das zeigt wiederum, dass eine Mutation im 2F5-Epitop die Bindung des Peptids Dp178 an die N-terminale Helix nicht beeinflussen kann. Um zu verhindern, dass der Antikörper 2F5 an das Peptid Dp178 bindet, wurde eine verkürzte Form davon eingesetzt, bei der das 2F5-Epitop deletiert war (Dp178Δ) (Abbildung 25). Eine Kombination des monoklonalen Antikörpers 2F5 mit dem Peptid Dp178Δ wurde ebenso auf mutiertes bzw. Wildtyp-Virus getestet.

Das Peptid Dp178Δ konnte das Wildtyp-Virus selbst bei 800µg/ml nicht hemmen, während 1,56µg/ml von Dp178 die Infektion des Wildtyp-Virus hemmten. In der Kombination konnte das Peptid Dp178Δ bei 50µg/ml und der Antikörper 2F5 bei 2µg/ml die Infektion des Wildtyp-Virus verhindern. Hier ist erstmals zu sehen, dass das Peptid Dp178Δ und der Antikörper 2F5 in Kom-

bination eine stärkere Hemmaktivität auf die Replikation des Wildtyp-Virus zeigten. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der Antikörper an sein Epitop bindet und die verkürzte Form des Peptids Dp178 an die N-terminale Helix bindet und da das Peptid Dp178 Δ kein 2F5-Epitop beinhaltet, findet keine Neutralisierung dieses Peptids statt, wie es bei dem Peptid Dp 178 möglich ist (Tabelle 5).

Aufgrund der geringen Zahl der Versuche kann jedoch keine endgültige Aussage getroffen werden, ob das Peptid Dp178 Δ in Kombination mit dem Antikörper 2F5 einen additiven Effekt zeigt.

Die Kombination des Peptids Dp178 Δ mit dem Antikörper 2F5 führte zu keinem additiven oder synergistischen Effekt auf die Hemmung des mutierten HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen. Die beiden Komponenten konnten weder einzeln noch in Kombination die Replikation des mutierten Virus hemmen.

Die Tatsache, dass das Peptid Dp178 Δ selbst bei 800 μ g/ml keine Wirkung sowohl auf die Replikation des Wildtyp-Virus als auch mutierten Virus zeigte, könnte damit zusammenhängen, dass das Peptid Dp178 Δ kleiner ist als das Peptid Dp178 und dementsprechend weniger Bindungsfläche bietet. Es wurde gezeigt, dass die von der C-terminalen Helix abgeleiteten Peptide eine Mindestlänge brauchen, um eine Hemmung zu bewirken (Jiang et al., 1995). Kleinere Peptide bieten weniger Fläche zur Wechselwirkung, und deren Bindung kann daraufhin nicht ganz stabil sein. Die schwache Bindung des Peptids Dp178 Δ an das Wildtypvirus könnte mit der Bindung des Antikörpers 2F5 an sein Epitop eventuell kompensiert werden. Bei dem mutierten Virus allerdings kann der Antikörper 2F5 nicht mehr an sein Epitop binden, und daher konnte keine verstärkte Wirkung des Peptids Dp178 Δ und des Antikörpers 2F5 auf die Replikation des mutierten Virus festgestellt werden.

5.6 Können Antikörper gegen die ISU-Domäne des gp41 die Replikation von HIV hemmen?

Ein weiterer monoklonaler Antikörper gegen gp41 ist der Antikörper B3, der durch Immunisierung der Mäuse mit dem ISU-Peptid gekoppelt an ein Trägermolekül gewonnen wurde. Der monoklonale Antikörper B3 erkennt die Sequenz ILAVERYLKD im gp41. Er hatte allerdings in der ersten Untersuchung keine neutralisierende Wirkung gezeigt (Denner et al., unveröffentlicht).

Clerici et al. (2002) haben unlängst gezeigt, dass Menschen, die nicht mit HIV infiziert sind, aber mit HIV-Infizierten sexuellen Kontakt haben, HIV-spezifische IgAs im Serum, im Urin und in

der vaginalen Schleimhaut besitzen. Das isolierte IgA, das an ein Epitop im gp41 (QARILAV) bindet, konnte eine Reihe von HIV-Stämmen neutralisieren.

Aufgrund der neutralisierenden Wirkung der isolierten IgA und der Überlappung der Epitope (QARILAV, ILAVERYLKD), wurde die neutralisierende Wirkung des monoklonalen Antikörpers B3 nochmals untersucht.

Der Antikörper B3 konnte selbst bei der höchst eingesetzten Konzentration (100µg/ml) keine Hemmung der HIV-1/IIIB-Replikation in den C8166-Zellen bewirken. Dieses Ergebnis bestätigte die früheren Befunde, die zeigten, dass der Antikörper B3 keine neutralisierende Aktivität hat (Denner et al., unveröffentlicht). Der Neutralisationstest sollte aber mit höheren Konzentrationen des Antikörpers wiederholt werden, um eine Aussage treffen zu können, ob der Antikörper B3 keine neutralisierende Wirkung auf die HIV-Replikation hat.

5.7 Ein gentherapeutischer Ansatz als HIV-Therapie

Die Nachteile der antiretroviralen Chemotherapie, wie die Selektion resistenter HIV-Stämme oder die dosisabhängigen Nebenwirkungen, machen einen gentherapeutischen Ansatz zu einer interessanten Alternative in der HIV-Therapie.

Deshalb wurden die CD4-positiven HeLa-Zellen mit entsprechenden DNA-Konstrukten so transfiziert, dass sie auf ihrer Oberfläche rekombinante Proteine, die den Peptiden Dp107 bzw. Dp178 entsprechen exprimierten. Die Expression der Proteine wurde durch FACS und Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

Die FACS- und Immunfluoreszenzerggebnisse zeigten eine deutliche Expression des Peptids Dp178 auf der Oberfläche der HeLa-Zellen (Abbildungen 30B und 32B), jedoch eine schwache Expression des Peptids Dp107 (Abbildungen 31B und 33B). Diese schwache Expression könnte das Ergebnis einer schwachen Detektion durch den Antikörper B3 sein. Es könnte sein, dass der Antikörper B3 nicht geeignet ist, um die Expression des Peptids Dp107 auf der Oberfläche der HeLa-Zellen nachweisen zu können, da er nicht alle Konformationen der ISU-Domäne erkennt.

Theoretisch könnten diese Zellen auch permanent antivirale Peptide produzieren und insofern einer Chemotherapie mit den synthetischen Peptiden gleichkommen.

Durch einen *Ex-vivo*-Ansatz könnten teilungsfähige patienteneigene Körperzellen *in vitro* genetisch verändert und anschliessend wieder dem Patienten zurückgegeben werden. Ein *Ex-vivo*-Ansatz hat allerdings einige Nachteile: seine Anwendbarkeit ist auf jene Zellen beschränkt, die relativ leicht aus dem Körper isoliert und in genügenden Mengen gezüchtet werden können. Zu-

dem gelingt die Reimplantation der *in vitro* transfizierten Zellen in den Körper oft nur unvollständig oder die Expression des Transgens geht *in vivo* relativ rasch wieder verloren.

Diese Strategie ist eine somatische Gentherapie, d.h. die genetischen Veränderungen, die an einem HIV-Infizierten vorgenommen werden, werden nicht auf die nächste Generation übertragen. Das Problem bei der Anwendung von Vektoren auf der Basis von Gamma-Retroviren ist, dass nur sich teilende Zellen, wie aktivierte T-Zellen oder *Ex-vivo* stimulierte CD34⁺-Zellen, transfiziert werden können. Dabei bleiben die Makrophagen und nichtteilenden T-Zellen, die ein Reservoir für HIV darstellen, unbehandelt. Mit lentiviralen Vektoren könnten allerdings sowohl teilende als auch nichtteilende Zellen wie dendritische Zellen, CD34⁺-hematopoietische Zellen, T-Zellen und Makrophagen transfiziert werden.

Die gentherapeutischen Ansätze bei der HIV-Therapie sind zwar vielversprechende Möglichkeiten, um die Ausbreitung des Virus im Körper zu blockieren, aber sie sind bei weitem noch nicht ausgereift und die eventuellen Gefahren sind noch nicht alle erforscht. Die Frage, ob durch die Anwendung von retroviralen Vektoren eventuell krebsähnliche Krankheiten entstehen könnten, ist mittlerweile durch zwei Leukämiefälle in Frankreich, im Dezember 2002 bei Patienten, die mit retroviralen Vektoren behandelt wurden, beantwortet. Bei den beiden Fällen handelte es sich um eine Insertionsmutation, die zur Leukämie geführt hat. Wegen dieser Fälle sind die meisten gentherapeutischen Studien mit retroviralen Vektoren in Deutschland vorerst gestoppt (Bericht des Paul-Ehrlich Instituts, Januar 2003).

Dass dieser gentherapeutische Ansatz funktionieren kann, zeigen die ersten Untersuchungen von Hildinger et al. (2001), die zeigten, dass die HIV-Infektion in den Zellen, die T20 auf ihrer Oberfläche exprimierten, viel besser gehemmt wird als in den Zellen ohne T20. Hierbei wurde eine T-Helfer-Zelllinie (PM-1) mit einem retroviralen Vektor transfiziert, der eine Sequenz enthielt, die die Sequenz von Dp178 kodierte. Diese Zellen wurden mit HIV-1 infiziert und nach sechs Tagen zeigten sie weniger als 1% Infektion, während die PM-1-Zellen, die das Peptid nicht auf ihrer Oberfläche hatten (Negativkontrolle), 100%ige Infektion zeigten.

5.6 Ausblick

Mit den transfizierten CD4-positiven HeLa-Zellen, die rekombinante Proteine, die den Peptiden Dp107 bzw. Dp178 entsprechen, auf der Oberfläche exprimieren, sollen Infektionsversuche mit

HIV durchgeführt werden, um die Wirkung dieser Proteine auf die HIV-Replikation zu untersuchen.

Ebenso sollen weitere Untersuchungen zur Kooperation der fusionshemmenden Peptiden mit den neutralisierenden Antikörpern mit sensitiveren Methoden, wie die Real Time PCR, durchgeführt werden, um endgültige Aussagen treffen zu können.

6 Zusammenfassung

Derzeit klinisch angewandte HIV-Therapien konzentrieren sich auf die Hemmung viraler Enzyme, die für die Bildung infektiöser Partikel notwendig sind. Weil HIV als Provirus im Genom der Zielzelle integriert wird, ist eine vollständige Eliminierung des Virus durch diese Medikamente nicht möglich. Fusionshemmer, d.h. synthetische Peptide, die von der N- und C-terminalen Helix im transmembranen Hüllprotein gp41 abgeleitet wurden, wie die Peptide Dp107 und Dp178, sind eine neue Klasse von Anti-HIV-Präparaten, die das Virus daran hindern, in die Wirtszelle einzudringen.

Auf der Basis von HIV-1/IIIB und den C8166-Zellen wurde ein System aufgebaut, in dem die Wirkung dieser Peptide untersucht wurde. In diesem System konnte die HIV-Replikation durch Dp178 bei 3µg/ml gehemmt werden. Im Gegensatz dazu konnte das Peptid Dp107 die Infektion selbst bei 50µg/ml nicht hemmen. Auch das von der immunsuppressiven Domäne abgeleitete ISU-Peptid konnte gekoppelt an inertes Dextran die Infektion bei 30µg/ml nicht hemmen. Der monoklonale Antikörper 2F5, dessen Epitop ELDKWA in der C-terminalen Helix von gp41 lokalisiert ist, konnte die Infektion durch HIV-1/IIIB in den C8166-Zellen bei 0,25µg/ml hemmen. Allerdings konnte der monoklonale Antikörper B3, der an das Epitop ILAVERYLKD in der N-terminalen Helix bindet, die Infektion in diesem Zellsystem selbst bei 100µg/ml nicht hemmen.

Bei der Untersuchung der Resistenzbildung nach der Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 konnte gezeigt werden, dass nach vier Wochen Mutationen im 2F5-Epitop auftreten (ELDKWA→ELDEWA bzw. ELNKWA), die dazu führen, dass der Antikörper diese Stämme nicht mehr neutralisiert und im Western Blot nicht mehr an das mutierte gp41 bindet. Diese Daten zeigen, dass der Antikörper 2F5 nur im Rahmen einer Kombinationstherapie verabreicht werden kann.

In ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Applikation von Dp178 und 2F5 den Effekt von 2F5 verringert. Bei der Verwendung eines kürzeren Peptids, bei dem das Epitop von 2F5 deletiert wurde (Dp178Δ), konnte ein additiver Effekt beobachtet werden.

Um ein gentherapeutisches Modell der HIV-Therapie zu entwickeln, wurden Sequenzen, die den Domänen Dp107 und Dp178 entsprechen, kloniert und in HeLa-Zellen exprimiert. Nachdem die Expression dieser rekombinanten Proteine durch FACS und Immunfluoreszenz-Analyse nachgewiesen wurde, können die Zellen in Infektionsversuchen getestet werden.

7 Literaturverzeichnis

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1995). In: *Molekularbiologie der Zelle*. 3.Auflage. VCH. pp: 1509-1520.
- Allan JS, Strauss J, Buck DW. (1990). Enhancement of SIV infection with soluble receptor molecules. *Science*; 247(4946):1084-8.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*; 72: 248
- Broder CC, Dimitrov DS, Blumenthal R, Berger EA. (1993). The block to HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion in animal cells expressing human CD4 can be overcome by a human cell component(s). *Virology*; 193(1):483-91.
- Broliden PA, Von Gergerfett A, Clapham P, Rosen J, Fenyö EM, Wahren B, and Broliden K. (1992). Identification of human neutralizationinducing regions of the human immunodeficiency virus typ 1 envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 461-465
- Buchacher A, Predl R, Strutzenberger K, Steinfellner W, Trkola A, Purtscher M, Gruber G, Tauer C, Steindl F, Jungbauer A, and Katinger H. (1994). Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 10: 359-369.
- Burnette WN. (1981). Western Blotting. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfat-polyacrylamid gels to modified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem*; 112: 195
- Caffrey M, Kaufman CJ, Stahl SJ, Wingfield PT, Gronenborn AM, Clore GM. (1998). Solution structure of the 44kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO J.*; 17: 4572-4584
- Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA. (1999). Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus. *Lancet.*; 353(9170):2093-9.

-
- Carr CM, Chaudhry C, Kim PS. (1997). Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a meta-stable native conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94(26):14306-13.
 - Chan DC and Kim PS. (1998). HIV entry and it's inhibition. *Cell*; 93: 681-684
 - Chan DC, Fass D, Berger JM, and Kim PS. (1997). Core Structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*; 89: 263-273
 - Chanh TC, Dreesman GR, Kanda P, Linette GP, Sparrow JT, Ho DD, and Kennedy RC. (1986) Induction of anti-HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides. *EMBO J.*; 5: 3065-3071
 - Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerad C, Soroski J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*; 85: 1135-1148
 - Clerici M, Barassi C, Devito C, Pastori C, Piconi S, Trabattoni D, Longhi R, Hinkula J, Broliden K and Lo palco L. (2002). Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the α -helix of gp41. *AIDS*; 16: 1731-1741.
 - Coffin JM. (1992). Structure and classification of retroviruses. In *The Retroviridae*, J.A. levy, ed. (New York: Plenum Press), pp: 19-49
 - Coffin JM, Hughes SH and Varmus H.(1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - Conley AJ, Kessler JAII, Boots LJ, and Tung JS. (1994). Neutralization of divergent human immunodeficiency virus typ 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 3348-3352
 - Denner J, Norley S, Kurth R. (1994). The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS*; 8(8):1063-72.
 - Denner J, Kurth R. (2001). Infektionen bei Immunschwächen. In: *Medizinische Mikrobiologie*. Hrsg: Köhler W, Eggers H.J., Fleischer B., Marre R., Pfister H., Pulverer G., URBAN & FISCHER Verlag, 8.Auflage, pp: 793-811

-
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*; 85(7):1149-58
 - Doranz BJ, Berson JF, Rucker J, Doms RW. (1997). Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Immunol Res*; 16(1):15-28
 - Eckert DM, Malashkervich VN, Hong LH, Carr PA, and Kim PS. (1999). Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-Peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell*; 99: 103-115
 - Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 84(21):7413-7.
 - Freed EO, Martin MA. (1995). The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem*; 270(41): 23883-6.
 - Gallaher WR. (1987). Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell*; 50(3):327-8
 - Gao X and Huang L. (1995). Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther*; 2:710
 - Gao F, Yue L, Robertson DL, Hill SC, Hui H, Bigga RJ, Neequaye AE, Whelan TM, Ho DD, Shaw GM, Hahn BH. (1994). Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol.*; 68: 7433-7447
 - Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Hahn BH (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee pantroglo-Dytes. *Nature*; 397: 436-441
 - Gnann JW Jr, Nelson JA, Oldstone MB. (1987). Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol.*; 61(8): 2639-41
 - Golding H, Zaitseva M, de Rosny E, King LR, Manischewitz J, Sidorov I, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Dimitrov DS, Weiss CD. (2002). Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates. *J Virol*; 76(13):6780-90.

-
- Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Guatelli JC, Riggs NL, Havlir DV, Richman DD. (1998). Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. *J Virol.*; 72(3):2422-8.

 - Hildinger M, Dittmar MT, Schult-Dietrich P, Fehse B, Schnierle BS, Thaler S, Stiegler G, Welker R, and Laer D. (2001). Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J. Virol.*; 75: 3038-3042

 - Horal P, Svennerholm B, Jeansson S, Rymo L, Hall WW, Vahlne A. (1991). Continuous epitopes of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. *J Virol.*; 65(5):2718-23.

 - Jiang S, Lin K, Strick N, Neurath AR.(1993). Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein GP41. *Biochem Biophys Res Commun.*; 195(2):533-8.

 - Jiang S, Lin K. (1995). Effect of amino acid replacements, additions and deletions on the anti viral activity of a peptide derived from the HIV-1 GP41 sequence. *Pept Res.*; 8(6):345-8.

 - Kabanov AV and Kabanov VA. (1995). DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconj Chem.*; 6: 7

 - Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Clond GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson MR, Nowak MA, Shaw GM and Saag MS. (1998). Potent Suppression of HIV-1 replication in humans by T20, a potent inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med*; 4: 1302-1307

 - Kowalski M, Bergeron L, Dorfman T, Haseltine W, Sodroski J. (1991). Attenuation of human immunodeficiency virus type 1 cytopathic effect by a mutation affecting the transmembrane envelope glycoprotein. *J Virol*; 65(1):281-91.

 - Labat-Moleur F, Steffan AM, Brisson C, Perron H, Feugeas O, Furstenberger P, Oberling F, Brambilla E, Behr JP. (1996). An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.*; 3(11):1010-7.

- Lu M, Blacklow SC, and Kim PS. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembran glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.*; 2: 1075-1082

- Luciw PA. (1996). Human immunodeficiency viruses and their replication. In: Fields Virology. Edited by Knipe DM, Howley PM et al. Lippincott-Raven, 1891-1952

- Miller MA, Mietzner TA, Cloyd MW, Robey WG and Montelaro RC. (1993). Identification of a calmodulin-binding and inhibitory peptide domain in the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviral*; 9: 1057-1066

- Moore JP, McKeating JA, Weiss RA and Sattentau QJ (1990). Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science*; 250: 1139-1142

- Mülhardt C. (2000). Der Experimentator: Molekularbiologie. Hrsg.: Gustav Fischer Verlag. 2.Auflage

- Mullis KB and Faloona FA. (1987). Specific systems of DNA *in vitro* polymerase-catalyzed chain-reaction. *Methods Enzymol*; 155:335

- Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Rucker F, and Katinger H. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus typ 1 *J. Virol.*; 67(11): 6642-6647.

- Neurath AR, Strick N, Lin K, and Jiang S. (1995). Multifaceted consequences of anti-gp41 monoclonal antibody 2F5 binding to HIV Typ 1 virions. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*; 11: 687-696

- Ongradi J, Laird HM, Szilagyi JF, Horvath A, Bendinelli M. (2000). Unique morphological alterations of the HTLV-1 transformed C8166 cells by infection with HIV-1. *Path Onc Res.*; 6: 27-37

- Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Meyer B, Muller H, Krausslich HG, Schreiber M. (2001). Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology*; 11(1):11-19.

- Purtscher M, Trkola A, Gruber G, Buchacher A, Predl R, Steindl F, Tauer C, Berger R, Barrett N, Jungbauer A and Katinger H. (1994). A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus Typ 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 10: 1651-1658.

- Purtscher M, Trkola A, Grassauer A. (1996). Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS*; 10: 587-93

- Qureshi NM, Coy DH, Garry RF, Henderson LA. (1990). Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *AIDS*; 4(6):553-8.

- Richman DD. (1993). Resistance of clinical isolates of HIV to anti-retroviral agents. *Antimicro Agents Chemother.*; 37: 1207-1213

- Rimsky LT, Shugars DC, Matthews TJ. (1998). Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J. Virol.*; 72: 986-993

- Rose JK, Buonocore L, Whitt M. (1991). A new cationic liposome reagent mediate nearly quantitative transfection of animal cells. *Biothechniques*; 10: 520-525

- Rucker J, Samson M, Doranz BJ, Libert F, Berson JF, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Broder CC, Vassart G, Doms RW, Parmentier M.(1996). Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell.*; 87(3):437-46.

- Schagger H, v. Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*; 166:368-379

- Shu W, Liu J, Ji H, Radigen L, Jiang S, Lu M. (2000). Helical interactions in the HIV-1 gp41 core reveal structural basis for the inhibitory activity of gp41 peptides. *Biochemistry.*; 39(7): 1634-42.

- Speck RF, Wehrly K, Platt EJ, Atchison RE, Charo IF, Kabat D, Chesebro B, Goldsmith MA. (1997). Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus typ 1 coreceptorsdetermined by individual amino acids in the envelope V3 loop. *J. Virol.*; 71: 7136-7139.

-
- Spector T. (1978). Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0,5 to 50 microgram of protein. *Anal Biochem*; 86 : 142

 - Stegmann T, Delfino JM, Richards FM, Helenius A. (1991). The HA2 subunit of influenza hemagglutinin inserts into the target membrane prior to fusion. *J Biol Chem.*; 266(27):18404-10.

 - Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, Wolbank S, Volglauer R, Steindl F and Katinger H. (2001). A Potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus Typ 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 17: 1757-1765

 - Stiegler G, Armbruster C, Vcelar B, Stoiber H, Kunert R, Michael NL, Jagodzinski LL, Ammann C, Jäger W, Jacobson J, Vetter N and Katinger H. (2002). Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation. *AIDS*; 16: 2019-2025.

 - Trkola A, Pomales AB, Ynan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, Katinger H, Barbas III CF, Burton DR, Ho DD, Moore JP. (1995). Cross-clade Neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus Typ 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J. Virol.*; 69: 6609-6617.

 - Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ and Moore JP. (1996). CD4-dependent, antibody sensitive interaction between HIV-1 and its co-receptor CCR5. *Nature*; 384, 184-187

 - Tsurudome M, Gluck R, Graf R, Falchetto R, Schaller U, Brunner J. (1992). Lipid interactions of the hemagglutinin HA2 NH2-terminal segment during influenza virus-induced membrane fusion. *J Biol Chem.*; 267(28):20225-32.

 - Vogt PK. (1997). Historical Introduction to the General Properties of retroviruses. In *Retroviruses*, Coffin JM, Hughes HS and Varmus HE. eds. (Plainview, NY 11803: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp: 1-26

 - Wild C, Oas T, McDanal C, Bolognesi D, Matthews T. (1992). A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 89(21):10537-41

-
- Wild C, Greenwell T, and Matthews T. (1993). A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*; 9: 1051-1053

 - Wild C, Dubay JW, Greenwell T, Baird T Jr, Oas TG, McDanal C, Hunter E, Matthews T. (1994). Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **91**(26):12676-80.

 - Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, McDanal CB, Matthews TJ. (1994b). Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 91(21):9770-4.

 - Williamson K, Reboli AC, Manders SM. (1999). Protease inhibitor-induced lipodystrophy. *J Am Acad Dermatol.*; 40(4):635-6

 - Wong JK, Gunthard HF, Havlir DV, Zhang ZQ, Haase AT, Ignacio CC, Kwok S, Emini E, Richman DD. (1997). Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 94(23):12574-9.

 - Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR5. *Nature*; 384: 179-183

 - Wyatt R, Kwong P, Desjardins E, Sweet R, Robinson J, Hendrickson W and Sodroski J. (1998). The antigenic structure of the human immunodeficiency virus gp120 envelope glycoprotein. *Nature*; 393: 705-711