

**Untersuchungen zur Rolle von Dynamin
beim Eintritt von HIV-1 in humane Zellen**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jessica Daecke

aus Hamburg

- Hamburg 2002 -

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H.-G. KRÄUSSLICH

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H.-P. Mühlbach

Tag der Disputation: 12. Juli 2002

Hamburg, den 21. Juni 2002



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Meiner Familie

1 Einleitung	1
1.1 Das humane Immundefizienzvirus	2
1.2 Der HIV-Replikationszyklus	3
1.3 Virale Strategien zum Eindringen in die Zielzelle	4
1.4 Funktionen der zellulären GTPase Dynamin	6
1.5 Charakteristiken des Zelleintritts von HIV-1	9
1.6 Fragestellung	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Puffer und Lösungen	13
2.1.3 Kits	14
2.1.4 Enzyme	14
2.1.5 Medien und Reagenzien für die Arbeit mit Bakterien	14
2.1.6 Materialien für die Zellkultur	15
2.1.6.1 Zelllinien	16
2.1.6.2 Antikörper	17
2.1.6.3 Viren	17
2.1.7 Reagenzien für biochemische Methoden	17
2.1.7.1 Für die Gelelektrophorese	17
2.1.7.2 Für Immunblotanalysen	18
2.2 Methoden	18
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1.1 Gentechnische Arbeiten	18
2.2.1.2 Kultivierung und Konservierung von E. coli Stämmen	18
2.2.1.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	19
2.2.1.4 Transformation von Bakterien	19
2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	19
2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA	20
2.2.1.7 Alkoholpräzipitation von DNA	20
2.2.1.8 Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen	21

2.2.1.9 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	21
2.2.1.10 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	21
2.2.1.11 Quantitative Amplifikation viraler DNA im Light Cycler	22
2.2.2 Zellbiologische und virologische Methoden	24
2.2.2.1 Zellkultur	24
2.2.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen	24
2.2.2.3 Transfektion von Zellen zur Herstellung von Virusüberständen	25
2.2.2.4 Herstellung von hochtitrigem Virus	25
2.2.2.5 Virustitration	26
2.2.2.5.1 Auf adherenten Zellen	26
2.2.2.5.2 Auf Suspensions-Zellen	27
2.2.2.6 Detektion infizierter Zellen durch Immunfärbung	27
2.2.2.7 ELISA zum Nachweis von Virus im Kulturüberstand	27
2.2.2.8 Transduktion und Infektion von Zellen	28
2.2.2.9 MACS-Separation von CD4-positiven Zellen	28
2.2.2.10 Markierung von Zellen mit Antikörpern für die FACS-Analyse	29
2.2.2.11 Sortierung CD4-positiver Einzelzellen und Expansion klonaler Zelllinien	30
2.2.2.12 Indirekte Immunfluoreszenz	30
2.2.2.13 Single round entry assay (sre-Assay)	31
2.2.2.13.1 Quantifizierung durch Detektion der viralen Proteinexpression	31
2.2.2.13.2 Detektion durch quantitative Präparation von RT-Produkten und genomischer DNA	32
2.2.2.14 Methoden zur quantitativen Isolierung von genomischer und episomaler DNA	33
2.2.2.15 Transferrin-Aufnahme Assay	34
2.3 Biochemische Analysen	34
2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.3.2 Immuno Blot / Western Blot (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979)	34
3 Ergebnisse	36
3.1 Bedingungen zur Analyse des Einflusses von Dynamin auf das HIV-Entry mit CD4-exprimierenden, transdominant-negativen	

Dynamamin-Zellen	36
3.1.1 Etablierung einer stabil CD4-exprimierenden HeLa-Dynamamin-Zellkultur	36
3.1.1.1 Transduktion mit CD4 und MACS-Selektion	37
3.1.1.1.1 Dynamamin-Expression nach Transduktion	38
3.1.1.1.2 Kinetik der Dyn-ts-Translation und des –Abbaus	41
3.1.1.1.2.1 Immunoblotanalyse	41
3.1.1.1.2.2 Untersuchung der Endocytose-Hemmung durch fluoreszenzmikroskopische Analyse	42
3.1.1.1.3 Stabilität der CD4-Expression in CD4-positiven Dyn-ts-Zellen	45
3.1.1.2 Herstellung und Charakterisierung von klonalen CD4-positiven Zelllinien	46
3.1.1.2.1 CD4-Expression	47
3.1.1.2.2 Dyn-ts-Expression	48
3.1.1.2.3 Analyse der Dyn-ts-Translations- und Abbaukinetik in 4D9-Zellen	49
3.1.1.2.4 Expression von CD4 und CXCR4 auf 4D9-Zellen nach Dyn-ts-Induktion	52
3.1.2 Virusherstellung zur Infektion: HIV-1 _{NL4-3} , HIV-1 _{MVP8161} , HIV-1 _{SF2}	54
3.1.3 Einfluß von Tet auf die Infektiosität	55
3.2 Sre-Assay zur Bestimmung der Rolle von Dynamamin beim Eintritt von HIV-1 _{NL4-3}	56
3.2.1 Analyse von Virusprotein-exprimierenden Zellen	56
3.2.1.1 Versuchsaufbau des Sre-Assay	56
3.2.1.2 Einfluß von Dyn-ts auf die HIV-1 _{NL4-3} Infektion	58
3.2.1.3 Einfluß der Inhibition der Endosomenansäuerung auf die Infektion von HIV-1 _{NL4-3}	60
3.2.1.4 Einfluß von Dyn-ts auf Infektion durch HIV-1 _{SF2} und HIV-1 _{MVP8161}	61
3.2.1.5 Infektion von Dyn-ts-exprimierenden Zellen bei der permissiven Temperatur	63
3.2.2 Analyse von HIV-1 RT-Produkten	64
3.2.2.1 Etablierung der Quantifizierung von RT-Produkten in infizierten Zellen durch den LightCycler	64
3.2.2.2 Test von DNA-Isolierungsmethoden aus Säuger-Zellen	67

3.2.2.3 Nachweis von U3-Produkten in HeLa- und HeLaP4-Zellen	73
3.2.2.4 Quantifizierung intermediär und spät auftretender RT-Produkte beim sre-Assay	76
3.2.2.4.1 Versuchsaufbau	76
3.2.2.4.2 Auswertung von drei unabhängigen sre-Experimenten	76
4 Diskussion	80
4.1 Etablierung einer CD4- und transdominant-negatives Dynamin exprimierenden Zelllinie zur Analyse des Einflusses von Dynamin auf das HIV-1 Entry	80
4.1.1 Die CD4-Expression in der Massenkultur transduzierter Zellen ist nicht stabil	80
4.1.2 Expression von Dynamin-1-Varianten differiert in Dynamin-wt, -K44A und -ts Zellen nach CD4-Transduktion	81
4.1.3 Dyn-ts-Expression und Transferrin-Aufnahme in Dyn-ts/CD4 ⁺ Zellen	82
4.1.4 Klonale Dyn-ts-Zelllinien exprimieren stabil CD4 und hemmen effizient die Aufnahme von Transferrin	83
4.2 Optimierung der Bedingungen zur single-round-entry (sre-) Assay-Methodenetablierung	83
4.2.1 Inhibitor der Clathrin-abhängigen Endozytose hat keinen Einfluß auf die Dichte der HIV-1 Entry-Rezeptoren CD4 und CXCR4	84
4.2.2 Einfluß von Tet auf den viralen Titer	84
4.3 Aufbau des sre-Assays	85
4.4 Einfluß von Dyn-ts auf den Zelleintritt von HIV-1	86
4.4.1 Vergleich der Infektionseffizienz zwischen Dyn-ts-exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen durch Quantifizierung Virusprotein-exprimierender Zellen	86
4.4.1.1 Dyn-ts reduziert die HIV-1 _{NL4-3} Infektion	86
4.4.1.2 Inhibition der Endosomenazidifizierung erhöht die Infektiosität von HIV-1 _{NL4-3}	86
4.4.1.3 HIV-1 _{SF2} Infektion wird durch Dyn-ts reduziert und durch	

Ammoniumchlorid erhöht	87
4.4.1.4 Die Infektion des Virusisolats HIV-1 _{MVP8161} wird durch Dyn-ts stark reduziert	88
4.4.1.5 Reduktion der HIV-1 Infektion durch Dyn-ts ist bei der nicht-permissiven Temperatur stärker als bei der permissiven	88
4.4.1.6 Die Infektion VSV-G-pseudotypisierter HIV-1 Partikel wird nicht durch Dyn-ts inhibiert	89
4.4.2 Quantifizierung von HIV RT-Produkten mittels LightCycling	90
4.4.2.1 Optimierung der quantitativen LightCycler Amplifizierung	90
4.4.2.2 U3-Produkte der Plus-Strang DNA können zwei Stunden p.i. im Zytoplasma nachgewiesen werden	91
4.4.2.3 Vergleich der Infektionseffizienz zwischen Dyn-ts-exprimierenden und –nicht-exprimierenden Zellen durch Quantifizierung von RT-Produkten	91
4.5 Schlußfolgerungen und Möglichkeiten der Dyn-ts-induzierten HIV-1-Infektionsreduzierung	92
4.5.1 Fall 1: Die Menge an U3-RT-Produkten in Dyn-ts-exprimierenden Zellen ist signifikant niedriger als bei Kontrollzellen	93
4.5.1.1 Die HIV-1-Infektion wird dadurch reduziert, daß Partikel in Clathrin-umhüllten Vesikeln, die an der Plasmamembran verbleiben, nicht zur Infektion kommen	93
4.5.1.2 Eine durch Dynamamin-vermittelte Aktinfunktion bei der Endozytose reduziert die Infektion	96
4.5.1.3 Eine andere Dynamamin-vermittelte Funktion des Aktin Zytoskeletts reduziert die Infektion	97
4.5.1.4 Die gestörte Ablösung von Caveolae Vesikeln reduziert die Infektion	98
4.5.2 Fall 2: Die Menge an U3-RT-Produkten ist in infizierten Dyn-ts-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen gleich	99
4.5.2.1 Der Transport des RTCs bzw. des PICs zum Kern ist inhibiert	99
4.5.2.2 Für die Komplettierung der reversen Transkription ist eine Dynamamin-abhängige Funktion des Aktin Zytoskeletts nötig	100

4.5.2.3 Die Infektionsbedingungen unterscheiden sich technisch von den Experimenten, bei denen die Zahl infizierter Zellen detektiert wurde	101
4.6 Weiterführende Experimente	101
5 Zusammenfassung	102
6 Literaturverzeichnis	103
7 Anhang	116

1 Einleitung

1.1 Das humane Immundefizienzvirus

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) ist der Erreger des erworbenen Immundefizienz Syndroms AIDS („acquired immune deficiency syndrome“) und seit seiner Entdeckung vor 19 Jahren (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984) intensiv erforscht worden. Obwohl seitdem die Aufklärung des Infektionswegs und der viralen Replikation mit großer Geschwindigkeit vorangeschritten ist, starben weltweit im Jahr 2000 über 3 Millionen Menschen an AIDS und es kam zu fünf Millionen Neuinfektionen. Dadurch wird deutlich, daß es zur Entwicklung antiviraler und Präventivtherapien nötig ist, unser Wissen über HIV grundlegend zu erweitern.

HIV gehört zur Familie der Retroviren. Dies sind membranumhüllte Viren, deren Genom aus zwei Kopien einer einzelsträngigen Plus-Strang RNA besteht. Ein viruskodiertes Enzym, die Reverse Transkriptase (RT) macht es möglich, diese RNA als Matrize zur Generierung einer doppelsträngigen proviralen DNA zu benutzen, die schließlich in das Wirtsgenom integriert wird und die Basis für die virale Genexpression darstellt. Der Fluß der genetischen Information von RNA zu DNA stellt eine Umkehr des zentralen Dogmas der Biologie dar und verlieh der Virusfamilie ihren Namen („Retro“).

Generell können Retroviren, basierend auf ihrer Genomorganisation, in zwei Gruppen eingeteilt werden: die einfachen und die komplexen Retroviren. So enthalten alle Retroviren mindestens drei offene Leserahmen, *gag*, *pol* und *env*, die für die inneren Strukturproteine (Gag), die viralen Enzyme (Pol) und die Glykoproteine (Env) kodieren. Die Glykoproteine sind in die äußere Lipidhülle inseriert und das Genom ist noch einmal von einer inneren Proteinhülle, dem Kapsid umgeben (Coffin *et al.*, 1997).

Komplexe Retroviren, wie HIV, exprimieren zusätzlich regulatorische, akzessorische Proteine, die z.B. die Infektionseffizienz und die Pathogenität steigern können oder das Virus befähigen, durch aktiven Kerntransport in Zellen zu replizieren, die keine Mitose vollziehen (Frankel & Young, 1998).

1.2 Der HIV-Replikationszyklus

(Coffin *et al.*, 1997; Frankel & Young, 1998; Kräusslich & Welker, 1996)

Die Infektion einer Zelle mit HIV beginnt mit der Bindung des viralen Glykoproteins gp120 an den CD4-Rezeptor der Zielzelle (Klatzmann *et al.*, 1984). Durch diese Interaktion wird die Bindungsstelle für einen Korezeptor frei, der zur Familie der Chemokinrezeptoren gehört (Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996). Dieses zweite Bindungsereignis induziert konformelle Veränderungen im viralen Transmembranprotein gp41, die zur Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran der Zielzelle und zur Freisetzung des Viruskapsids in das Zytoplasma führen (Perez *et al.*, 1992; Gabuzda *et al.*, 1992). Dieser Abschnitt der viralen Replikation sollte in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

Hat der Kapsidkern das Zytoplasma erreicht, so dissoziiert er sehr schnell und entläßt einen Nukleo-Protein-Komplex aus dem Inneren ins Zytoplasma, der nun vermutlich seine volle Kompetenz zur Komplettierung der reversen Transkription erhält (Luciw *et al.*, 1996; Coffin *et al.*, 1997). Die Zusammensetzung dieses reversen Transkriptionskomplexes (RTC) und des daraus hervorgehenden Präintegrationskomplexes (PIC) ist noch nicht ganz aufgeklärt. Er enthält außer der Nukleinsäure die Proteine RT, Integrase und Vpr und zudem vermutlich einige Moleküle an phosphoryliertem Matrix. Die reverse Transkription erfolgt im Zytoplasma vermutlich während des Transports des RTCs zum Kern. Ein tRNA^{Lys}-Molekül dient als erster Primer und es entsteht zunächst das 3'-Ende der Minus-Strang DNA („Minus-Strang-Stop DNA“). Nach einem Templatewechsel und kontrollierter, sequentieller Degradation der RNA-Matrize entstehen zeitlich intermediär auftretende Produkte und nach einem zweiten Wechsel wird die gesamte doppelsträngige, provirale DNA gebildet (Goff *et al.*, 1992; Coffin *et al.*, 1997). Statt ins Chromosom integriert zu werden bilden manche Vollängen-Produkte ringförmige Strukturen („1- und 2-LTR-Zirkel“), die durch Autointegration entstehen und eine Sackgasse in der Replikation darstellen (Abb. 3.25). Die verschiedenen RT-Schritte lassen sich zum Teil verschiedenen Kompartimenten in der Zelle zuordnen; so entstehen im Virion keine RT-Produkte, die über die Minus-Strang Stop DNA hinausgehen und die Generierung von 2-LTR-Zirkel erfolgt ausschließlich im Kern (Stevenson &

Haggerty, 1990). Dies kann für die Analyse der Bedingungen des Viruseintritts ins Cytoplasma und des Transports zum Kern genutzt werden. Die Zwischenstufen kann man jedoch nicht distinkten Kompartimenten zuordnen (Sharkey *et al.*, 2000) (Abb. 3.25).

Durch Interaktion mit Faktoren der Kernimportmaschinerie wird der PIC aktiv durch die intakte Kernhülle in den Zellkern transportiert. Dort vermittelt die Integrase den Einbau des doppelsträngigen, viralen DNA-Genoms in die Wirts-DNA (Brown *et al.*, 1987; Bushman *et al.*, 1990).

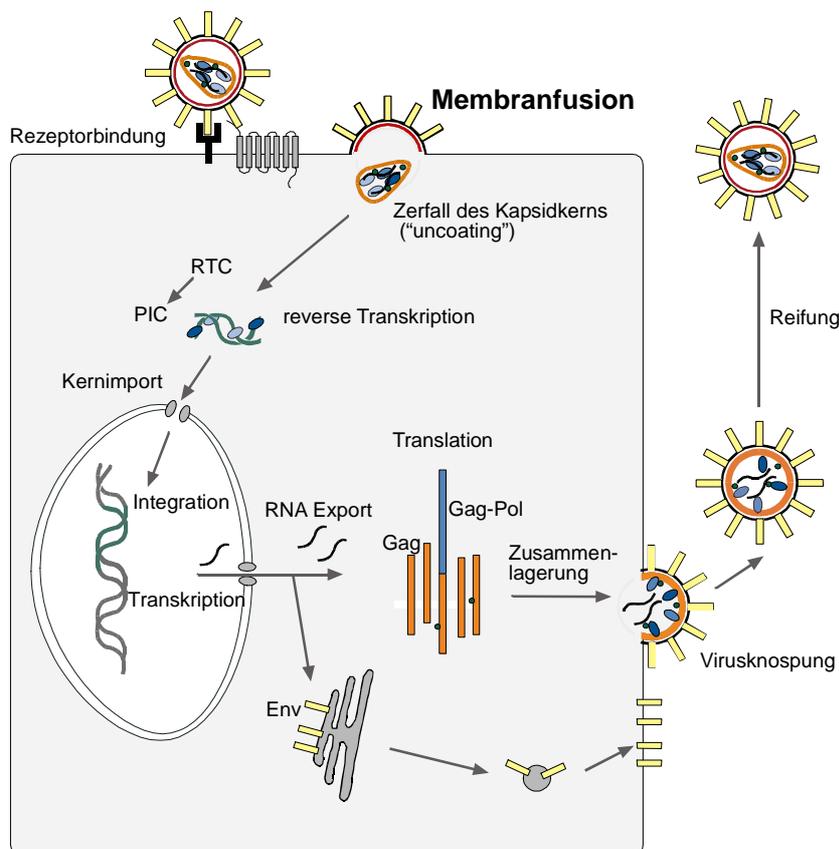


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV-1. Erläuterungen siehe Text.

Die DNA dieses Provirus' wird nun unter Ausnutzung der zellulären Maschinerie transkribiert und das Primärtranskript zunächst vollständig gespleißt, wobei die mRNAs für Tat, Rev und Nef entstehen (Muesing *et al.*, 1985). Tat erhöht nach Bindung des cis-regulatorischen RNA-Elements TAR die Transkriptionsrate (Kao *et al.*, 1987; Muesing *et al.*, 1987) während Rev ungespleißte und unvollständig gespleißte mRNAs in das Zytoplasma

transportiert, wodurch die Translation der späten Produkte Gag, Pol und Env ermöglicht wird (Rosen *et al.*, 1985; Malim *et al.*, 1989). Env wird an Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und nach der Glykosylierung über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert. (McCune *et al.*, 1988). Im Gegensatz dazu erfolgt die Translation der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine an zytosolischen Ribosomen. Die unprozessierten Polyproteine werden an die Plasmamembran transportiert und dort zusammengelagert. Zusammen mit zwei Kopien ungespleißter genomischer viraler RNA bilden Gag und Gag-Pol unreife Viruspartikel, die bei der Knospung von der Wirtsmembran und darin eingelagerten Env-Proteinen umhüllt werden. Die Reifung des Virions vollzieht sich außerhalb der Wirtszelle, indem Gag- und Gag-Pol-Polyproteine mit Hilfe der viralen Protease in ihre Bestandteile (Matrix, Kapsid, Nucleokapsid, p6, Protease, RT und Integrase) gespalten werden. Hierdurch entstehen die reifen, infektiösen Viruspartikel, die in eine neue Zielzelle eindringen können (Coffin *et al.*, 1997; Frankel und Young, 1998).

1.3 Virale Strategien zum Eindringen in die Zielzelle

Das Eindringen des Virus ins Zytoplasma der Zielzelle stellt einen für die weitere Replikationsfähigkeit wichtigen Schritt dar und kann durch ganz unterschiedliche Mechanismen geschehen. Manche Virusarten nutzen dabei endozytotische Prozesse der Wirtszelle, während andere davon unabhängig sind. Dabei kann man Viren in zwei Gruppen einteilen: die pH-unabhängigen und die pH-abhängigen Viren. Zu der ersten Gruppe gehören Paramyxoviren, die unabhängig von den pH-Bedingungen durch direkte Fusion mit der Plasmamembran in die Zelle eindringen. Die Viren der zweiten Gruppe benötigen zur Aktivierung ihrer Fusionsproteine eine saure Umgebung. Diese ist in den vesikulären Endosomen der Zelle zu finden und wird über die Internalisierung durch Clathrin-vermittelte Endozytose erreicht. Dieser zelluläre Prozess zur Aufnahme von Stoffen aus der Umgebung beginnt mit der Rekrutierung Triskeleton-förmiger Clathrin-Moleküle durch Adaptormoleküle zur Plasmamembran, wo sie mit anderen Proteinen eine sich einstülpende Schicht unter der Plasmamembran – das „coated pit“ - bilden. Membranständige Rezeptormoleküle interagieren durch den cytosolischen Teil mit der

Clathrinschicht und werden dadurch am coated pit immobilisiert. Das Vesikel rundet sich weiter ab und unter GTP-Hydrolyse setzt die am Vesikelhals lokalisierte GTPase Dynamin homogene, etwa 150nm große Vesikel ins Zytoplasma frei. Nach ca. einer Minute wird die Clathrinhülle des Vesikels entfernt und die Clathrin-Moleküle werden zur Plasmamembran zurücktransportiert. Das Vesikel fusioniert mit frühen Endosomen, die sich dicht unter der Plasmamembran befinden und deren Inhalt durch Protonenpumpen in der Membran azidifiziert wird. Hier befinden sich Mechanismen, die die Sortierung des endozytierten Materials vornehmen. In den frühen Endosomen werden die Liganden oft durch den niedrigeren pH-Wert von den Rezeptoren gelöst und die Rezeptoren werden in Vesikel sortiert, die zurück zur Oberfläche gelangen, während die Liganden in das zunehmend saure Milieu später Endosomen und Lysosomen geleitet werden, wo sie degradiert werden (Kirchhausen, 2000;). Umhüllte Viren, die die Zelle durch diesen Weg infizieren sind zum Beispiel Influenza Virus, Semliki Forest Virus, und das vesikuläre Stomatitis verursachende Virus (VSV). Die konformationelle Änderung und damit Aktivierung der Fusionsproteine geschieht bei jeweils charakteristischen pH-Werten und legt dadurch fest, ob die virale Hülle mit der Membran früher oder später Endosomen verschmilzt. Auch das nicht-membranumhüllte Adenovirus wird in Clathrin-vermittelte Endosomen aufgenommen und tritt dann nach mehreren „uncoating“-Schritten durch Lyse der Membran ins Zytoplasma ein (Sodeik, 2000; Flint *et al.*, 2000).

Ein weiterer endozytotischer Mechanismus ist der Transport von Caveolae. Caveolae sind 50 bis 80 nm kleine, nicht-Clathrin-umhüllte endozytotische Vesikel, die von der Plasmamembran abgeschnürt werden und eine spezielle Membranzusammensetzung aufweisen. Cholesterol, Sphingomyelin und Glykosphingolipide, sowie das Protein Caveolin sind angereichert, dagegen enthalten sie jedoch keine Phospholipide (Fiedler *et al.*, 1993). Es wird angenommen, daß sie in Transcytose, Signal Transduktion, und der Aufnahme von Membranzusammensetzungen und extrazellulären Liganden involviert sind (Schnitzer *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1998). Der Transport von Caveolae verläuft ohne Ansäuerung der Vesikel. Auch hier wird bei der Vesikel-Ablösung eine ähnliche Rolle für Dynamin vermutet, wie bei

Clathrin-umhüllten pits (Henley *et al.*, 1998; Llorente *et al.*, 1998). Dieser Transportweg wird von Simian Virus 40 (SV40) zum Zelleintritt genutzt (Pelkmans *et al.*, 2001, 2002).

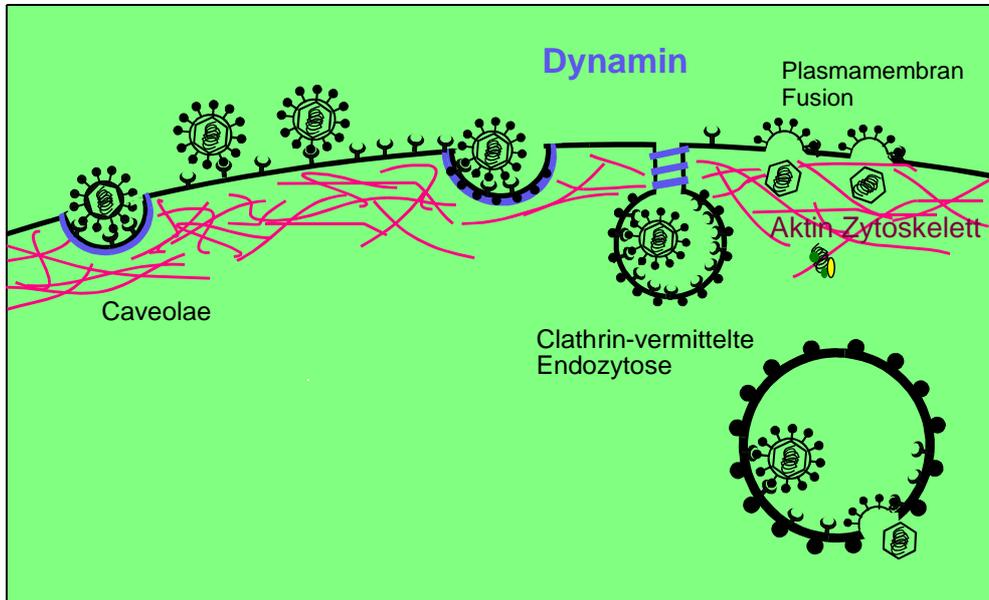


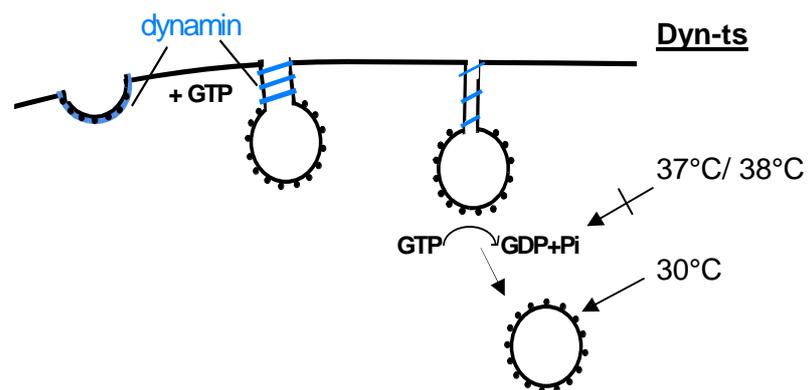
Abb. 1.2: schematische Darstellung verschiedener Virus-Aufnahmewege.

1.4 Funktionen der zellulären GTPase Dynamin

Wie bereits ausgeführt, spielt Dynamin eine entscheidende Rolle bei der Abschnürung von Vesikeln. Es gibt drei Dynamin-Isoformen mit jeweils verschiedenen Spleißvarianten. Dynamin-1 wird im Neuronen und bestimmten neuroendokrinen Zellen, Dynamin-2 in fast alle Geweben und Dynamin-3 in Hoden und geringer im Gehirn, im Herzen und in der Lunge exprimiert. Dynamin hat eine GTP-hydrolysierende Domäne am N-terminalen Ende, die durch Interaktion mit der GTPase-effector Domäne (GED) im C-terminalen Bereich stark aktiviert wird. Auch die Bindung von src homology 3- (SH3)-Domänen-enthaltenden Proteinen, die an der C-terminalen prolin-reichen Domäne (PRD) gebunden werden können, verstärkt die GTPase-Aktivität von Dynamin (Hinshaw, 2000). Über eine pleckstrin homology Domäne (PH) kann das Protein mit Membranlipiden interagieren (Hinshaw, 2000). Das Protein ist in der Lage sich zu Ringen und Spiralen zusammenzulagern (Hinshaw & Schmid, 1995) und formt in Anwesenheit von Liposomen geordnete helikale Röhren

(Tuma & Collins 1994). Die Funktion von Dynamin wurde hauptsächlich mit Hilfe von transdominant-negativen Dynamin-1 Mutanten ermittelt (van der Bliek *et al.*, 1993; Baba *et al.*, 1995) und mittels HeLa-Zelllinien, die diese Varianten stabil exprimieren (Damke *et al.*, 1994; 1995). Ihre Expression ist in den Zelllinien durch die Kontrolle eines Tetrazyklin- (Tet-) abhängigen Promotors regulierbar. Die mutierten Moleküle werden in gemischte Oligomere eingebaut und stören die Funktion der ganzen Spirale. Die Dynamin-Mutante K44A besitzt eine geringere Affinität für GTP und inhibiert wirksam die Internalisierung von Transferrin (Tfn), das ausschließlich durch Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Sie induziert die Bildung von tubulären, Clathrin-umhüllten Strukturen, die von der Plasmamembran ins Innere reichen und verhindert offenbar die Ablösung der Vesikel (Damke *et al.*, 1994, 1995). Dieser

Abb. 1.3: Dynamin-Funktion beim Ablösen von Clathrin-umhüllten Vesikeln. rechts: transdominant-negative Mutante Dyn-ts: Inhibition der Vesikelablösung bei 37°C/ 38°C; wt-Phänotyp bei 30°C



Phänotyp wird auch von der Mutante G273D (Dyn-ts) ausgelöst (Damke *et al.*, 1995). Hierbei handelt es sich um die homologe Mutante zur sogenannten *shibire* Mutation bei *Drosophila melanogaster*. Bei dieser Mutation wird das Transmitter-Recycling an den Nervenzellen bei der nicht-permissiven Temperatur von 38°C gehemmt (Poodry & Edgar, 1979; Kosaka & Ikeda, 1983). Die Dyn-ts Mutante besitzt bei der permissiven Temperatur von 30°C den Dynamin-Wildtyp (wt) Phänotyp, wohingegen durch die Einführung eines Aspartates in einen flexiblen Teil des Moleküls die Interaktion zwischen der GED und der GTPase Domäne bei der nicht-permissiven Temperatur von 38°C gestört und die Hydrolyse von gebundenem GTP gehemmt ist (Abb. 1.3). Dyn-ts ist im Gegensatz zu DynaminK44A in der Lage, sich zu einem ringförmigen

Kragen um die Verbindungsstelle zwischen Vesikel und Plasmamembran zusammenzulagern. Die unterschiedlichen GTP-Bindungsfähigkeiten der Dynamamin-Mutanten K44A und -ts lassen den Schluß zu, daß Dynamamin zunächst unbeladen oder mit GDP beladen am Clathrin-coated pit angesammelt wird, unter Beladung mit GTP die Spirale um den Vesikelhals bildet und unter GTP-Hydrolyse schließlich die Vesikelablösung bewirkt (Damke *et al.*, 1994,1995; Baba *et al.*, 1999).

Für den genauen Mechanismus der Dynamamin-Funktion gibt es mehrere Modelle. Die Zugabe von GTP bewirkt ein Verengen und Fragmentieren der *in vitro* auf anionischen Liposomen assemblierten Röhren (Schweitzer & Hinshaw, 1998). Die Wirkung könnte daher auf dem Zusammenziehen der Dynamamin-Spirale am Vesikelhals beruhen, wodurch schließlich die Membranen am Hals fusionieren. Ein anderes Modell vermutet, daß sich die Spirale unter GTP-Hydrolyse in die Länge zieht und so Plasmamembran und Vesikel auseinander zieht bis sich die Lipidmembranen in der Mitte vereinigen (Sever *et al.*, 2000). Ein weiteres Modell schlägt das Aneinandergleiten der Spirale zur Verengung vor – ähnlich wie Myosin an Aktinfilamenten entlangläuft (Smirnova *et al.*, 1999). Ein weiteres Modell geht davon aus, daß es sich bei Dynamamin um eine regulatorische GTPase handelt. Diese Annahme resultiert aus einer Untersuchung von Dynamamin-Mutanten, deren auf selbst-Assemblierung beruhende erhöhte GTPase-Aktivität gestört wurde. Diese Mutanten erhöhten die endozytotische Aufnahme, statt sie zu inhibieren. Es wird vermutet, daß die Mutation die GTP-gebundene Form des Proteins stabilisiert und dadurch die aktive Form des Proteins bei der Regulation von „downstream“-Faktoren zur Vesikelablösung länger wirksam ist (Damke *et al.*, 2001; Sever *et al.*, 2000).

Verschiedene Dynamamin-Isoformen wurden an verschiedenen Kompartimenten der Zellen gefunden, an denen sich Vesikel von Membranen lösen: z. B. Dynamamin-1 und -2 am Hals Clathrin-umhüllter pits und Caveolae bzw. Dynamamin-3 an nicht-umhüllten Vesikeln (Henley *et al.*, 1999) und außerdem beim Transport von Endosomen zum Golgi-Komplex. Allerdings ist die Beteiligung von Dynamamin-1 und -2 beim Vesikel-Transport vom Golgi kontrovers diskutiert. (Kreitzer *et al.*, 2000; Hinshaw, 2000; Henley *et al.*, 1999).

Weitere Funktionen von Dynamamin sind noch nicht detaillierter untersucht. Durch seine pleckstrin homology Domäne gibt es jedoch vielfache mögliche

Bindungspartner. Es wurde beschrieben, daß mögliche Partner z.B. im Zytoskelett zu finden sind. Das Zytoskelett stellt ein komplexes Stabilitäts- und Transportgerüst der Zelle dar und besteht aus drei cytosolischen Filamenten: Mikrotubuli, intermediären Filamenten und Microfilamenten (Aktin). Dynamin wurde als Mikrotubuli-bindendes Protein beschrieben (Shpetner & Vallee, 1989). Ferner wurden direkte und indirekte Interaktionen mit Aktin aufgedeckt, die helfen könnten, das unter der Plasmamembran liegende Aktin Zytoskelett mit der Endozytose-Maschinerie zu koordinieren (Schafer, 2002; Qualmann *et al.*, 2000; Kessels *et al.*, 2001).

Da Dynamin eine essentielle Funktion bei der Aufnahme von Endosomen hat, sollte es auch für die Infektion von Viren notwendig sein, die diesen Eintrittsweg verwenden. Dies wurde unter Verwendung der transdominant negativen Dynamin-Mutante K44A für eine Reihe von Viren gezeigt. So war die Aufnahme von Adeno Virus (Wang *et al.*, 1998), Adeno-assoziiertes Virus (Duan *et al.*, 1999), Influenza Virus (Roy *et al.*, 2000), humanes Rhinovirus, Semliki Forest Virus und Sindbis Virus gehemmt (DeTulleo & Kirchhausen, 1998). Im Gegensatz dazu verlief die Replikation von Polivirus (DeTulleo & Kirchhausen, 1998) und ecotropem Murinen Leukämievirus (Lee *et al.*, 1999) in Gegenwart von DynaminK44A unverändert.

1.5 Charakteristiken des Zelleintritts von HIV-1

Wie schon zuvor ausgeführt erfolgt die Virusaufnahme pH-abhängig über Endosomen oder pH-unabhängig, was in der Regel mit Fusion an der Plasmamembran gleichgesetzt wird. Im Falle von HIV-1 wurde bisher von pH-unabhängigem Eintritt durch Fusion an der Plasmamembran ausgegangen, wobei allerdings auch widersprüchliche Daten vorliegen. Für die direkte Plasmamembranfusion sprechen folgende Beobachtungen:

Milde Säuren wie Ammoniumchlorid und Inhibitoren der endosomalen Protonenpumpe wie Bafilomycin A und Concanamycin A verhindern die Ansäuerung von Endosomen. Die Infektion von pH-abhängigen Viren wird durch solche lysosomotrope Agenzien gehemmt, sie haben jedoch keinen Einfluß auf die HIV-1-Infektion. HIV-1 gehört damit zu den pH-unabhängigen Viren (McClure *et al.*, 1988; Stein *et al.*, 1987)

Bei elektronenmikroskopischen Analysen von frisch infizierten Zellen wurden Strukturen gefunden, die möglicherweise Partikel darstellten, die mit der Plasmamembran fusionieren (Grewe *et al.*, 1990)

CD4-Mutanten und Mutanten des chemokinen Korezeptor CCR5, deren Internalisierung in die Zelle gestört war, zeigten keinen Einfluß auf den Zelleintritt von HIV-1 (Maddon *et al.*, 1988; Pelchen-Matthews *et al.*, 1995; Amara *et al.*, 1997)

Dagegen gibt es Argumente, die für endosomale Aufnahme sprechen:

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden auch Partikel entdeckt, die mit der Endosomenmembran zu fusionieren schienen (Grewe *et al.*, 1990; Pauza *et al.*, 1988).

Für das HIV-1 Isolat SF2 wurde eine Infektionsreduktion bei Hemmung der Endosomenansäuerung festgestellt. Außerdem erhöhte sich der Titer von HIV-1_{SF2}, wenn die Partikel experimentell in einen vesikulären Aufnahmeweg geleitet wurden (Fackler & Peterlin, 2000). Damit wurde gezeigt, daß der Aufnahmeweg möglicherweise für verschiedene HIV-Isolate unterschiedlich sein kann.

Pseudotypisierte Partikel, die durch das VSV Glykoprotein von Zelleintritt durch Endosomen abhängig werden, zeigten im Gegensatz zu HIV-Wt-Partikeln keine, durch Abwesenheit von Nef induzierte Infektionsreduzierung, als könnte dieser Weg die Infektion erleichtern (Aiken, 1997; Schaefer *et al.*, 2001).

Die Rezeptoreninternalisierung wurde nie direkt nach HIV Exposition untersucht. Die Bindung und Quervernetzung durch das multivalente Virus könnte anders als der natürlich Ligand einen Endozytose-Mechanismus auslösen.

HIV-1 kann durch Pseudotypisierung mit VSV-G in einen pH-abhängigen, endosomalen Aufnahmeweg dirigiert werden, der zu einer produktiven Infektion führt.

Für ein anderes Retrovirus, das Avian Leukosis Virus (ALV), wurde kürzlich durch den Einsatz von neueren und sensitiveren Techniken, wie der quantitativen PCR-Analyse von RT-Produkten, gezeigt, daß ALV entgegen vorherigen Ergebnissen einen niedrigen pH-Schritt zum Zelleintritt benötigt, der

im Gegensatz zu klassischen pH-abhängigen Viren scheinbar erst nach Bindung des Rezeptors wichtig wird (Mothes *et al.*, 2000) und deshalb lange übersehen wurde.

Berücksichtigt werden muß außerdem, daß die pH-Unabhängigkeit des HIV-Zelleintritts die Aufnahme durch Endosomen nicht ausschließt, sondern daß lediglich keine Erfordernis für einen niedrigen pH-Wert besteht. Zudem gibt es auch Endozytosewege, die keine Vesikelansäuerung beinhalten (Caveolae). Die endosomale Aufnahme bietet zusätzlich zur Aktivierung von pH-abhängigen Fusionsproteinen noch andere Vorteile. So wird z.B. dem Virus eine Möglichkeit geboten, den gelartigen Aktin cortex unter der Plasmamembran passiv im Inneren des Vesikels zu durchqueren und in die Nähe des Zellkern geleitet zu werden. Außerdem wird sichergestellt, daß die Zelle lebend und aktiv ist und somit die Voraussetzung für die Virusvermehrung erfüllt.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob durch neuere Techniken, der Eintrittsmechanismus von HIV-1 näher charakterisiert werden kann.

1.6 Fragestellung

Um eindeutig festzustellen, ob endozytotische Mechanismen beim Zelleintritt von HIV-1 eine Rolle spielen, sollte ein Versuchsaufbau etabliert werden, bei dem die Wirkung von transdominant-negativem Dynamin auf die frühen HIV-1 Replikationsvorgänge analysiert werden kann. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit transdominant-negative Varianten von Dynamin-1 benutzt, die stabil in HeLa-Zelllinien exprimiert werden. Die Fähigkeit der zur Verfügung stehenden Dynamin-1-Mutanten G273D (Dyn-ts) und K44A, Clathrin-abhängige Endozytose in HeLa-Zellen zu hemmen ist klar beschrieben und stellt ein gut geeignetes Werkzeug dar, diesen Einfluß auf HIV-1 Zelleintritt zu analysieren. Dadurch, daß die mutierten Proteine unter der Kontrolle des Tetrazyklin- (Tet-) off-Systems stehen, könnten Zellen der gleichen Zelllinie in Anwesenheit von Tet als Kontrollzellen benutzt werden, die kein transdominant-negatives Dynamin exprimieren. Dies würde unerwünschte Nebeneffekte auf die HIV-1 Infektion minimieren, die aus dem Vergleich mit einer anderen Zelllinie resultieren würden.

Durch die Analyse verschiedener Virusisolate könnten mögliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten bei der Nutzung Dynamin-abhängiger Prozesse aufgedeckt werden.

Um einen Einfluß von Dynamin auf die frühen Replikationsschritte zu untersuchen, sollte durch den Einsatz der quantitativen LightCycler PCR des weiteren das Auftreten von reversen Transkriptionsprodukten in Abhängigkeit von funktionellem Dynamin näher charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die meisten der verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad "zur Analyse" und wurden hauptsächlich von folgenden Lieferanten beschafft: Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Pharmacia (Freiburg i. Br.), Roth (Karlsruhe), Riedel de-Hean (Seelze) und Boehringer Mannheim (Mannheim). Radiochemikalien wurden von den Firmen Amersham-Buchler (Braunschweig) und Hartmann Analytic bezogen. Plastikwaren kamen von den Firmen: Greiner (Nürtingen), Becton-Dickinson (Heidelberg), Renner (Darmstadt) und Eppendorf (Hamburg). Verwendete Laborgeräte, wie Zentrifugen, Inkubatoren für Bakterien und Säugetierzellen, Schüttel- und Rührgeräte, Netzgeräte, Elektrophoresekammern, Pipetten und Pipettierhilfen etc. stammten von verschiedenen Firmen. Mikroskope stammten von Leitz, Zeiss, Olympus und Hundt. Das FACS Gerät war von Becton-Dickinson (Heidelberg). Foto- und Filmmaterial (Röntgenfilme, Filme für die Mikrophotographie, Fotopapiere, etc.) wurden über den lokalen Fachhandel gekauft.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung von Puffern und anderen Lösungen wurde destilliertes Wasser aus einer Millipore Filtrationsanlage verwendet (MilliQ). Die pH-Werte der Lösungen wurden bei Raumtemperatur eingestellt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Tris-HCl	1M Tris, pH8,0 mit HCl
TE-Puffer	10mM Tris-HCl, pH8,0; 0,5 mM EDTA
Lösung I	25mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, 50 mM Glucose
Lösung II	1% SDS, 0,2 M NaOH
Lösung III	3M Kalium Acetat, pH5,0
TE/RNase	TE-Puffer mit 50 µg/ml RNaseA
50 x TAE-Puffer	2M Tris-Base, 0,25 M Essigsäure, 0,05 M EDTA
5 x DNA-Ladepuffer für Agarosegele	50% Glycerin, 20nM Tris-HCl, pH8,0; 20 mM EDTA, 0,01% Brom-Phenolblau
PBS	120 mM NaCl, 17 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM KH ₂ PO ₄ , pH7,2
PBS-Tween	PBS, 0,5% Tween

Tab. 2.1 Häufig verwendete Puffer und Medien

2.1.3 Kits

In der vorliegenden Arbeit wurden Kits von folgenden Firmen eingesetzt:

Bezeichnung	Hersteller
QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
NucleoBond PC 100/500	Macherey-Nagel
DNAzol	Gibco, BRL
CD4 Direct Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Light-Cycler - FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
1kb DNA-Molekulargewichtsmarker	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus

Tab. 2.2 verwendete Kits

2.1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme, T4-DNA Ligase, T4-DNA Polymerase, Klenow Enzym, thermostabile DNA-Polymerasen, alkalische Phosphatase und RNase A wurden von folgenden Firmen bezogen: New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Roche Mannheim (Mannheim), Pharmacia (Freiburg i.Br.), Stratagene (Heidelberg), MBI-Fermentas (St.Leon-Roth) und Sigma (Deisenhofen). Die Aufbewahrung erfolgte grundsätzlich bei -20°C.

2.1.5 Medien und Reagenzien für die Arbeit mit Bakterien

Die Medien (Sambrook et al., 1989) und alle Lösungen für die Arbeit mit Bakterien oder rekombinanter DNA wurden direkt nach der Herstellung durch Autoklavieren sterilisiert oder sterilfiltriert. Nach Bedarf wurde dem LB-Medium

für Flüssigkulturen oder Agarplatten nach Erkalten 100 µg/ml Ampicillin (LBamp) zugefügt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 5 g/l NaCl.
LB-Agar	LB-Medium mit 1.5% Agar wurde nach dem Abkühlen in sterile 10 cm Kunststoff-Petrischalen gegossen und bei 4°C aufbewahrt.
SOB-Medium	20g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl. Vor Gebrauch Zugabe von je 10 mM MgCl ₂ und MgSO ₄
TB-Puffer	10 mM Pipes, 55 mM MnCl ₂ , 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, pH 6.7, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.
Ampicillin	100mg/ml in Wasser, sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt

Tab. 2.3: Medien für die Arbeit mit Bakterien

Für alle Klonierungsarbeiten wurde der Escherichia coli (E. coli) Stamm XL-1 Blue der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Dieser hat die folgenden Genotyp-Merkmale: hsdR17, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F', proAB, lacIqZΔM15, Tn10,(Tetr)] und zeichnet sich durch eine besonders niedrige Rekombinationsfrequenz und eine hohe Transformierbarkeit aus.

2.1.6 Materialien für die Zellkultur

Plastikwaren für die Zellkultur stammten von den Firmen Nunc (Wiesbaden-Biebrich), TPP (Trasachingen, Schweiz), Corning (New York, USA).

Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640 (Gibco BRL, Gaithersberg USA), supplementiert mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 2mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium (Gibco BRL) supplementiert mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS, 2mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin

Tab. 2.4 Zellkulturmedien

Medienzusätze, die in der Zellkultur eingesetzt wurden, stammten aus folgenden Bezugsquellen:

Bezeichnung	Bezugsquelle
Fötales Kälberserum (FCS)	BioWhittaker Europe, Verviers, Belgien
Glutamin	Gibco BRL, Gaithersberg, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Gaithersberg, USA
Puromycin	Sigma, Deisenhofen
Geneticin	Gibco BRL, Gaithersberg, USA
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Sigma, Deisenhofen

Tab. 2.5: Medienzusätze

HeBS	280 mM NaCl, 10mM KCl, 1,5mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 12mM Dextrose, 50mM HEPES, pH7
CaCl ₂ -Lösung	250mM CaCl ₂ (Sterilisiert durch Filtration).
BBS-Lösung	50mM BES, 280mM NaCl, 1,5mM Na ₂ HPO ₄ (pH 6,95).
In situ Beta-Galaktosidase-Reagenz	0,1% X-Gal in PBS mit 2mM MgCl ₂ , 5mM Kaliumferricyanid und 5mM Kaliumferrocyanid.
MACS-Puffer	PBS, 5mM EDTA, 0,5% FCS
Trypsin / EDTA-Lösung	Trypsin 0,5g/ l, EDTA 0,2g/ l in PBS.

Tab. 2.6: Lösungen für zellbiologische Methoden

2.1.6.1 Zelllinien

Zelllinie	Charakterisierung	Medium	Herkunft / Referenz
HeLa Dynamin-wt, -K44A, -G273D (-ts),	humane Cervix-karzinom-Zelllinien, exprimieren in Abwesenheit von Tetrazyklin Dynamin-1-Varianten	DMEM	Von S. Schmid zur Verfügung gestellt (Damke et al. 1994, 1995)
4D9	CD4 ⁺ klonale Zelllinie aus HeLa Dynamin-G273D (-ts)	DMEM	In der vorliegenden Arbeit etabliert
HelaP4-CCR5	humane Cervix-karzinom-Zelllinie	DMEM	von M. Alizon zur Verfügung gestellt
HeLa	humane Cervix-karzinom-Zelllinie	DMEM	
MT-4	HTLV-transformierte humane T-Zelllinie	RPMI	Miyoshi <i>et al.</i> , 1982; Pauwels <i>et al.</i> , 1987
C8166	HTLV-transformierte humane T-Zelllinie	RPMI	Salahuddin <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984
PA317	murine Fibroblasten, amphotropes Hüllprotein von MLV	DMEM	(Miller und Buttimore, 1986)

Tab. 2.7: Verwendete Zelllinien

Die synthetischen Medien wurden vor Gebrauch mit folgenden Zusätzen versetzt: 10% FCS (wärmebehandelt für 30 min bei 56°C), 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 2mM Glutamin .

2.1.6.2 Antikörper

Methode	Bezeichnung	Spezifität	Bezugsquelle
ELISA/Immunfärbung infizierter Zellen	mAb 183	HIV-1 Kapsid	AIDS reagent Programme NIH, USA
ELISA	Kaninchen Kapsid	α HIV-1 Kapsid	Arbeitsgruppe Kräusslich
ELISA	Anti-Kaninchen PO	Kaninchen	Dianova, Hamburg
Immunfärbung infizierter Zellen	anti-Maus-PO Ziege α Maus IgG-BGAL	Maus Maus	Dianova, Hamburg Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA
FACS	anti-CD4-FITC	human CD4	Pharmingen, Heidelberg
FACS	anti-CXCR4-PE	human CXCR4	Pharmingen, Heidelberg
FACS	Maus IgG1,κ-FITC	Isotyp-Standard	Pharmingen, Heidelberg
FACS	Maus IgG1,κ-PE	Isotyp-Standard	Pharmingen, Heidelberg
Immunfluoreszenz / Immunoblot	mAb Maus-anti-HA	Epitop aus Hämagglutinin (Influenza Virus)	Böhringer Mannheim

Tab. 2.8: Antikörper für FACS-Analysen und ELISA

Transferrinaufnahme wurde mit Texas-Red- bzw. Alexa^{rot}-markiertem Transferrin (Molekular Probes, Oregon,USA) nachgewiesen.

2.1.6.3 Viren

Die provirale Klone HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{SF2} wurden von Wiskerchen & Cheng-Mayer und Adachi *et al.* (Wiskerchen & Cheng-Mayer, 1996; Adachi *et al.*, 1986), das Isolat HIV-1_{MVP8161} von Dittmar *et al.* beschrieben (Dittmar *et al.*, 1999).

2.1.7 Reagenzien für biochemische Methoden

2.1.7.1 Für die Gelelektrophorese

Laufpuffer für Proteingele: Glycin 0,384 M, Tris-Base 0,05 M, SDS 0,1 %.

2 x Ladepuffer für Proteingele: 2 % SDS, 2 % Beta-Mercaptoethanol, 0,118 M

Sammelgelpuffer, 20 % Glyzerin

10 x Sammelgelpuffer: 0,47 M Tris HCl pH 6,7

2.1.7.2 Für Immunoblot Analysen

Western Blot Transferpuffer:

Puffer I: 0,3 M Tris, 20 % MeOH

Puffer II: 0,025 M Tris, 20 % MeOH

Puffer III: 0,025 M Tris, 20 % MeOH, 0,04 % Amino-n-Caprinsäure (DL-Norleucin)

Ponceau-S Rot: 0,1 % Lösung in 5 % Essigsäure

Reagenzien für die Detektion mittels „Alkalischer Phosphatase“ (AP):

Western Blot Blocking-Puffer: 1 bzw. 10 % Magermilchpulver / 0,5 % Triton-X 100 in PBS

Western Blot Waschpuffer: PBS mit 0,5 % Triton-X 100

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Gentechnische Arbeiten

Alle Arbeiten mit DNA wurden nach allgemein üblichen Verfahren (Sambrook et al., 1989) in entsprechend zugelassenen Labors durchgeführt. Die Arbeiten mit HIV 1 fanden in zugelassenen Labors der Sicherheitsstufe 3 statt. Bei der Kultivierung von Bakterien und bei gentechnischen Methoden wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Zur besseren Standardisierung einiger gentechnischer Arbeiten wurden kommerziell erhältliche, gebrauchsfertige Kits verwendet.

2.2.1.2 Kultivierung und Konservierung von E. coli Stämmen

Bakterien wuchsen entweder auf LB-Platten oder in LB-Flüssigmedium. Die Kultivierung transformierter Bakterien erfolgte immer in Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin. Für kleine DNA Präparationen („Mini-Preps“) wurden Röhren mit 5 ml LB-Amp aus einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm

geschüttelt. Zur Großaufarbeitung von DNA wurden 200 ml LB-Amp in einem Erlenmeyerkolben inokuliert und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert.

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer stationären Kultur mit 300 µl sterilem Glycerin (50%) versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien erfolgte nach der Methode von Inoue et al. (1990) Dazu wurden 250 ml SOB-Medium mit 2 ml einer E. coli XL-1 Übernachtskultur inokuliert und für ungefähr 24 Stunden bei 20°C in einem 2l Erlenmeyerkolbern kultiviert, bis eine OD600 (optische Dichte) von 0.5 erreicht war. Danach wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, zentrifugiert und nach Waschen mit eiskaltem TB Puffer in 25 ml TB resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation der Bakterien auf Eis wurde Dimethylsulfoxid in einer Endkonzentration von 7% zugesetzt. Nach Aliquotieren in 100 – 500 µl wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Mit dieser Methode wurde eine Transformationskompetenz von bis zu 107 Kolonien pro µg Plasmid DNA erreicht.

2.2.1.4 Transformation von Bakterien

Nach dem Auftauen transformationskompetenter E.coli auf Eis wurden 50 µl Bakteriensuspension mit 15 µl DNA eines Ligationsansatzes oder mit 1 µl reiner Plasmid DNA vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 40 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt, mit 250 µl LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert, um die Expression der Beta-Laktamase zu ermöglichen. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde der gesamte Ansatz auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid DNA aus E.coli erfolgte nach dem Verfahren der alkalischen Lyse.

Für die Gewinnung kleiner Mengen von Plasmid DNA („Mini-Preps“) wurden ca. 2 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in 2 ml Eppendorf-Gefäßen für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl eiskalter Lösung I resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 200 µl Lösung II durch Invertieren gemischt. Anschließend wurden 150 µl Lösung III hinzugegeben, abermals invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wurde für 15 min in einer Mikrozentrifuge bei voller Drehzahl pelletiert, der Überstand in ein neues 1.5 ml Röhrchen transferiert, die DNA mit 1ml Ethanol (100%) präzipitiert und anschließend für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE / RNase gelöst und konnte dann direkt für Restriktionsverdau (analytisch 2-8 µl, präparativ 10-40 µl), oder zum Sequenzieren (16 µl bzw. 3 µl) eingesetzt werden.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid DNA wurden 200 ml einer stationären Übernachtskultur von E.coli ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgearbeitet. Anschließend wurde die DNA-haltige Lösung auf Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) beziehungsweise der Firma Macherey-Nagel (Düren) appliziert und gemäß den Angaben des Herstellers gewaschen und eluiert. Diese Vorgehensweise ergab 500-800 µg Plasmid DNA bei „high copy“ Plasmiden.

2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Nukleinsäuren haben eine maximale Extinktion (optische Dichte, OD) bei 260 nm. Bei einer Konzentration von 50 µg / ml hat doppelsträngige DNA eine OD₂₆₀ von 1,0. Damit lässt sich die DNA-Konzentration berechnen. Proteine haben eine höhere Extinktion bei 280 nm und der Quotient von OD₂₆₀ / OD₂₈₀ gibt eine Auskunft über den Reinheitsgrad der DNA. Bei einer sauberen DNA Präparation sollte der Quotient einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben.

2.2.1.7 Alkoholpräzipitation von DNA

Zur Konzentrierung oder zum Pufferwechsel kann DNA mit Alkohol quantitativ präzipitiert und in einem neuen Puffer wieder aufgenommen werden. Dazu wird ein gegebenes Volumen DNA-Lösung mit 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 4,8)

und drei Volumina absolutem Ethanol versetzt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge für 15 bis 30 min bei voller Drehzahl und 4°C pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE gelöst.

2.2.1.8 Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Spaltungen von Plasmid DNA mit Restriktionsenzymen wurden nach Angaben der Hersteller unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Das Volumen des zugesetzten Enzyms darf dabei 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Teilweise wurden die Restriktionsenzyme anschließend bei 65 oder 75°C für 20 min thermisch inaktiviert.

Ein diagnostischer Verdau wurde in der Regel mit 1-2 µg DNA (oder 4 µl Mini-Prep DNA) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt.

2.2.1.9 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Eine nicht-denaturierende elektrophoretische Größenauftrennung von DNA Fragmenten erfolgte über 0.7-2% Agarose-Horizontal-Gele (w/v) mit 2 µg/ml Ethidiumbromid in TAE Puffer bei einer Spannung von 6 bis 8 Volt/cm. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 0.2 Volumen Ladepuffer vermischt. Als Größenmarker wurde in der Regel mit HindIII und EcoRI verdaute Lambda-Phagen DNA oder kommerziell erhältliche Längenstandards verwendet. Die DNA Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator (254 nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis über eine Videokamera mit angeschlossenem Drucker (Intas, Göttingen) dokumentiert.

2.2.1.10 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion („polymerase chain reaction“; PCR) dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen unter Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen sowie zweier Oligonukleotide als Startermoleküle („Primer“), die zu je einem kurzen Abschnitt der beiden Ursprungs-DNA-Stränge komplementär sind (Mullis et al., 1987)

Zur quantitativen Amplifizierung von Template DNA (proviraler pNL4-3 Plasmidvektor), die mit genomischer DNA zusammen aufgereinigt wurde, wurden ca. 5 ng und 25 ng Template DNA eingesetzt und über 18 Runden amplifiziert. Es wurde ein Bereich der Minus-Strang strong stop DNA mit folgenden Primern amplifiziert:

AA55: CTGCTAGAGATTTTCCACAC und M667: CTAAGTAGGGGAACCCACTG

Die PCR wurde in 50 μ l Ansatz unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 250nM dNTP's, 5-25 ng Template DNA, je 1pM/ μ l Primer, 1 Einheit Polymerase-Mix (Taq Polymerase). Puffer: 20mM Tris HCl pH 8 , 5mM KCl, 4mM MgCl₂.

2.2.1.11 Quantitative Amplifikation viraler DNA im Light Cycler

Im LightCycler werden wie in einer normalen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Zyklen aus unterschiedlichen Temperaturbedingungen spezifisch Fragmente aus DNA-Zielmolekülen (Templates) amplifiziert. Dabei wird die Vermehrung des Fragments in Echtzeit parallel detektiert. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bindet doppelsträngige DNA, was zu einer sehr stark erhöhten Fluoreszenz führt. Mit der exponentiellen Zunahme der Menge an doppelsträngigen Produkten während der Reaktion wird eine gleichzeitige exponentielle Erhöhung der Fluoreszenz detektiert, die nach um so weniger Zyklen auftritt, je höhere Mengen des Zielmoleküls eingesetzt wurden. Durch den parallelen Einsatz von Standardverdünnungen aus bekannten Konzentrationen des Templates wird in unbekanntem Proben die Template-Konzentration des Inputs berechnet.

Durch die Programmierung einer Schmelzkurven-Analyse wird festgestellt, ob nur ein Produkt amplifiziert wurde oder zusätzlich unspezifische Nebenprodukte. Hierzu werden die Produkte nach der Amplifikation auf 60°C gekühlt und dann langsam auf 95°C erwärmt, wobei ständig die Fluoreszenzintensität gemessen wird. Am spezifischen Schmelzpunkt T_m des Produkts, an dem 50% der Produkte denaturiert vorliegen und 50% doppelsträngig, ist die Änderung der Fluoreszenz am stärksten. Diese Temperatur wird durch ein Maximum in der ersten negativen Ableitung ($-dF/dT$)

(dF= Änderung der Fluoreszenz; dT= Änderung der Temperatur) der Schmelzkurve dargestellt. Dieser Schmelzpunkt wird durch die Länge des Produkts und den GC-Gehalt bestimmt und ist für jedes Produkt spezifisch. Befinden sich mehrere verschiedene Produkte in der Probe, so werden mehrere verschiedene Schmelztemperaturmaxima gemessen.

Von DNA-Proben infizierter Zellen wurden 1 bis 2µl für die LightCycler PCR eingesetzt. Es wurde der LightCycler Kit: Fast Start DNA SYBR Green benutzt und nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Als Standard für die U3-Konzentrationsbestimmung dienten Verdünnungen von U3-enthaltendem Plasmid. Für gag-Bestimmungen wurden Verdünnungen von DNA infizierter Zellen als Standard benutzt. Es wurde jeweils genomische DNA von nicht-infizierten Zellen äquivalent zu insgesamt 1000 Zellen /2µl zu den Verdünnungen ergänzt.

Als Standard für die GAPDH-Quantifizierung dienten Verdünnungen von genomischer DNA aus DNAzol-behandelten Zellen.

Die verwendeten Primer sowie die Magnesiumkonzentration und das PCR Programm lauteten wie folgt:

U3 (Minus-Strang DNA):

48U3s:TGGATCTACCACACACAAGGCTA

118U3as: AGCACCATCCAAAGGTCAGTG;

MgCl₂: 3mM

Prädenaturierung: 10 min 95°C; Denaturierung: 9s 95°C; Anlagerung: 5s 59°C;

Verlängerung: 6s 72°C, Detektion: 0s 80°C

Gag (Minus-Strang DNA):

764gags:CCATCAATGAGGAAGCTGCA;

847gagas: TTGGTTCTCTCATCTGGCCTG;

MgCl₂: 4mM

Prädenaturierung: 10 min 95°C; Denaturierung: 10s 95°C; Anlagerung: 8s

64°C; Verlängerung: 6s 72°C, Detektion: 72°C

Human GAPDH:

Primer zur Verfügung gestellt von T. Giese, Immunologie, Universität Heidelberg.

Prädenaturierung: 10min 95°C; Denaturierung: 10s 95°C; Anlagerung: 10s 68°C, sekundäre Temperatur: 58°C, Step size: 0.5, Step delay: 1; Verlängerung: 16s 72°C, Detektion: 72°C

2.2.2 Zellbiologische und virologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur

Die adhärent wachsenden Zellen wurden in DMEM, versetzt mit 10% FCS, Glutamin und Antibiotika, bei 37 °C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Passagierung wurden die adhären Zellen nach Waschen mit PBS vom Boden des Gefäßes trypsiniert und je nach Bedarf auf neue Kulturgefäße in frischem Medium verdünnt.

Tetrazyklin-regulierbare Dynammin-transformierte Zellen wurden mit DMEM, versetzt mit 10% FCS, Glutamin, 200 ng/ml Puromycin, 400µg/ml Genitacin, 1µg/ml Tetrazyklin und 1mM Natriumpyruvat kultiviert.

Die Suspensionszelllinie C8166 und MT-4 wurde in RPMI, versetzt mit 10% FCS, Glutamin und Penicilin und Streptomycin (bei MT-4 außerdem mit 5mM HEPES freier Säure) bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Passagierung wurde das Medium über den Zellen und je nach Bedarf ein Teil der Zellen abgesaugt und frisches Medium ergänzt. MT-4 Zellen wurden in einer Dichte zwischen 5x10⁵ und 2x10⁶ Zellen/ml gehalten und das Medium mit 5mM HEPES, freie Säure versetzt.

2.2.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Von den kultivierten und frisch isolierten (siehe 2.3.3 und 2.3.5) Zellen wurden regelmäßig Portionen eingefroren. Dazu wurden die Zellen in Kulturmedium und 15% FCS und 5% (v/v) Dimethylsulfoxyd (DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden-Biebrich) überführt. Proben für kurze Aufbewahrungsdauer, wurden bei -80°C aufbewahrt, für langfristige Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Bei Bedarf wurden die eingefrorenen Zellportionen schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Medium gewaschen, um das toxische DMSO auszudünnen und dann in Kulturmedium aufgenommen.

2.2.2.3 Transfektion von Zellen zur Herstellung von Virusüberständen

Die Transfektion von Zellen erfolgte nach der Kalzium-Phosphat-Methode. Für die Transfektion wurden 5×10^5 HeLaP4 in eine 10cm Schale ausgesät, so dass die Zellen möglichst vereinzelt vorlagen. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch genau 9 ml frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 2 bis 4 Stunden wieder in den Inkubator gestellt. 5 – 10 µg provirales Plasmid wurden in 500 µl 0,25 M CaCl_2 Lösung suspendiert und danach wurde diese Lösung sofort mit 500 µl 2 x HeBS oder BBS sorgfältig gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde dann unter Schwenken der Zellkulturschale ins Medium getropft. Die Zellen wurden über Nacht bei 35 °C in einer Atmosphäre von 3 % CO_2 und gesättigtem Wasserdampf inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium verworfen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit frischem Medium für zwei weitere Tage bei 37 °C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5 % CO_2 inkubiert. Die Überstände wurden durch Filtrieren geerntet, auf 10mM HEPES pH 7,4 eingestellt und portionsweise bei -80°C eingefroren.

2.2.2.4 Herstellung von hochtitrigem Virus

HeLaP4-Zellen wurden mit proviralen Plasmiden von HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{SF2} transfiziert und die Überstände nach 2 bis 3 Tagen durch 0,45µm filtriert und C8166-Zellen infiziert. HIV-1_{MPV8161}-haltiger Zellüberstand wurde direkt auf C8166-Zellen gegeben. Bei starker Syncytenbildung wurde das Virus durch Mischen der Zellen mit uninfizierten Zellen im Verhältnis 1:10 passagiert und vermehrt. Der virushaltige Überstand wurde durch Filtrieren von Zellen getrennt und im Volumenverhältnis von ca. 1:2 bis 1:5 auf MT-4 Zellen gegeben. Die MT-4-Zellen wurden bei einer Dichte von 5×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ /ml kultiviert. Zur Synchronisation der Infektion wurde die Zellmorphologie während der Infektion

beobachtet. Nach einigen Stunden p.i. verkürzt die HIV-1 infizierte MT-4-Zelle die zahlreichen Zellfortsätze und rundet sich schließlich ab. Im späteren Stadium lösen sich die Zellaggregate in Einzelzellen auf. Zum Zeitpunkt des Einziehens der Zellfortsätze beginnen die Zellen große Mengen an Viruspartikel freizusetzen und durch Vermischen infizierter Zellen mit uninfizierten Zellen im Verhältnis 1:5 wird eine neue, synchrone Infektion begonnen. Ab dem Zeitpunkt des Abrundens bis weiteren ca. 10 Stunden wurde der Virushaltige Überstand geerntet. Dieser Zeitpunkt war etwa nach 19 bis 25 Stunden für HIV-1_{NL4-3}, nach 30 bis 36 Stunden für HIV-1_{SF2}, nach 40 bis 45 Stunden für HIV-1_{MPV8161} (HIV-1 Gruppe O) erreicht. Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand durch 45µm-Filter filtriert und zur Vermeidung von pH-Wertverschiebungen während des Einfrierens auf 10mM HEPES pH 7,4 eingestellt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Zur Titrierung und für Infektionen wurde das Virus bei 37°C im Brutschrank aufgetaut.

2.2.2.5 Virustitration

2.2.2.5.1 Auf adherenten Zellen

Für die Titration von Virusüberständen wurden HeLaP4 oder 4D9-Zellen in 48-Napf-Platten ausgesät (1×10^4 Zellen/Napf). Am nächsten Tag wurden Virus aus Zellüberständen aufgetaut und je 100µl von 1:10er Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-6} /ml in Triplikaten auf die Zellen gegeben. Nach sechs Stunden wurde das Medium gewechselt die Zellen für drei Tage bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ inkubiert. Die Zahl der infizierten Zellen wurde durch Immunfärbung (siehe 2.2.2.6) ermittelt.

Die Titration in An- oder Abwesenheit von Tet wurden wie in 2.2.2.4.1 durchgeführt. Dabei wurde den Virusverdünnungen 1µg/ml Tet oder das gleiche Volumen des Lösungsmittels (100% Ethanol) zugesetzt. Nach der sechstündigen Virusinkubation wurden die Zellen bis zur Immunfärbung weiter in Anwesenheit von Tet gehalten

2.2.2.5.2 Auf Suspensions-Zellen

Für die Virus-Titration auf C8166-Suspensionszellen wurden diese auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt und 100 bis 150 μ l/well in 96-Wells ausgesät. Am nächsten Tag wurde aufgetautes Virus aus Zellüberständen in 1:10er Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-8} /ml in Quadruplikaten auf die Zellen gegeben und mehrere Tage bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ inkubiert. Jeden Tag wurden die Kulturen auf Entstehung von virusinduzierten Syncytien beobachtet. Nach 10 bis 15 Tagen wurde die Anwesenheit des HIV-1 Kapsid-Proteins (p24) in den Überständen mittels ELISA (2.2.2.7) ermittelt.

2.2.2.6 Detektion infizierter Zellen durch Immunfärbung

Infizierte Zellen wurden durch Immunfärbung von intrazellulärem p24 detektiert (Sonza et al., 1991). Dazu wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und dann mit eiskaltem Methanol:Azeton (1:1) für 10 min fixiert und das Virus inaktiviert. Es wurde nochmals mit PBS gewaschen. Die Detektion von p24 erfolgte mit dem gegen das Kapsidprotein gerichteten monoklonalen Maus-Antikörper 183 (1:5000 in PBS mit 1% FCS). Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit PBS /1% FCS gewaschen und mit dem Zweitantikörper, einem anti-Maus β -Galactosidase Konjugat (1:160 in PBS/1% FCS), eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde viermal mit PBS gewaschen und die Zellen mit β -Galactosidase-Substrat (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -Galacto-pyranosid) in einer X-Gal-Färbelösung bei 37°C (ü. N.) inkubiert, bis eine Blaufärbung zu erkennen war. Die angefärbten, infizierten Zellen wurden unterm Lichtmikroskop gezählt.

2.2.2.7 ELISA zum Nachweis von Virus im Kulturüberstand

Zur Detektion von p24 in Zellkulturüberständen wurde ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) durchgeführt. Der in der vorgelegten Arbeit verwendete Test erfolgt nach dem Prinzip des „Sandwich-ELISA“. Dabei bindet ein Antikörper, der an die Testplatte gebunden ist, das Antigen, das im nächsten Schritt von einem zweiten Antikörper erkannt wird. Dieser wird

wiederum von einem Peroxidase-konjugierten Antikörper gebunden. Der Nachweis erfolgt schließlich über die durch die Peroxidase katalysierte Umsetzung von Tetramethylbenzidin (TMB) und H_2O_2 , die in einem Farbumschlag resultiert.

Für den p24-ELISA wurden zunächst die Virusüberstände mit 0,05% Triton X 100 inaktiviert und auf eine MAXI-Sorb-Platte (Nunc, Wiesbaden-Biebrich) gegeben, die zuvor mit dem Antikörper 183 beschichtet (1:1000 in PBS; über Nacht, RT, feuchte Kammer) und mit 10%FCS in PBS geblockt worden war. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von aufgereinigtem Kapsidprotein aufgetragen. Die Überstände wurden über Nacht (RT, feuchte Kammer) auf den ELISA-Platten inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit PBS und 0,5% Tween20 gewaschen. Als Zweitantikörper wurde ein Kaninchen-anti-p24-Antikörper (1:000 in PBS mit 10% FCS und 0,05% Tween20) eingesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS / 0,5% Tween20 gewaschen, der Drittantikörper, ein Peroxidase-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova) in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS mit 10% FCS und 0,05% Tween20 auf die Platte gegeben und wieder für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dann dreimal mit PBS / 0,5% Tween20 und dreimal mit VE-Wasser gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Peroxydase-konjugierten Antikörpers wurde eine Substratlösung (10 ml 0,1M Na-Acetat mit 100µl TMB und 2µl H_2O_2) auf die Platte gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 5µl 0,5N H_2SO_4 abgestoppt. Zur Quantifizierung der Reaktion wurde die optische Dichte in einem Photometer (Dynatech, MR5000) gemessen.

2.2.2.8 Transduktion und Infektion von Zellen

Die Verpackungszelllinie PA317 produziert einen retroviralen Vektor, der das CD4-Gen flankiert vom LTR des murinen Leukämievirus und zusätzlich den Resistenzmarker Geneticin unter der Kontrolle des Promotors des Simian Virus 40 enthält. Der Überstand dieser Zellen wurde alle 6 bis 14 Stunden - insgesamt viermal - von den Zellen geerntet, durch ein 0,45µm-Filter filtriert und der partikelhaltige Überstand mit Tet und Antibiotika und 8 µg/ml Polybren versetzt und mit am Vortag in 6-Wellns ausgesäten Dynamin-Zellen (5×10^4

Zellen/Well) inkubiert. Die Zellen wurden mit einem FITC-konjugierten anti-CD4-Antikörper gefärbt und die CD4-Expression an der Zelloberfläche im FACS kontrolliert.

2.2.2.9 MACS-Separation von CD4-positiven Zellen

CD4-positive Dynamin-Zellen wurden durch Transduktion gewonnen, um daraus mit der MACS-Methode (magnetic antibody cell sorting) die CD4-positiven Zellen aufzureinigen. Die MACS-Separation erfolgt nach folgendem Prinzip der magnetischen Trennung. Dabei wird an eine Säulenmatrix aus Stahlwolle ein magnetisches Feld angelegt. Zellen, an die zuvor mit Magnetperlen gekoppelte Antikörper gebunden haben, werden in der Säule festgehalten, während ungebundene Zellen durchfließen.

Für die Aufreinigung CD4-positiver Zellen wurde der CD4-Direkt-Isolation Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) benutzt. Dazu wurden die Zellen (maximal 3×10^8 Zellen pro Ansatz) mit 5mM EDTA in PBS von der Unterlage abgelöst und mit MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 μ l Puffer aufgenommen und für 30 Minuten mit jeweils 100 μ l CD4-Antikörper (mit Magnetperlen gekoppelt) bei 4°C inkubiert. Währenddessen wurden die MACS Säulen in den Magneten gehängt und durch zwei- bis dreimaliges Spülen mit dem Waschpuffer äquilibriert. Die Zellen wurden gewaschen und auf die Säule gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit MACS-Puffer wurde die Säule aus dem Magneten genommen und mit 1ml Puffer unter Verwendung eines Stempels aus der Säule eluiert. Die Zellen wurden auf eine neue Säule gegeben, und nach zweimaligem Waschen wieder eluiert. Die Ausbeute lag je nach eingesetzter Zellzahl zwischen 1×10^4 und 2×10^6 Zellen. Die isolierten Zellen wurden wieder im Dynamin-Medium in Kultur genommen. Die Reinheit der Separation wurde nach ausreichender Proliferation im FACS (siehe 2.2.2.10) überprüft.

2.2.2.10 Markierung von Zellen mit Antikörpern für die FACS-Analyse

Für die FACS-Analyse wurden Zellen ($0,5 \times 10^5$ - 1×10^6) zunächst durch zweimaliges Waschen in PBS/0,5% FCS vorbereitet. Die Zellen wurden

anschließend in 100µl PBS/ 0,5% FCS resuspendiert. Die verschiedenen Antikörper wurden nach Angaben der Hersteller zu der Zellsuspension gegeben und das Gemisch für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Markierung wurden die Zellen erneut zweimal in PBS mit 5% FCS gewaschen und in FACS-Röhrchen (Bekton-Dickinson, Heidelberg) überführt. Die Analyse erfolgte im FACScan bzw. FACS-Calibur (Bekton-Dickinson, Heidelberg).

2.2.2.11 Sortierung CD4-positiver Einzelzellen und Expansion klonaler Zelllinien

Massenkultur aus CD4-transduzierten Dyn-ts-Zellen wurden ca. 4 Tage vor Sortierung einer MACS-Selektion unterzogen und expandiert. 10^7 Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, einmal mit FACS-Puffer (PBS/ 1%FCS) gewaschen, in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und in An- oder Abwesenheit von 10µl anti-human-CD4-FITC 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 10 ml Sorting Medium (DMEM, Penicillin, Streptomycin, 0,2% FCS und 5% Dissoziationspuffer (GibCo BRL, Gaithersberg USA) aufgenommen. Die Zellenaggregate wurden durch filtrieren durch eine Gaze entfernt und die Zelle auf Eis gestellt. Kurz vor der Sortierung wurden 1µg/ml Propidiumiodid zugegeben, um bei der FACS-Analyse tote von lebenden Zellen zu unterscheiden. Die Zellen wurden in 96-well-Platten, die vorher mit Medium mit FCS, Glutamin, Penicillin, Streptomycin, Tetrazyklin und Pyruvat befüllt wurden sortiert. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank gehalten und am nächsten Tag das Medium gewechselt und alle Antibiotika für die Dynamin-Zellen zugegeben. Die Zellen wurden über zwei Wochen expandiert und die Kolonienbildung aus Einzelzellen unterm Mikroskop verfolgt. Nach ausreichender Expansion wurden Zellen eingefroren und auf CD4- und Dyn-ts-Expression untersucht.

2.2.2.12 Indirekte Immunfluoreszenz

Auf mikroskopischen Deckgläschen wachsende adhärente Zellen wurden (nach der 20minütigen Zugabe von fluoreszenzgelabelten Transferrin) nach Waschen

mit PBS für 10 min in 3 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Zur Immunfärbung wurden die Zellen zur Blockierung des PFA 10 min mit 50mM Ammoniumchlorid in PBS überschichtet und anschließend in PBS gewaschen. Die Zellen wurden 5min in 0,05% Triton x 100 in PBS permeabilisiert und nach erneutem Waschen mit in 10% FCS in PBS verdünntem Erstantikörper (monoklonaler Maus-anti-HA-Antikörper, 5µg/ml) überschichtet und 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde der Zweitantikörper (anti-Maus-Alexa^{grün}; 1:1000) analog inkubiert und gewaschen. Die Präparate wurden in deionisiertem Wasser entsalzt und mit Elvanol eingebettet und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axiophot) analysiert. Digitale Aufnahme und Bildarchivierung erfolgte mit einer Photometrics-CCD-Kamera, respektive mit IPLab Spectrum Software.

Fixierung für die indirekte Immunfluoreszenz:

3 % Paraformaldehyd in PBS: 1,5 g Paraformaldehyd wurde unter Rühren und 100 °C gelöst. 62,5 µl 2 M NaOH pH 5,2 wurde zugegeben. Nach weiteren 5 min Rühren wurde die Lösung auf Eis abgekühlt. Unter weiterer Zugabe von 2 M NaOH pH 5,2 wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter gegeben. Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

50 mM NH₄Cl / 3 % Paraformaldehyd / PBS.

Elvanol: 1g Polyvinylalkohol (Mr 6000; Serva) wurde unter Erwärmen in 8 ml PBS gelöst, mit 4 ml Glycerin (87 %) gemischt und autoklaviert.

Fixierung infizierter Zellen für die indirekte Immunfluoreszenz:

Methanol / Azeton im Verhältnis 1:1 , -20°C.

2.2.2.13 Single round entry assay (sre-Assay)

2.2.2.13.1 Quantifizierung durch Detektion der viralen Proteinexpression

Am ersten Tag wurden 3×10^5 Dynamins-Zellen (Zelllinie 4D9) pro 10-cm-Schale ausgesät und über Nacht in DMEM high Glucose mit 1mM Pyruvat und 1µg/ml Tetracyclin bei 37°C inkubiert. Die Hälfte der Platten wurde dreimal mit 7ml PBS gewaschen und weiter in Medium ohne Tetracyclin gehalten. Bei der

anderen Hälfte wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und wieder Tetracyclin ergänzt (Kontrolle). Alle Platten wurden zur Expression der temperatur-sensitiven Dynamin-Mutante (bzw. Kontrolle) bei 32°C gehalten. Am dritten Tag wurden die Zellen mit 32°C warmen PBS gewaschen und mit 500µl Trypsin bei 32°C von der Platte gelöst. 1×10^4 Zellen pro well wurden mit bzw. ohne Tetracyclin in 48-well Platten ausgesät und zwei weitere Tage bei 32°C inkubiert. Am fünften Tag wurde das Medium von den Zellen genommen und überall 150µl Medium ohne Tetracyclin und gegebenenfalls 10mM Ammoniumchlorid zugegeben. Die Zellen wurden für 1 bis 1,5 Stunden bei 37°C präinkubiert, um die Ausbildung des trans-dominant-negativen Phänotyps hervorzurufen (bei 30°C Infektion auf 30°C präinkubiert). Das Virus wurde aufgetaut, auf etwa 1500 IE/ml (MOI 0,01) verdünnt und gegebenenfalls 10mM Ammoniumchlorid zugesetzt und auf 37°C (bzw. 30°C) erwärmt. Die Platten wurden zum Halten der Temperatur in der Sterilbank auf einem 38°C-Heizblock gestellt und pro well mit 100µl der Virusverdünnung infiziert (jeweils dreifach-Ansätze) und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der angegebenen Zeit wurde das Medium auf den Zellen gewechselt. Zur Verhinderung der Infektionsausbreitung und des Viruseintritts und –replikation bei den veränderten Bedingungen wurde 10µM Azidothymidin (AZT) zugesetzt und zum Produktionsstop des Tet-regulierten Dyn-ts', wurde Tet zugegeben. Eine Hälfte des gesamten Ansatzes wurde für 2 Tage bei 37°C inkubiert, während die andere Hälfte für 4 Tage bei 30°C gehalten wurde. Bei letzterem wurde durch die permissive Temperatur der Mutanten-Phänotyp sofort nach den frühen Replikationsschritten abgeschaltet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und fixiert.

2.2.2.13.2 Detektion durch quantitative Präparation von RT-Produkten und genomischer DNA

Für die Infektionen zur Analyse der RT-Produkte via LightCycler wurden am dritten Tag $2,5 \times 10^5$ Zellen/well in 24-well-Platten ausgesät und diese am Infektionstag mit einer MOI von 0,3 infiziert. Nach den angegebenen Zeiten wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die DNA nach der DNazol-Methode gereinigt.

Duplikate der Ansätze wurden wie oben zur Expression der viralen Proteine für zwei Tage bei 37°C gehalten

2.2.2.14 Methoden zur quantitativen Isolierung von genomischer und episomaler DNA.

2.2.2.14.1 DNAzol

Infizierte Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS durch Zugabe von 150µl DNAzol direkt im well lysiert; beim Test mit Plasmid-DNA wurde diese zum gewaschenen Zellpellet aus 1×10^5 Zellen zugegeben und dann DNAzol ergänzt. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und das well nochmals mit 150µl DNAzol ausgespült. Durch Mischen mit 150µl 100% Ethanol wurde die DNA präzipitiert und bei 13000 rpm 5 min abzentrifugiert. Die DNA wurde zweimal mit 800µl 95%igem Ethanol gewaschen (dabei nicht antrocknen lassen) und dann in 30µl 8mM NaOH aufgenommen. Zum Abdampfen des restlichen Ethanols wurde das Gefäß bei 35°C für 1 bis 2 Stunden offen aufgestellt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde dies mit gestopften Spitzen und einem Raum, in dem keine Plasmid-Präparationen durchgeführt wurden, ausgeführt.

2.2.2.14.2 Phenol/Chloroform (modifiziert nach Mothes *et al.*, 2000)

Abtrypsinierte Zellen wurden mit PBS gewaschen und das Zellpellet und die Plasmid-DNA für 15 min mit 0,3ml Puffer (5mM EDTA, 130 mM NaCl, 100 µg/ml Proteinase K, 1%SDS) inkubiert.

Proteine wurden zweimal mit 0,5 ml Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wurde einer Alkoholpräzipitation unterzogen und in 50µl TE aufgenommen.

2.2.2.14.3 QIAamp DNA Blood Mini Kit

Die DNA aus Zellen und Plasmid wurde mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit von Quiagen nach Angaben des Herstellers gereinigt und die DNA zum einen mit 60µl des mitgelieferten Elutionspuffers und zum anderen mit 60µl H₂O eluiert.

2.2.2.15 Transferrin-Aufnahme Assay

Mit Zellen bewachsene Coverslips wurden in 24-Wells gelegt und mit je 300 μ l Medium bedeckt. Je 5 μ l Alexa-Rot- oder TexasRed-konjugiertes Transferrin wurden zugeben (ohne die Temperatur im Well zu verändern) und die Coverslips nach 20min kurz in PBS gewaschen und mit 3% Paraformaldehyd 10 min fixiert. Wenn keine zusätzliche Immunfluoreszenzfärbung erfolgen sollte, wurden sie nochmals mit PBS gewaschen, mit deionisiertem Wasser entsalzt und feucht mit Elvanol eingedeckelt und getrocknet.

2.3 Biochemische Analysen

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Proteinanalyse wurde eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach (Laemmli, Beguin, und Gujer-Kellenberger, 1970) durchgeführt. Verwendet wurden dabei 17,5 % Trenngele (Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid 200:1) und 6,3 %ige Sammelgele (Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid 40:1). Vor dem Auftragen wurden die Proben für 10 min in Protein Ladepuffer gekocht. Es wurden Mini-Gele (Größe 9x7x0,15 cm; System 201, Hoefer, San Francisco, USA) verwendet und die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke durchgeführt (20 mA im Sammelgel und 40 mA im Trenngel).

2.3.2 Immuno Blot / Western Blot (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979)

Nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mit einer Semi-dry Trans-Blot Apparatur (cti GmbH) bei 200 mA für 45 min bis 1 h bei 4 °C auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll) übertragen. Die Übertragungseffizienz wurde durch Färbung mit Ponceau-S (Sigma) überprüft. Nach Entfärbung mit PBS wurde die Nitrozellulose zur Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen für 30 min in 10% Magermilchpulver / 0,05 % Tween 20 in TBS inkubiert. Der spezifische Antikörper (anti-HA: 5 μ g/ml) wurde in TBS mit 5% Magermilchpulver / 0,05% Tween 20 verdünnt und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Überkopf-Schüttler mit der Nitrozellulose inkubiert. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges, zehnminütiges Waschen mit

TBS/0,05%Tween 20 entfernt und die Membran erneut für 30 min mit 10 % Milchpulver in TBS blockiert. Der zweite, Peroxidase-assoziierte Antikörper wurde 1:10000fach in TBS/5 % Milchpulver/0,025 % Tween 20 verdünnt und für 1,5 h inkubiert. Hiernach wurde die Membran wiederum in mehreren Schritten gewaschen: zweimal für 10 min mit TBS/0,05%Tween 20, einmal für 5 min mit TBS/3% Tween 20, 5 min mit TBS/0,05 % Tween 20 und dreimal 10 min mit TBS.

Zur Entwicklung wurden ECL-Western blot-Detektionslösungen (Amersham Life science) gemischt und die Membran darin für 2 - 3 min geschwenkt. Hinter Klarsichtfolie wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Bedingungen zur Analyse des Einflusses von Dynamin auf das HIV-1 Entry mit CD4-exprimierenden, transdominant-negativen Dynamin-Zellen

Es standen HeLa-Zelllinien zur Verfügung, die durch Wegnahme von Tetrazyklin (Tet) regulierbar transdominant-negative Varianten von Dynamin-1 bzw. die Dynamin-1-Wildtyp (wt) -Form exprimieren. Um einen Versuchsaufbau zu erstellen, der den Einfluß von Dynamin auf den Zelleintritt von HIV-1 ermittelt, mußten verschiedene Bedingungen optimal eingestellt werden. Dynamin sollte mit hoher Effizienz in Dyn-ts-exprimierenden Zellen zum Zeitpunkt des Viruseintritts inaktiviert sein und es sollte die gleiche Anzahl an Zellen, bei denen Dynamin inhibiert war und Zellen der gleichen Linie, bei denen in Tet-Anwesenheit kein transdominant-negatives Dynamin exprimiert wurde parallel infiziert werden. Die sonstigen Infektions- und Replikationsbedingungen sollten bei beiden Ansätzen gleich sein, d.h. die Expression der Eintrittsrezeptoren sollte gleich sein und spätere Replikationsprozesse sollten durch die Dynamin-Mutante nicht beeinflusst werden bis die infizierten Zellen nach viraler Proteinexpression mit einem anti-Capsid-Antikörper gefärbt und gezählt wurden. Diese Zahl sollte sodann zwischen transdominant-negativem Dynamin exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen verglichen werden.

Zur Etablierung eines solchen Assays wurden die Voraussetzungen zur Infektion von transdominant-negatives Dynamin-exprimierenden Zellen mit HIV-1 geschaffen und die Versuchsbedingungen ausgetestet.

3.1.1 Etablierung einer stabil CD4-exprimierenden HeLa-Dynamin-Zellkultur

Um HeLa-Zelllinien, die Varianten der zellulären GTPase Dynamin exprimieren für die geplanten Untersuchungen produktiv mit HIV-1 infizieren zu können, müssen sie neben dem Ko-Rezeptor (HeLa-Zellen exprimieren natürlicherweise den CXCR4-Chemokinrezeptor) den Hauptrezeptor CD4 an der Oberfläche

aufweisen. Zu diesem Zweck wurden die Dyn-ts-, Dynamin-K44A- und Dynamin-wt-Zellen stabil mit dem CD4-Rezeptor-Gen transduziert.

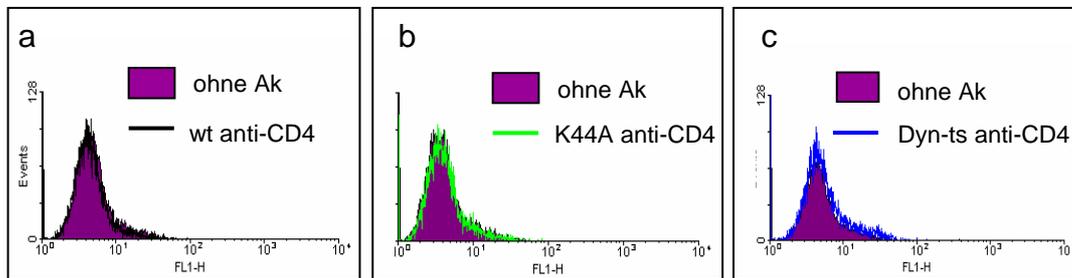


Abb. 3.1: CD4-FACS-Analyse der Dyn-wt (a), -K44A (b), und -ts Zellen (c) nach Transduktion mit dem CD4-Rezeptorgen. Y-Achse: Zellzahl; x-Achse: Fluoreszenz; violett gefüllt: ungefärbte Zellen

3.1.1.1 Transduktion mit CD4 und MACS-Selektion

Die Transduktion der Zelllinien wurde mittels eines retroviralen Vektors durchgeführt, der in der Verpackungszelllinie PA317 produziert wird. Dieser erlaubt die stabile Integration des gewünschten Gens ins Genom der Zielzelle. Der Vektor enthält das CD4-Gen flankiert vom LTR des murinen Leukämievirus und zusätzlich den Resistenzmarker Geneticin unter der Kontrolle des Promotors des Simian Virus 40. Da das Geneticin-Resistenzgen schon zur Selektion des Tet-Transaktivators in den Zelllinien vorhanden war, konnten die transduzierten CD4-positiven HeLa-Dynamin-Zellen nicht durch Behandlung mit dem Selektionsmedium selektioniert werden. Die drei Zelllinien wurden im FACS mit anti-CD4-Antikörpern analysiert (Abb. 3.1). Die Fluoreszenz zeigte nur bei Dyn-ts-Zellen einen sehr geringen Anstieg im Vergleich zu ungefärbten Zellen. Die Zahl an erfolgreich transduzierten Zellen war somit sehr gering und mußte aus diesem Grund angereichert werden. Hierzu wurde die MACS-Methode verwendet. Dazu wurden die Zellen mit magnetischen Kügelchen, die an CD4-Antikörpern gebunden sind inkubiert und über magnetische Säulen geschickt, die die CD4-positiven Zellen von den anderen Zellen trennten.

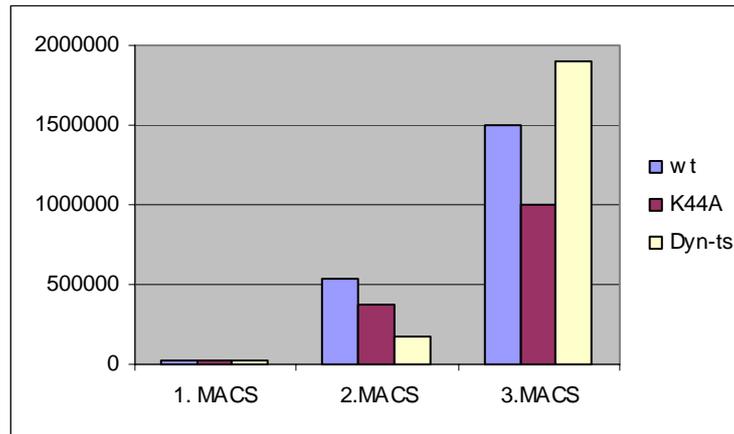


Abb. 3.2: Zahl der isolierten Zellen bei MACS-Selektion nach CD4-Transduktion. Input ca. 2×10^7 Zellen.

Bei der ersten Aufarbeitung wurden aus ca. 2×10^7 Zellen (eine 250cm^2 -Kulturflasche) pro Zelllinie, die für die CD4-Transduktion eingesetzt waren, mittels anti-CD4 MACS-Selektion ca. 1×10^4 bis 4×10^4 Zellen isoliert. Die angereicherten Zellen wurden anschließend auf die ursprüngliche Zellmenge expandiert und einer zweiten Runde einer MACS-Anreicherung unterzogen. Hierbei wurden ca. 2×10^5 bis 4×10^5 Zellen zurückgehalten. Wurden die dabei gewonnenen Zellen nach erneuter Expansion wiederum über anti-CD4 MACS-Säulen geschickt, wurden ca. 1×10^6 bis 2×10^6 Zellen zurückgehalten (Abb. 3.2). Dieser Anteil von ca. 5 bis 10% der eingesetzten Zellen änderte sich bei weiteren MACS-Runden nicht.

Die Zellen nach der zweiten und dritten Anreicherung wurden auf CD4-Expression im FACS analysiert (Abb. 3.3). Nach der zweiten Anreicherung waren im Fall der Dynamamin-wt-Zellen fast 90% der Zellen CD4-positiv, während es bei Dyn-ts-Zellen 75% und bei DynamaminK44A-Zellen 42% waren. Nach der dritten Anreicherung waren 80 bis 97% der Zellen CD4-positiv, wobei sowohl die Zahl erfolgreich transduzierter Zellen als auch die CD4-Expression im Falle der K44A-Zelllinie deutlich niedriger war als in den beiden anderen Zelllinien.

3.1.1.1.1 Dynamamin-Expression nach Transduktion

Die CD4-transduzierten Zellkulturen wurden daraufhin getestet, ob ihre Fähigkeit, die Dynamamin-Varianten regulierbar zu exprimieren, konstant

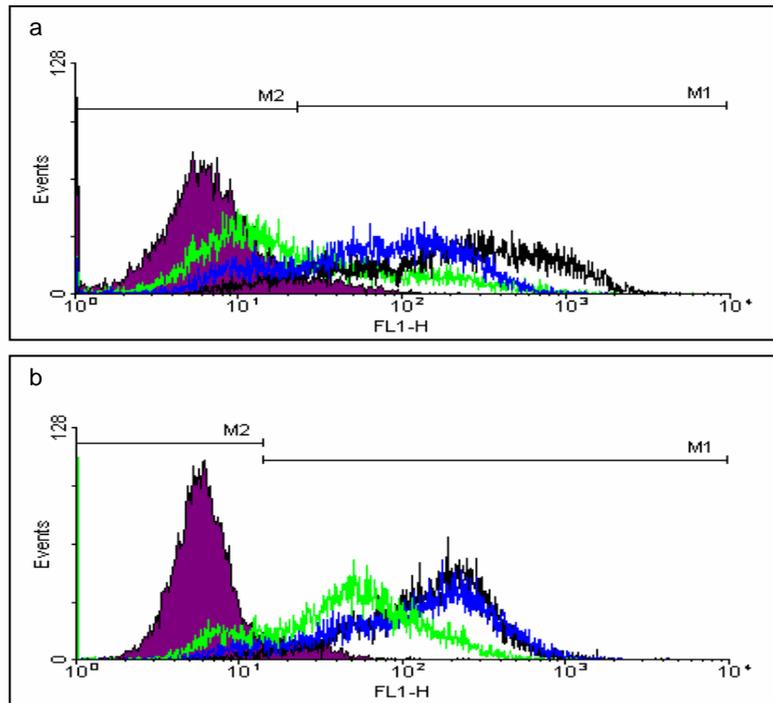


Abb. 3.3: CD4-FACS-Analyse der transduzierten Dynamin-Zellen, 12 Tage nach der zweiten (a) und 11 Tage nach der dritten Selektion durch MACS (b). M1: Fluoreszenzbereich über Hintergrundfluoreszenz; M2: Hintergrundfluoreszenzbereich von ungefärbten Zellen; Y-Achse: Zellzahl; x-Achse: Fluoreszenz

	% in M1 (a)	Mittlere Fluoreszenz (a)	% in M1 (b)	Mittlere Fluoreszenz (b)
Wt/CD4+ - Ak ■	6,84	4,09	9,78	24,62
K44A/CD4+ + Ak (grün)	41,79	86,96	80,34	61,02
Wt/CD4+ + Ak (schwarz)	89,85	237,08	97,67	143,53
Dyn-ts + Ak (blau)	75,88	105,5	92,94	131,41

Tabelle 3.1: statistische Auswertung der FACS-Analyse von Abb. 3.3

geblieben war. Hierzu wurden die zur Transduktion eingesetzten HeLa-Zelllinien und die transduzierten Zellen in 10cm-Schalen ausgesät und zwei Tage in Abwesenheit von Tet bei 37°C (die Dyn-ts-Zellen bei 32°C) gehalten. Zur Kontrolle der Tet-Regulation wurde ein Teil der Zellen in Anwesenheit von Tet behandelt. Die Zellysate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit einem anti-dynamamin-Antikörper analysiert (Abb. 3.4).

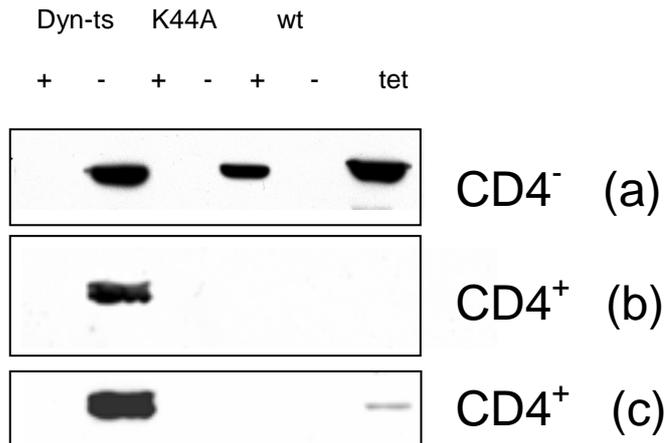


Abb. 3.4: SDS-PAGE und anti-dynamamin Immunoblot vor und nach der Transduktion mit CD4. Zellen wurden zwei Tage in An- oder Abwesenheit von Tet bei 37°C (K44A- und wt-Zellen) bzw. 32°C (Dyn-ts-Zellen) gehalten und das Zellysate im SDS-PAGE aufgetrennt. a und b sind abgeglichen nach Proteinmenge (bei wt ca. 2,5x mehr Gesamtprotein aufgetragen als Dyn-ts und K44A). c: längere Exposition von b.

In Anwesenheit von Tet wurde in keiner Zelllinie Dynamamin nachgewiesen. Die Menge an endogenem Dynamamin reichte für diese Detektionsmethode nicht aus und die Tet-kontrollierten Varianten wurden effizient blockiert. Im Gegensatz dazu wurden in Abwesenheit von Tet in allen drei CD4-negativen Dynamamin-Zelllinien große Mengen an Dynamamin produziert. Nach der Einbringung des CD4-Rezeptorgens war in Dynamamin-wt-Zellen nur nach langer Exposition des Immunoblots Dynamamin nachweisbar. Bei K44A/CD4⁺-Zellen wurden bei der auf die Transduktion folgenden Selektionierung vermehrt Zellen angereichert, die die Fähigkeit DynamaminK44A zu exprimieren verloren hatten, so daß es auf dem Immunoblot nicht mehr nachgewiesen wurde. Die Dyn-ts-Zellen zeigten dagegen durch die Selektionierung keine An- oder Abreicherung von Dyn-ts-exprimierenden Zellen, d.h. die Produktion von Dyn-ts war etwa genauso stark wie vor der Transduktion (Abb. 3.4) Zur Entwicklung eines Versuchsansatzes, mit dem es möglich ist, den Einfluß endocytotischer Prozesse der Zelle auf den

Eintritt von HIV-1 zu untersuchen, indem Dynamin effektiv inaktiviert wird, wurde somit die Massenkultur CD4-positiver Dyn-ts-Zellen weiter verwendet.

3.1.1.1.2 Kinetik der Dyn-ts-Translation und des -Abbaus

Bei der Analyse der Relevanz von Endozytose für den HIV-1-Eintritt in die Zelle sollte die Inhibition der Endozytose möglichst effizient sein und gezielt bei den frühen Infektionsprozessen (Viruseintritt, „uncoating“, Transport zum Zellkern) bestehen. Nach Abschluß der frühen Phase der Infektion sollte der wt-Phänotyp der Dynamin-abhängigen Prozesse in der Zelle wieder hergestellt werden, damit bei der Analyse keine verfälschten Ergebnisse durch Einflüsse des Dyn-ts´ auf spätere Replikationsprozesse (z.B. Genexpression, Golgi-Transport, Glykosylierung, Membrantransport, assembly, budding) erhalten werden. Um die Wirkung von Dyn-ts möglichst gezielt einzusetzen, wurde die Kinetik und Effizienz der Dyn-ts-Expression sowie der Dyn-ts-Degradation bestimmt.

3.1.1.1.2.1 Immunoblotanalyse

Dyn-ts-CD4⁺-Zellen wurden zwei bis drei Tage in Abwesenheit von Tet bei 32°C kultiviert, um zu bestimmen, wann die Dynamin-Expression maximal war. Anschließend wurde Tet zugegeben, um die Neusynthese zu hemmen und so die Abbaukinetik zu verfolgen (Abb. 3.5). Die Menge an Dyn-ts in den Zellen erhöhte sich vom zweiten zum dritten Expressionstag (Abb. 3.5 a). Nach der Zugabe von Tet am dritten Tag waren nach sechs Stunden bei 37°C noch etwa 70% der maximalen Dyn-ts-Menge vorhanden. Nach 25 Stunden reduzierte sich die Dyn-ts-Menge auf etwa 10% und nach 48 Stunden war auf dem Immunoblot auch bei langer Exponierung kein Dyn-ts mehr nachweisbar (Abb. 3.5 a). Wie in der grafischen Darstellung in Abb. 3.5 c ersichtlich ist, verlief der Abbau relativ linear. Nach 27 bis 30 Stunden war das gesamte überexprimierte Dyn-ts abgebaut. Durch den relativ schnellen Abbau von Dyn-ts waren mögliche Einflüsse auf die späteren Replikationsprozesse kaum zu erwarten.

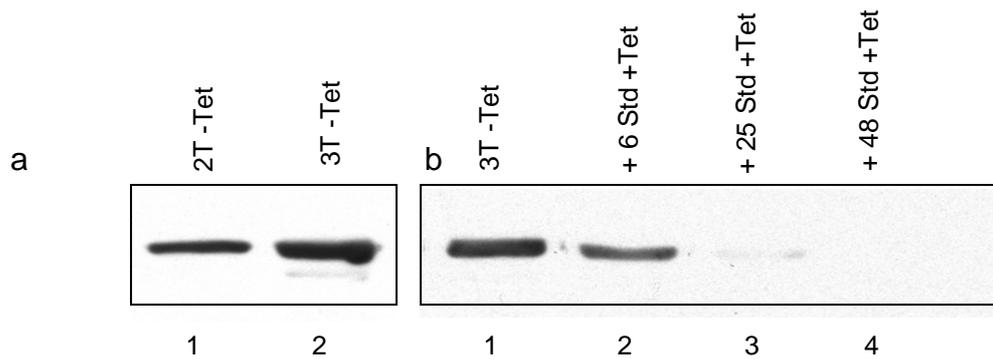


Abb. 3.5: Kinetik der Dyn-ts-Produktion in CD4-positiven Dyn-ts-Zellen. SDS-PAGE der Dyn-ts-CD4⁺-Zellysate und Immunoblot mit anti-HA. (a) Produktion von HA-markiertem Dyn-ts bei 32°C. Dyn-ts nach zwei (Spur 1) und drei Tagen (Spur 2) Expression bei 32°C in Abwesenheit von Tet. (b) Abbau von Dyn-ts bei 37°C. Dyn-ts nach drei Tagen in Abwesenheit von Tet bei 32°C (Spur 1), nach Zugabe von Tet und Inkubation bei 37°C für weitere sechs (Spur 2), 25 (Spur 3) und 48 Stunden (Spur 4). c: Quantifizierung des Dyn-ts-Abbaus aus b

3.1.1.1.2.2 Untersuchung der Endozytose-Hemmung durch fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die Immunoblotanalyse sagt nichts über die Funktionsfähigkeit des mutierten Proteins sowie über die Homogenität der Proteinexpression in der Zellpopulation aus. Zu diesem Zweck wurden fluoreszenzmikroskopische Analysen der Dyn-ts-Expression und Transferrin-Endozytose durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und die Expression von Dyn-ts induziert. Am dritten Tag nach Induktion wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert und fluoreszenz-markiertes Transferrin (Tfn-TX) in das Medium gegeben. Nach zwanzig Minuten wurden die Deckgläschen kurz in PBS gewaschen und die Zellen mit 3% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Expression von HA-markiertem Dyn-ts wurde durch Detektion mit einem monoklonalen Maus-Anti-HA-Antikörper und einem anti-Maus-FITC-Antikörper überprüft. Die Funktionsfähigkeit des Dyn-ts, bei der nicht-permissiven

Temperatur Clathrin-abhängige Endozytose zu blockieren, wurde durch das fluoreszierende Transferrin sichtbar gemacht, das exklusiv auf diesem Weg in Zellen aufgenommen wird. In Abb. 3.6 ist zu sehen, daß fast alle Zellen, die stark Dyn-ts exprimierten, nach einer Stunde bei 37°C kein Transferrin in Endosomen aufgenommen hatten und dadurch eine schwache, homogene Rotfärbung aufwiesen (Pfeile), während Dyn-ts-negative Zellen eine punktuelle Färbung mit Transferrin-TX zeigten, die dessen Aufnahme in Endosomen nachwies (Sternchen).

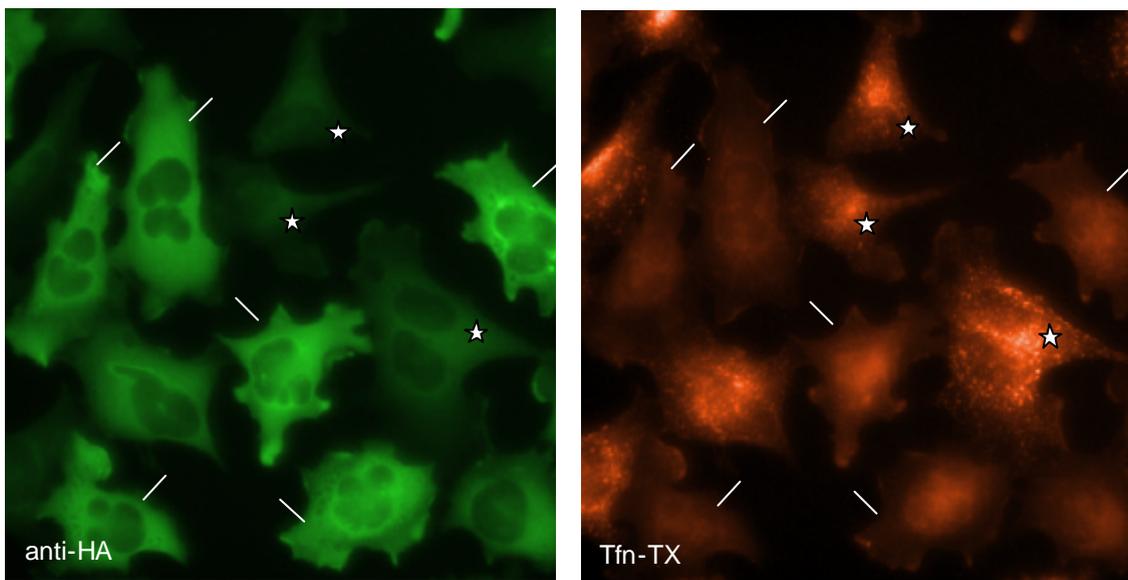


Abb. 3.6: Immunfluoreszenz von Dyn-ts/CD4⁺-Zellen, nach zwei Tagen Induktion bei 32°C in Abwesenheit von Tet, nach einer Stunde bei 37°C, wobei nach 40 min TexasRed markiertes Transferrin zu den Zellen gegeben wurde (a) Nachweis von HA-markiertem Dyn-ts mit Maus-anti-HA und anti-Maus-FITC (b) Transferrin-Texas Red. Zellen, die kein Dyn-ts exprimieren, nehmen Transferrin in die Endosomen auf (Sternchen). Bei dem Großteil der Zellen, die Dyn-ts exprimieren, wurde kein Transferrin aufgenommen (Pfeile)

Die Population war bezüglich der Produktion von Dyn-ts nicht homogen. Eine statistische Auszählung von Dyn-ts exprimierenden Zellen, sowie der Zellen, die nach einer Stunde Inkubation bei 37°C kein Transferrin aufnahmen zeigte, daß nur 66% der Zellpopulation Dyn-ts exprimierten. Von diesen Zellen waren nur 79% fähig, die Clathrin-abhängige Endozytose zu blockieren (Abb. 3.7). Dies entsprach 52% Endozytose-gehemmten Zellen der Gesamtpopulation. Die Effizienz des Endozytoseblocks sollte jedoch möglichst hoch sein, um einen messbaren Effekt auf den Zelleintritt von HIV-1-Partikeln auszuüben. Aus

diesem Grund wurden verschiedene Wege zur Verbesserung der Effizienz getestet.

Für die ursprüngliche Zelllinie Dyn-ts wurde eine nicht-permissive Temperatur von 38°C ermittelt. Um auszuschließen, daß die Aktivierung bei 37°C die Effizienz der Endozytose-Inhibition beeinträchtigt, wurde die Aufnahme von Transferrin bei 37°C und 38°C gemessen. Außerdem wurde die Auswirkung einer längeren Inkubation bei der nicht-permissiven Temperatur getestet. In Abb. 3.8 wird gezeigt, daß die Aufnahme von Transferrin nach einer Stunde bei

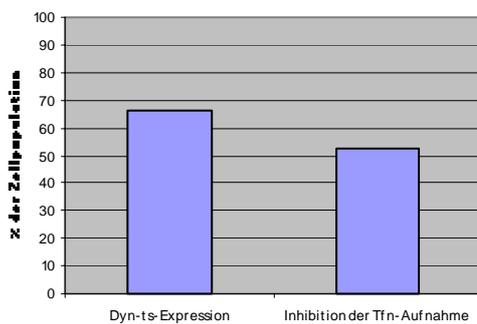


Abb. 3.7: Quantifizierung der Dyn-ts-Expression und der Endozytose-Inhibition bei 37°C bei Dyn-ts/CD4⁺-Zellen. Zellen wurden wie in Abb. 3.6 behandelt und Dyn-ts-exprimierende und Endozytose-inhibierte Zellen gezählt.

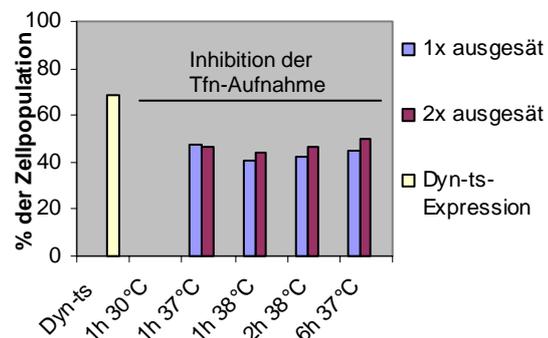


Abb. 3.8: Vergleich der Endozytose-Inhibition bei 30°C, 37°C und 38°C, bei verlängerter Inkubation bei der nicht-permissiven Temperatur und bei erneuter Ablösung und Aussäen während der Expressionsphase. Dyn-ts-Zellen wurden zwei Tage zur Dyn-Expression gebracht und die Fähigkeit der Zellpopulation die Transferrinaufnahme zu hemmen analysiert. Ein Teil wurde am zweiten Tag von der Platte gelöst und neu ausgesät (violett)

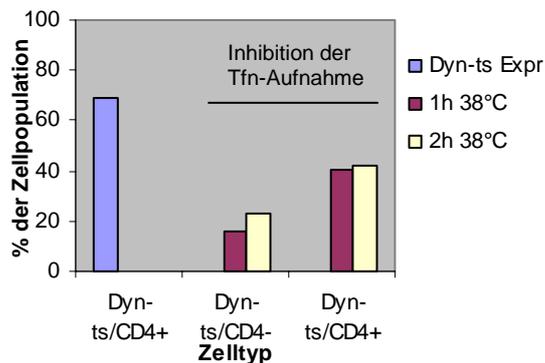


Abb. 3.9: Vergleich der Effektivität des Endozytose-Blocks vor und nach CD4-Transduktion

37°C sogar etwas stärker gehemmt wurde als bei 38°C. Durch eine zweistündige Präinkubation bei 38°C wurde nur eine leichte Steigerung der Inhibition erreicht. Die Inhibition des Transferrin-Aufnahme blieb über 6 Stunden

stabil (bei 37°C), stieg jedoch auch dann nicht über 50% der Zellen, obwohl die Zahl der Dyn-ts exprimierenden Zellen bei 65 bis 70% lag. Die gleichen Werte wurden gemessen, wenn die Zellen am Vortag der Analyse von der Platte abgelöst und neu ausgesät wurden, wie es der Fall wäre, wenn die Zellen während der Expressionsphase durch MACS selektioniert worden wären. Die Kontrolle bei der permissiven Temperatur von 30°C zeigte keine Inhibition der Transferrinaufnahme (Abb. 3.8).

Um zu testen, ob die Fähigkeit der Zellen zur Expression und Aktivierung von Dyn-ts durch die CD4-Transduktion beeinträchtigt wurde, wurden die Dyn-ts/CD4⁻ Zellen direkt mit den Dyn-ts/CD4⁺ Zellen verglichen. Abb. 3.9 zeigt, daß die transduzierten Zellen im Vergleich zur Ursprungszelllinie keine Verminderung des Endozytoseblocks sondern eher eine Steigerung der Effizienz erfahren hatten. Die Transduktion war somit nicht die Ursache für die geringe Endozytose-Hemmung von 40 bis 50%.

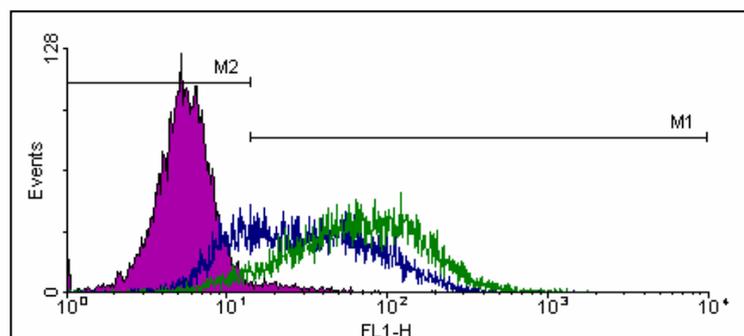


Abb. 3.10: CD4-Analyse von transduzierten Dyn-ts/CD4⁺-Zellen. Zellen wurden eine Woche (grün) bzw. drei Wochen (blau) nach der letzten MACS-Selektion analysiert. violett gefüllt: ungefärbte Zellen; M1: Fluoreszenzbereich über Hintergrundfluoreszenz; M2: Hintergrundfluoreszenzbereich von ungefärbten Zellen; Y-Achse: Zellzahl; x-Achse: Fluoreszenz

3.1.1.1.3 Stabilität der CD4-Expression in CD4-positiven Dyn-ts-Zellen

Im FACS wurde die Stabilität der CD4-Expression auf Dyn-ts/CD4⁺-Zellen untersucht, da die Infektionen zur Untersuchung der Relevanz von endocytotischen Prozessen beim Eintritt von HIV-1 zur statistischen

	% in M1	Mittlere Fluoreszenz
Eine Woche nach MACS Analyse ohne anti-CD4	3,31	22,76
Eine Woche nach MACS Anti-CD4 (grün)	93,12	74,69
Drei Wochen nach MACS Anti-CD4 (blau)	75,15	45,88

Tabelle 3.2: statistische Auswertung der CD4-FACS-Analyse von transduzierten Dyn-ts/CD4+-Zellen (Abb. 3.10)

Auswertung mehrmals wiederholt werden und die Dyn-ts Zellen somit stabile Bedingungen bieten sollten. Die Zellen wurden eine und drei Wochen nach der letzten MACS-Isolierung im FACS analysiert. Hier zeigte sich, daß drei Wochen nach der Selektion nur noch 75% der Zellen hohe CD4-Expression aufwiesen, während es nach einer Woche noch über 90% waren. Zudem nahm die mittlere Fluoreszenzintensität um 40% ab (Abb. 3.10, Tabelle 3.2). Um eine einheitliche Population zu bekommen, hätten daher die Zellen während der Expressionsphase einer MACS-Selektion unterzogen werden müssen oder es müßte ein Klon isoliert werden, der stabile CD4-Expression zeigt.

3.1.1.2 Herstellung und Charakterisierung von klonalen CD4-positiven Zelllinien

Da die Massenkultur an transduzierten Dyn-ts-Zellen weder eine stabile CD4-Expression noch eine starke, homogene Inhibition der Endozytose für die geplante Infektions-Analyse zeigte, wurden die Zellen für eine FACS-Einzelzellsortierung anhand der CD4-Expression vorbereitet mit dem Ziel, klonale Zelllinien aus Einzelzellen herzustellen. Klonale Zelllinien haben den Vorteil, daß die Eigenschaften der Population durch die Zellexpansion aus einer Einzelzelle weitgehend homogen sind, während sich in der Massenkultur aus transduzierten und MACS-selektionierten Dyn-ts-Zellen neben CD4-positiven Zellen auch immer eine Population an CD4-negativen Zellen befand.

CD4-positive Dyn-ts Massenkultur-Zellen wurden durch anti-CD4-MACS-Behandlung selektiert und mit anti-CD4-FITC gefärbt. In Zusammenarbeit mit Dr. Blanche Schwappach vom Zentrum für molekulare Biologie (ZMBH) in Heidelberg wurden die Zellen durch den FACS-Sorter nach starker, mittlerer und geringer CD4-Expression einzeln in 96-well-Platten sortiert, wo sie zu Kolonien auswuchsen. Es wurden 864 Zellen in 9 Platten ausgesät und es wuchsen 11 einzelne Zellen im Laufe von 2 Wochen zu Kolonien aus.

3.1.1.2.1 CD4-Expression

Die Zelllinien wurden durch FACS-Analyse auf CD4-Expression getestet. Bei allen Linien waren über 95% der Zellpopulation CD4-positiv. Die klonalen Zelllinien 4D9, 5C9, 5G8 zeigten etwa gleichstarke CD4-Expression wie die ursprüngliche Massenkultur an CD4-positiven Dyn-ts-Zellen. Die Zelllinie 1E11, bei dem die Isolierungsparameter des Sorters auf höhere CD4-Expression eingestellt war, zeigte eine mehr als doppelt so hohe CD4-Expression (Abb. 3.11, Tabelle 3.3). Die CD4-Expression der klonalen Linien blieb ohne zwischenzeitliche MACS-Selektion mehr als 2 Monate lang erhalten.

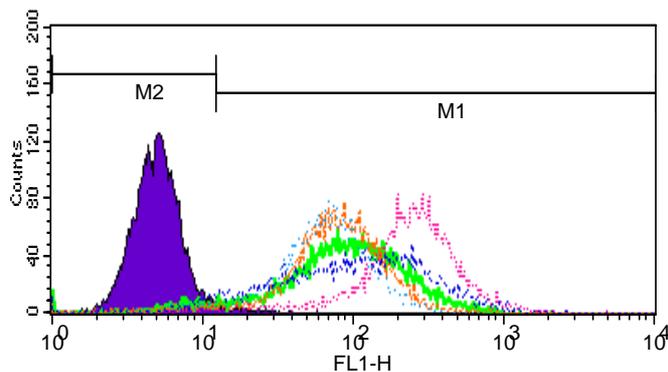


Abb. 3.11: CD4-FACS-Analyse von Dyn-ts/CD4+-Zellen und isolierten klonalen Zelllinien. M1: Fluoreszenzbereich über Hintergrundfluoreszenz; M2: Hintergrundfluoreszenzbereich von ungefärbten Zellen; Y-Achse: Zellzahl; x-Achse: Fluoreszenz

	% in M1	Mittlere Fluoreszenz
Dyn-ts/CD4+ - AK (gefüllt)	1,2	27
Dyn-ts/CD4+ + anti-CD4	94,8	125
1E11 + anti-CD4	97,7	287
4D9 + anti-CD4	95,7	78
5C9 + anti-CD4	97,1	96
5G8 + anti-CD4	95,6	165

Tabelle 3.3: statistische Auswertung der FACS-Analyse von Abb. 3.11

3.1.1.2.2 Dyn-ts-Expression

Zur Messung der Effizienz der Dyn-ts Produktion wurden die Zellen auf Glasplättchen ausgesät, in Abwesenheit von Tet zwei Tage zur Dyn-ts-Expression induziert, Dyn-ts-HA mit anti-HA in den Zellen gefärbt und die positiven Zellen unterm Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (Abb. 3.12). Im Fall der klonalen Linien 1E11, 4D9, 5C9 und 5G8 waren mit 90% bis 96% ein großer Teil der Zellen Dyn-ts positiv. Im Fall der Linie 5C5 waren 87% und der Linien 3C4, 3D5, 4D6 und 5C7 waren zu 70% bis 80% der Zellen nach Induktion positiv für Dyn-ts-HA. Die klonale Zelllinie 4D9 erwies sich sowohl bei Dyn-ts-Expression als auch, wenn diese unterdrückt war als widerstandsfähig gegen Ablösung von der Unterlage durch mehrere Waschschriffe. Da dies einen wichtigen Faktor für die geplanten Vergleiche darstellt, wurden 4D9-Zellen somit gegenüber der stärker CD4-positiven Linie 1E11 bevorzugt.

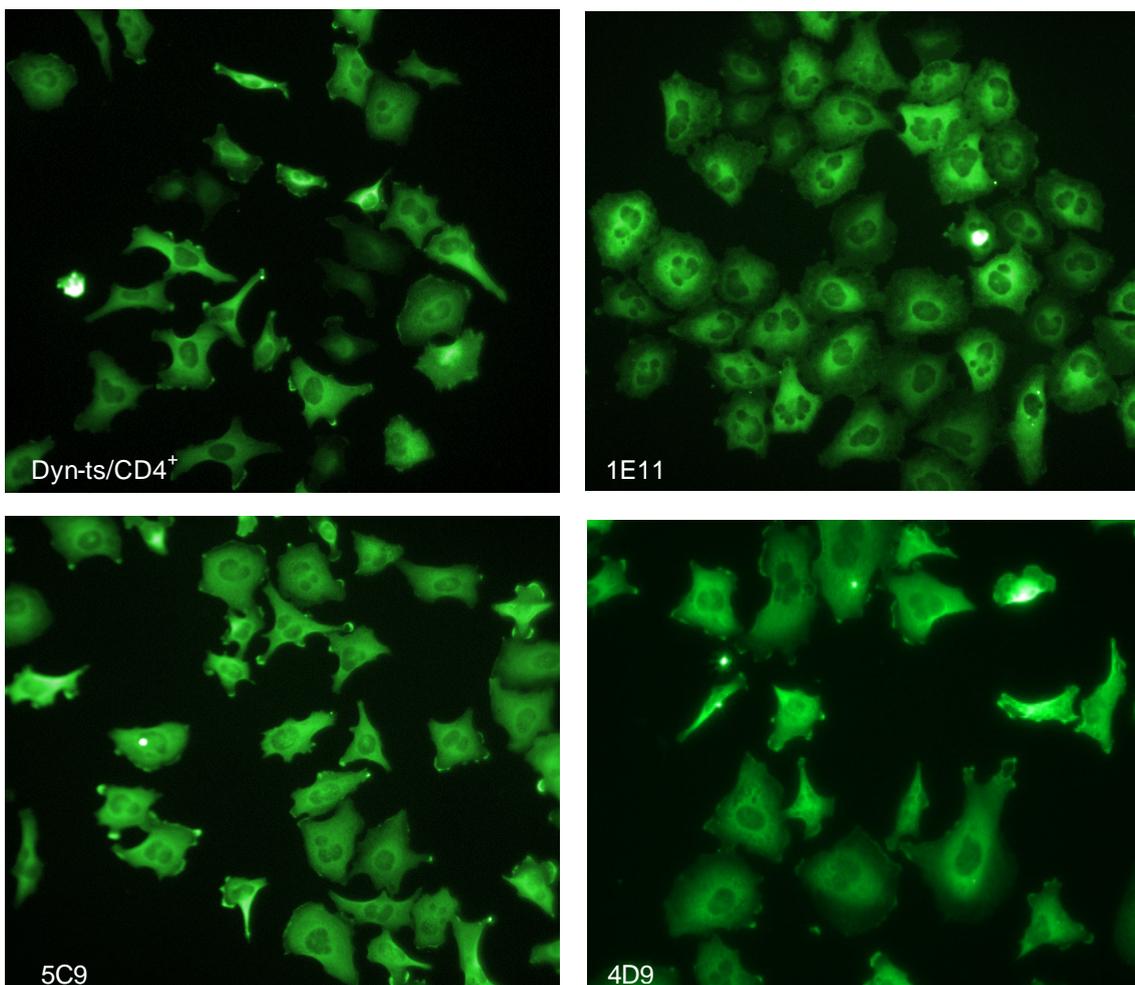


Abb. 3. 12: Dyn-ts-HA-Expression bei Dyn-ts/CD4⁺-Zellen und isolierten klonalen

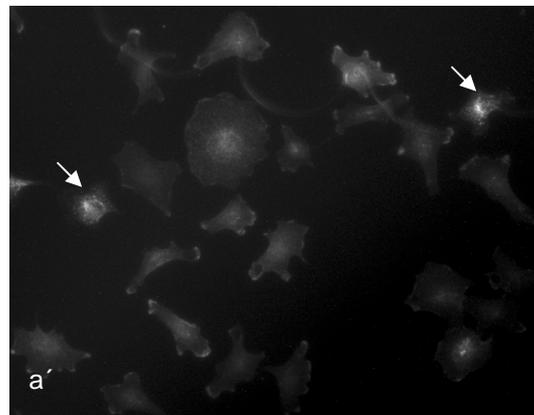
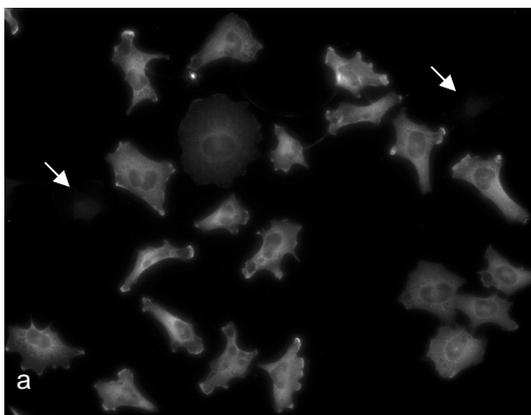
Zelllinien. Immunfluoreszenzfärbung mit anti-HA zwei Tage nach Induktion der Dyn-ts-Expression.

3.1.1.2.3 Analyse der Dyn-ts-Translations- und Abbaukinetik in 4D9-Zellen

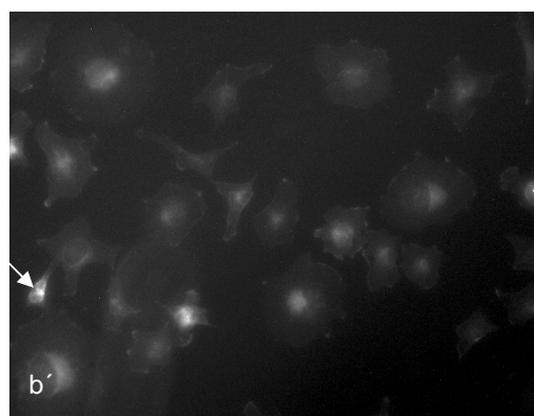
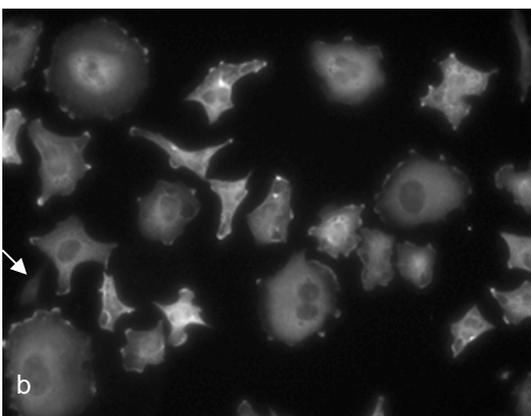
Für die Zelllinie 4D9 wurde die Effizienz des Endozytoseblocks in Abhängigkeit von der Dauer der Dyn-ts Expression und von der Dyn-ts-Degradation nach erneuter Zugabe von Tet ermittelt. Die Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät, am nächsten Tag Tet abgewaschen und Dyn-ts bei 32°C zur Expression gebracht. Zur Analyse wurden die Zellen zur Induktion des transdominant-negativen Phänotyps für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert und die Tfn-Aufnahme durch zwanzigminütige Zugabe von Tfn-TX und anschließender Fixierung sichtbar gemacht sowie Dyn-ts mit anti-HA-Antikörpern gefärbt. In Abb. 3.13 a und b ist die Expression von Dyn-ts-HA nach zwei bzw. drei Tagen Induktion gezeigt, in Abb. 3.13 a' und b' die Transferrin-Aufnahme. Einzelne Zellen zeigten keine Expression von Dyn-ts (Pfeile). Dieser Anteil verringerte

Anti-HA

Tfn-TX



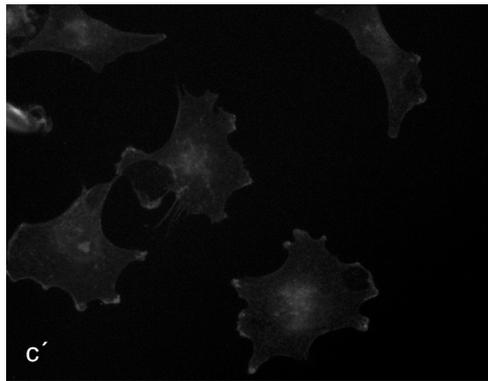
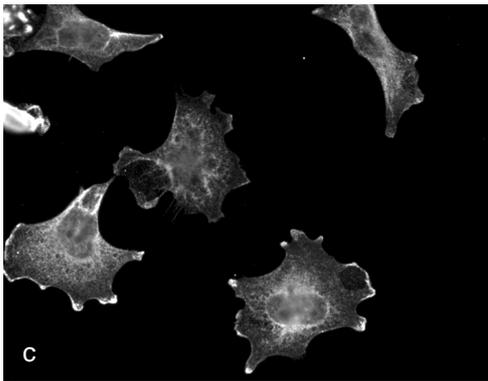
2 Tage
-Tet



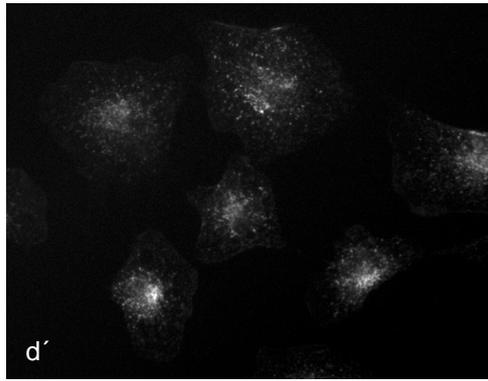
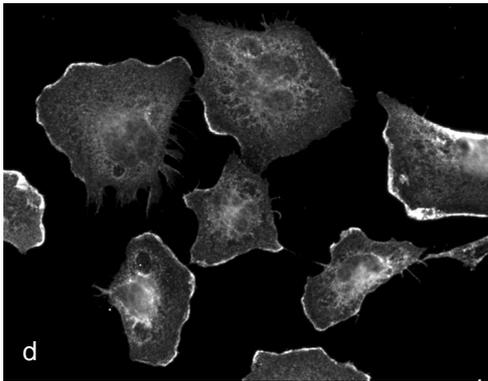
3 Tage
-Tet

Anti-Ha

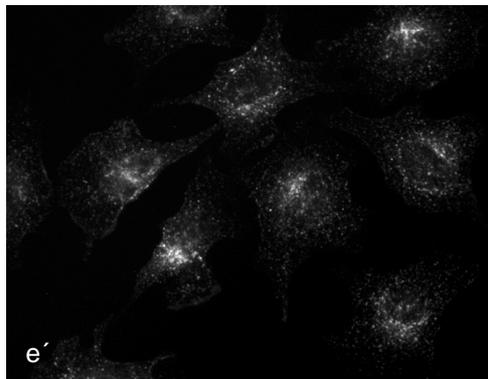
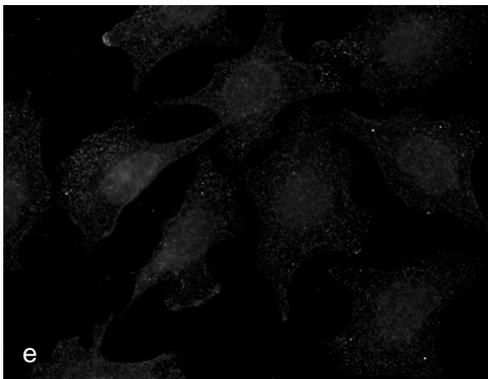
Tfn-TX



-Tet
1,5 Std 37°C



-Tet
1,5 Std 37°C +
1,5 Std 30°C

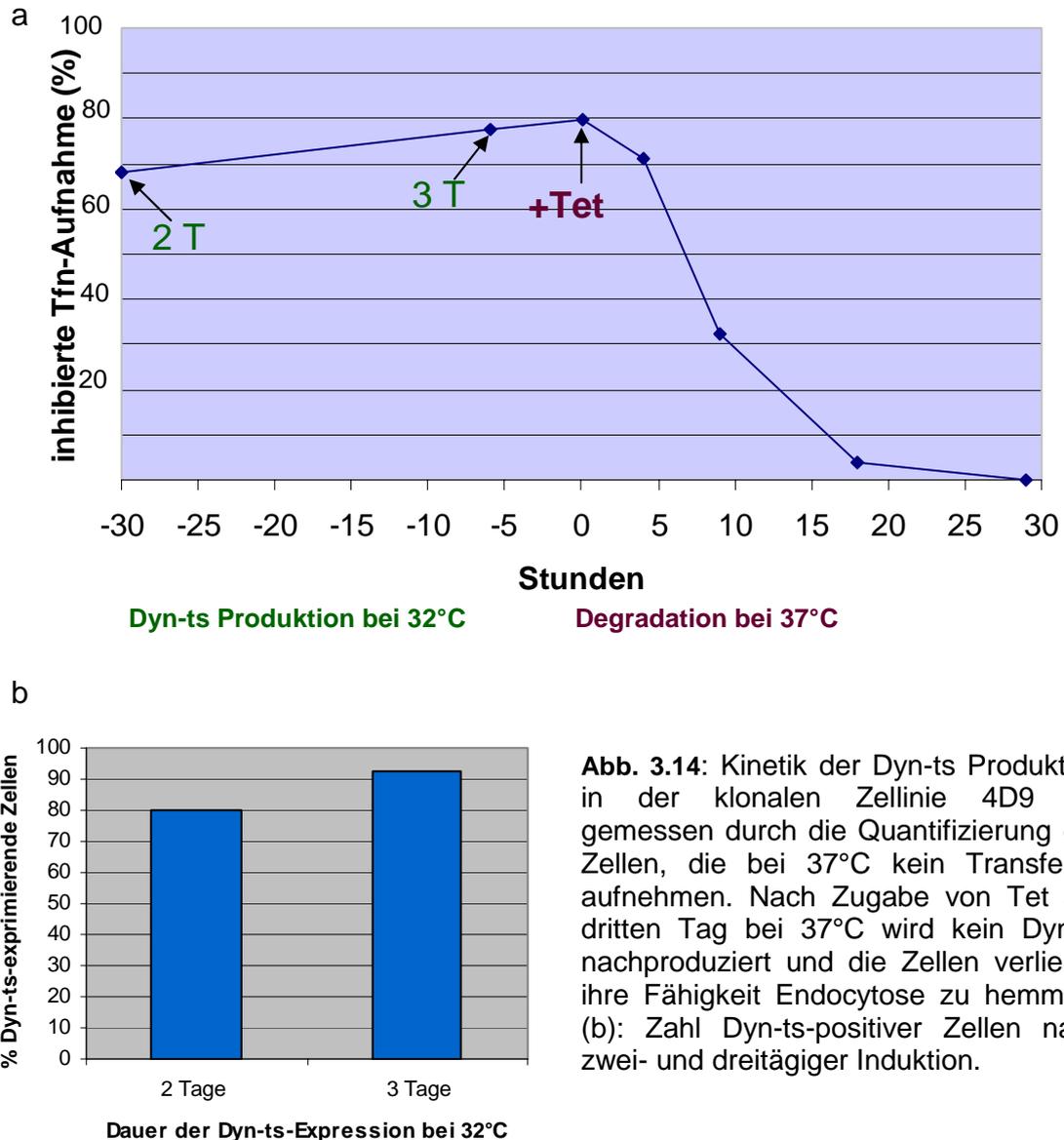


+Tet
1,5 Std 37°C

Abb. 3.13: Dyn-ts-Expression und Transferrin-Aufnahme in 4D9-Zellen unter verschiedenen Temperatur- und Tet-Bedingungen. 4D9-Zellen wurden für zwei Tage (a und a'), bzw. drei Tage (b-d und b'-d') ohne Tet oder unter kontrollierter Zugabe von Tet (e und e') bei 32°C kultiviert. Dann wurden die Zellen zur Ausprägung des transdominant-negativen Phänotyps für 1,5 Stunden bei 37°C gehalten. In Abb. 3.d und d' wurden die Zellen anschließend bei der permissiven Temperatur inkubiert und schließlich die Tfn-Aufnahme (a' - e') und die Dyn-ts-Expression (a - e) analysiert

sich vom zweiten zum dritten Tag (Abb. 3.13 a und b; Abb. 3.14). In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen für 1,5 Stunden bei 37°C und anschließend 1,5 Stunden bei 30°C – der permissiven Temperatur - inkubiert. Diese zeigten trotz starker Dyn-ts-Expression (Abb. 3.13 d) keine Inhibition der Tfn-Aufnahme

(Abb. 3.13 d'). 4D9-Zellen, die die ganze Zeit über in Anwesenheit von Tet behandelt wurden und deshalb kein Dyn-ts exprimierten (Abb. 3.13 e) nahmen auch bei 37°C Transferrin normal auf (Abb. 3.13 e').



Die Zellen wurden darüber hinaus weiterhin bei 37°C inkubiert, wie es beim geplanten Infektionsversuch der Fall sein soll und nach sechs Stunden Tet zugegeben, um die Produktion des Proteins zu stoppen. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Aufnahme von Transferrin untersucht. In Abb. 3.14 ist gezeigt, daß zwei Tage nach Dyn-ts-Expression die Clathrin-abhängige Endozytose bei 37°C bei knapp 70% der Zellen inhibiert war. Nach 3 Tagen Expression erhöhte sich diese Zahl auf fast 80% (Abb. 3.13 b und 3.14). Während der

sechsstündigen Phase bei 37°C blieb diese Zahl konstant und sank nach Zugabe von Tet relativ schnell ab. Nach etwa sieben Stunden war nur noch bei 50% der Zellen die Clathrin-abhängige Endozytose effektiv gehemmt und nach 20 Stunden reichte bei keiner Zelle die Menge an Dyn-ts zur Hemmung aus. Die Tfn-Aufnahme wurde wie in der Massenkultur nicht in allen Dyn-ts-exprimierenden Zellen gehemmt (Abb. 3.14 a und b) sondern in ca. 85%. Trotzdem bedeutete dies im Bezug auf die gesamte Population eine viel effizientere Endozytosehemmung als in der Massenkultur aus CD4-positiven Dyn-ts-Zellen. Somit bot diese Zelllinie für die geplanten Untersuchungen sehr gute Voraussetzungen.

3.1.1.2.4 Expression von CD4 und CXCR4 auf 4D9-Zellen nach Dyn-ts-Induktion

Da der Einfluß des nicht-funktionellen Dynamins auf den Zelleintritt getestet werden sollte, mußte sichergestellt werden, daß die Expression und Aktivierung des Dyn-ts keinen negativen Einfluß auf die Verteilung der Eintrittsrezeptoren für HIV-1, nämlich CD4 und CXCR4 auf der Zelloberfläche hatte. Dazu wurden 4D9-Zellen ausgesät und in einem Ansatz in Abwesenheit von Tet zur Expression von Dyn-ts gebracht, während ein zweiter Ansatz in Anwesenheit von Tet unter den gleichen Bedingungen behandelt wurde. Nach drei Tagen wurden die Proben für 1,5 Stunden bzw. 5 Stunden bei 37°C zur Etablierung des Endozytose-defizienten Phänotyps oder 1,5 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und mit FITC-markierten anti-CD4- oder einem PE-markierten anti-CXCR4-Antikörpern gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen. Die Expression von CD4 und CXCR4 zeigte zwischen Dyn-ts-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen keinen signifikanten Unterschied. (Abb. 3.15) Dies war unabhängig davon, ob die Endozytose-Hemmung ausgeprägt war (Abb. 3.15 b und b') und über einige Stunden bestand (Abb. 3.15 c und c'), oder ob sie bei der permissiven Temperatur unterdrückt wurde (Abb. 3.15 a und a'). Die Infektion mit HIV-1 würde somit unter den Bedingungen des sre-Assays nicht durch die Rezeptorendichte beeinflusst werden.

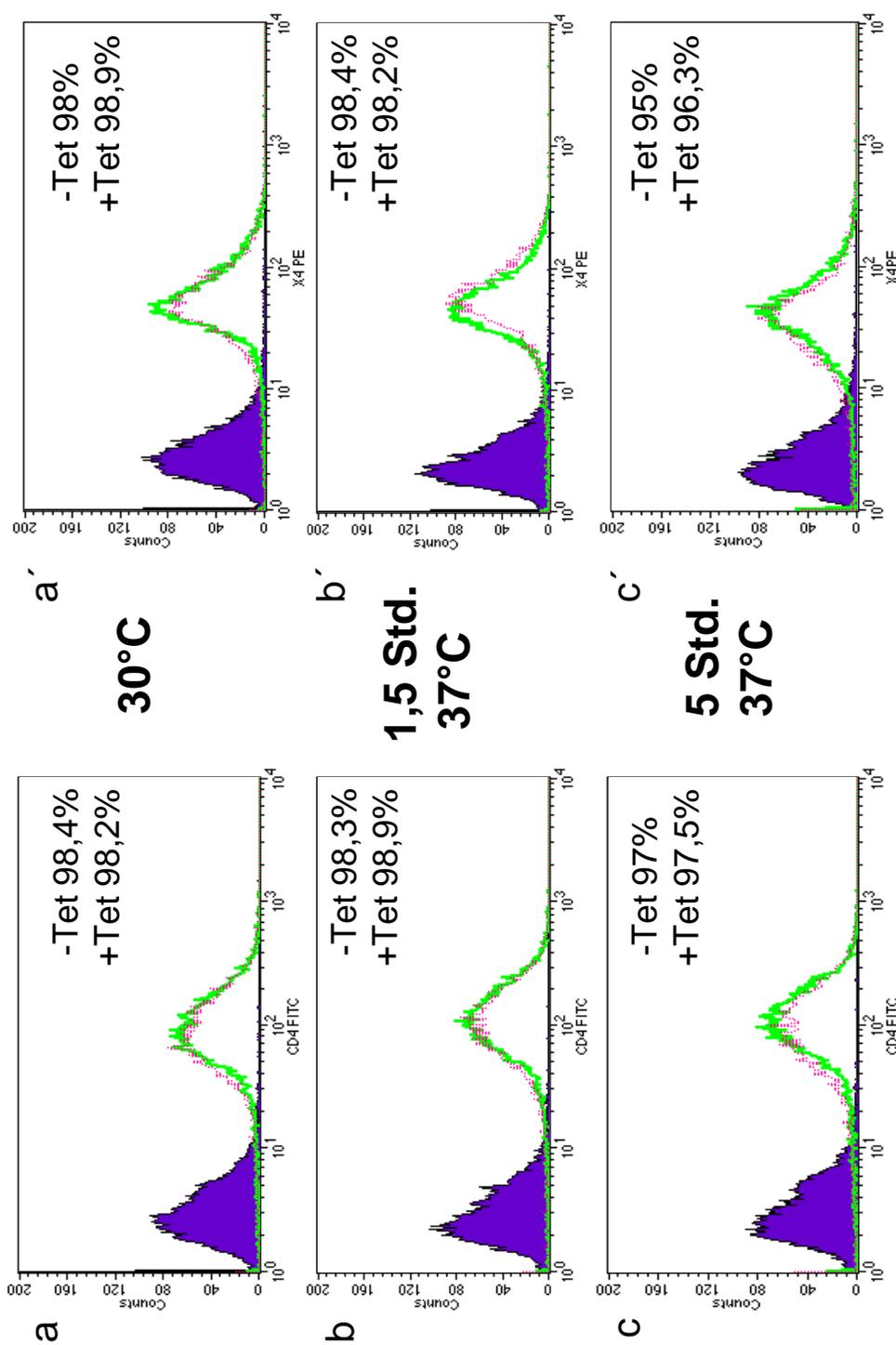


Abb.3.15: CD4- und CXCR4-Rezeptorverteilung auf 4D9-Zellen vor und nach Ausbildung der Endocytosehemmung. 4D9-Zellen werden 3 Tage in An- und Abwesenheit von Tet bei 32°C inkubiert und am dritten Tag 1,5 Stunden bei 30°C, bei 37°C oder 5 Stunden bei 37°C inkubiert bevor sie fixiert und mit anti-CD4-FITC und anti-CXCR4-PE gefärbt werden. Negativkontrolle ungefärbt bzw. Isotyp-PE. Prozentangaben: positive Zellen; rote, gestrichelte Linie: -Tet; grüne Linie: +Tet

3.1.2 Virusherstellung zur Infektion: HIV-1_{NL4-3}, HIV-1_{MVP8161}, HIV-1_{SF2}

Für die Infektionsversuche wurden infektiöses HI-Virus Typ 1 benötigt. Es wurden die Virusisolate HIV-1_{NL4-3}, HIV-1_{SF2} und HIV-1_{MPV8161} ausgewählt, die von MT-4-Zellen - eine mit dem humanen T-Lymphoma Virus transformierte T-Zelllinie - durch ein im Labor etabliertes Verfahren hochtitrig und in großer Menge gewonnen werden können. HIV-1_{NL4-3} stammt von einem proviralen Klon eines etablierten Laborstammes, der weltweit am häufigsten eingesetzt wird. HIV-1_{SF2} (Subtyp B) wurde in der Vergangenheit bei Untersuchungen zur pH-abhängigen Aufnahme verwendet. HIV-1_{MPV8161} gehört zur Gruppe der O-Typ Viren, die phylogenetisch deutlich weiter entfernt sind und das daher Aussagen über die generelle Nutzung endocytotischer Mechanismen zum Viruseintritt erlauben sollte.

Zunächst wurden HeLaP4-Zellen mit proviralen Plasmiden von HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{SF2} transfiziert und die Überstände der Zellen nach 2 bis 3 Tagen filtriert und für die Infektion von C8166-Zellen benutzt. Zur Vermehrung von HIV-1_{MPV8161} wurde virushaltiger Zellüberstand direkt auf C8166-Zellen gegeben. Diese T-Zelllinie bildet bei Infektion mit HIV-1 große Syncytien und eignet sich somit gut, das Virus leicht überprüfbar über zwei bis drei Passagen stark zu vermehren. Der virushaltige Überstand wurde wiederum durch Filtrieren von Zellen getrennt und auf MT-4 Zellen gegeben. Die MT-4-Zellen wurden bei einer Dichte von 5×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ /ml kultiviert. Zur Ernte von hochtitrigem Virus mußte die Infektion der Zellen synchronisiert werden. Eine mit HIV-1 infizierte MT-4-Zelle verkürzt nach einigen Stunden die zahlreichen Zellfortsätze und rundet sich schließlich ganz ab. Im späteren Stadium löst sich der Zusammenhalt zwischen den Zellen und die Zellaggregate lösen sich in Einzelzellen auf. Zum Zeitpunkt des Einziehens der Zellfortsätze beginnen die Zellen große Mengen an Viruspartikel freizusetzen. Dies ist der optimale Zeitpunkt um durch Vermischen von einem Teil infizierter Zellen mit vier Teilen uninfizierter Zellen eine neue, synchrone Infektion zu beginnen. Der optimale Zeitpunkt zur Ernte von infektiösem Virus aus dem Überstand geht etwa mit dem Zeitpunkt des Abrundens der Zellen einher. Dieser Zeitpunkt wurde abhängig vom Virusisolat nach unterschiedlichen Zeiten erreicht: etwa nach 19 bis 25 Stunden für HIV-1_{NL4-3}, nach 30 bis 36 Stunden für HIV-1_{SF2}, nach 40 bis

45 Stunden für HIV-1_{MPV8161}. Der Überstand der Zellen wurde durch 45µm-Filter filtriert, zur Vermeidung von pH-Wertverschiebungen während des Einfrierens auf 10mM HEPES pH 7,4 eingestellt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Die Viren wurden auf C8166-Zellen und auf 4D9-Zellen titriert. Für HIV-1_{NL4-3} wurde auf C8166-Zellen 1×10^6 bis $1,8 \times 10^7$ infektiöse Einheiten pro Milliliter (IE/ml) und auf 4D9-Zellen $6,4 \times 10^4$ IE/ml gemessen. Der Titer von HIV-1_{SF2} betrug auf C8166-Zellen $5,6 \times 10^4$ IE/ml und auf 4D9-Zellen 36 bis 90 IE/ml. Für HIV-1_{SF2} Virionen war beobachtet worden, daß das Oberflächenglykoprotein gp120 zum großen Teil löslich vorliegt und nur wenige der Moleküle Virusgebunden sind (McKeating *et al.*, 1991). Dieser als „shedding“ bezeichnete Verlust von gp120 bewirkt die erheblich geringere Infektiösität des Virus relativ zu anderen Isolaten.

3.1.3 Einfluß von Tet auf die Infektiösität

In den Infektionsexperimenten sollte die Kultivierung teilweise in Gegenwart von Tet stattfinden, deswegen wurde untersucht, ob Tet die HIV-1 Infektion beeinflusst. Das Virus wurde in An- und Abwesenheit von Tet titriert. Hierzu wurde HIV-1_{NL4-3} für sechs Stunden auf HeLaP4-Zellen gegeben und anschließend abgewaschen. Die viralen Proteine wurden für zwei Tage bei 37°C exprimiert und die Zahl infizierter Zellen bestimmt. Tet zeigte nur einen geringen Einfluß auf die Infektionseffizienz (Abb. 3.16) Um jedoch jede Verfälschung auszuschließen, wurden beim geplanten sre-Assay während der Virusinkubationsphase alle Proben ohne Tet behandelt.

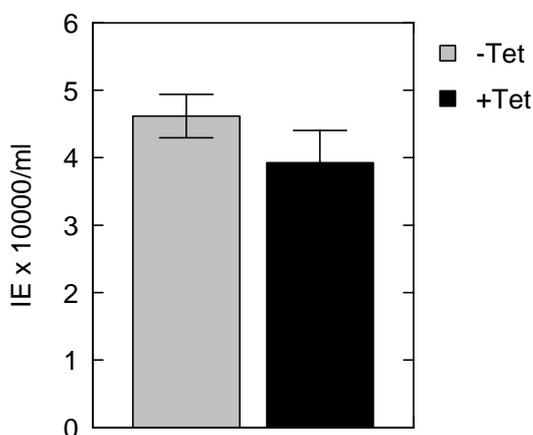


Abb. 3.16: Einfluß von Tet auf die Infektiösität von HIV-1_{NL4-3}. In drei unabhängigen Experimenten wurde der Virustiter von HIV-1_{NL4-3} in An- oder Abwesenheit von Tet auf HeLaP4-Zellen gemessen.

3.2 Sre-Assay zur Bestimmung der Rolle von Dynamin beim Eintritt von HIV-1_{NL4-3}

3.2.1 Analyse von Virusprotein-exprimierenden Zellen

3.2.1.1 Versuchsaufbau des Sre-Assay

Aufgrund der in Abschnitt 3.1.1.2.1 bis 3.1.3 dargestellten Vorversuche wurde zur Untersuchung des Einflusses von Dyn-ts auf den Eintritt von HIV-1 folgender Versuchsaufbau gewählt: (Abb. 3.17) Am ersten Tag wurden 4D9-Zellen in 10-cm-Schalen in Anwesenheit von Tet ausgesät und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hälfte der Platten dreimal mit warmen PBS gewaschen und Medium ohne Tet zugesetzt. Bei der anderen Hälfte wurde das Medium gewechselt und wieder Tet zugesetzt. Alle Platten wurden bei 32°C inkubiert. Damit die Dyn-ts-exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen am Infektionstag zur optimalen Vergleichbarkeit möglichst in der gleichen Dichte vorlagen und nicht durch vorhergehende Waschschriffe unterschiedliche Konfluenz aufwiesen, wurden die Zellen nach 24 Stunden getrennt mit Trypsin abgelöst, gezählt und mit bzw. ohne Tet zu $1,1 \times 10^4$ /Well in 500µl/Well in 48-Well Platten ausgesät, wo sie weitere zwei Tage bei 32°C wuchsen. Ein Teil der Zellen wurde zur Dokumentation der Inhibition der Tfn-Aufnahme am Infektionstag mit bzw. ohne Tet auf Glasplättchen ausgesät und wie die zur Infektion bestimmten Zellen behandelt. Am Infektionstag wurde die Konfluenz der Dyn-ts-exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen verglichen und das Medium von den Zellen gesaugt und durch 150µl Medium ohne Tet ersetzt. Die Zellen wurden in der Präinkubationsphase 1,5 Stunden zur Ausbildung des transdominant-negativen Phänotyps bei 37°C präinkubiert. Das Virus wurde ebenfalls auf 37°C erwärmt und die Zellen zur Erhaltung der Temperatur auf 37°C-Heizblöcken in der Sterilbank schnell mit einer multiplicity of infection (MOI) von 0,01 bis 0,02 in 100µl/Well infiziert und wieder in den Brutschrank gestellt. Bei dieser Virusverdünnung ergaben sich gut vereinzelte und zählbare infizierte Einheiten.

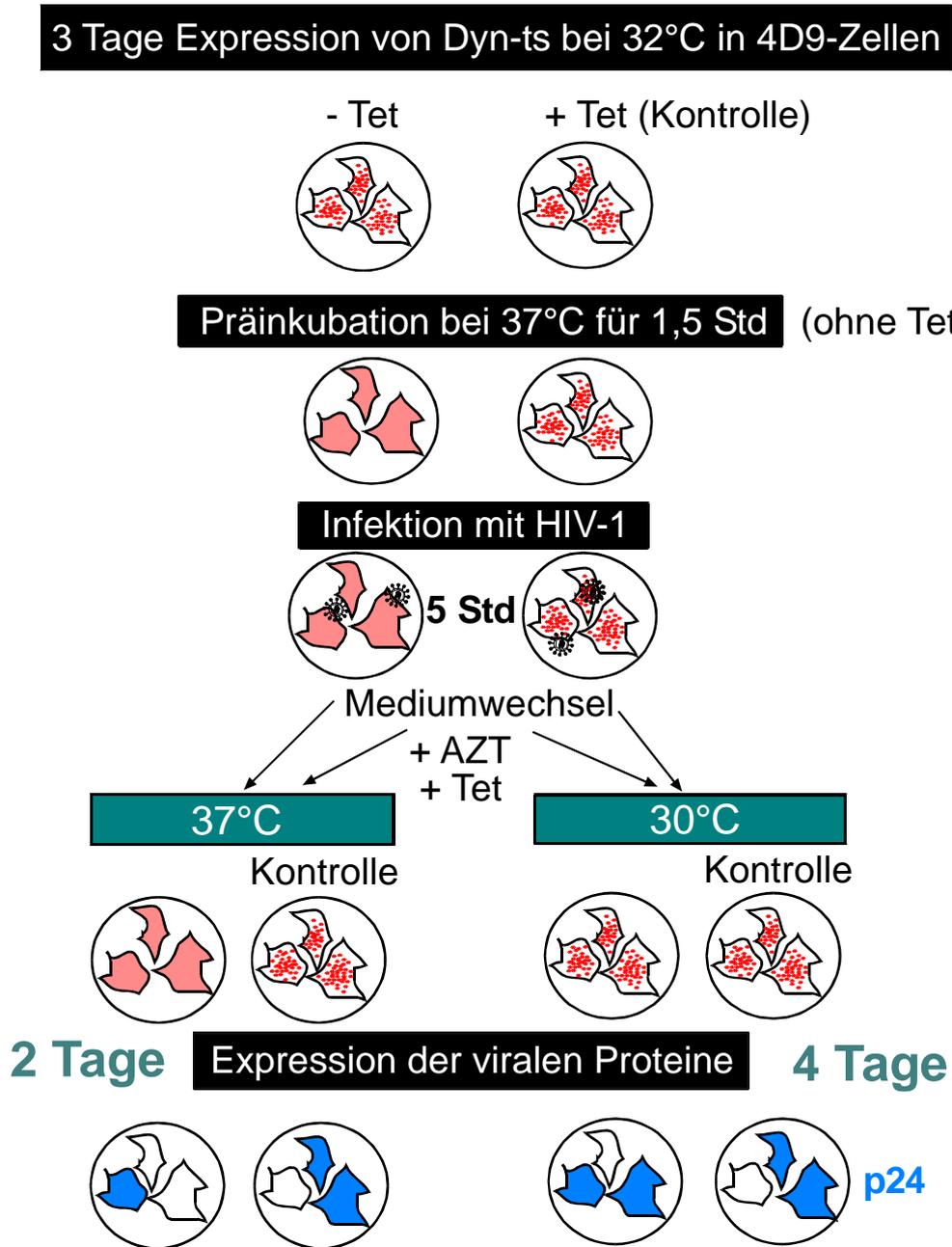


Abb. 3.17: Schematische Darstellung der single round entry (sre)-Methode zur Untersuchung des Einflusses von Dyn-ts auf den Eintritt von HIV-1 in die Zelle. : Endozytose ungehindert; : Endozytose inhibiert; : Expression von p24 (HIV-1-Capsidprotein)

Jeweils drei gleiche Ansätze mit Dyn-ts exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen wurden auf derselben Platte kultiviert.

Nach etwa fünf Stunden wurde durch Mediumwechsel der virushaltige Überstand von den Zellen entfernt und Medium mit Tet und 10µM des Reverse Transkriptase-Inhibitors Azidothymidin (AZT) zu allen Zellen zugegeben. AZT verhindert die Virusverbreitung auf weitere Zellen sowie die nachträgliche Infektion bei geänderter Temperatur. Zum Nachweis der viralen Proteine wurde die Hälfte eines Ansatzes zwei Tage lang bei 37°C inkubiert. In Anwesenheit von Tet wurde Dyn-ts innerhalb von 20 bis 30 Stunden vollständig abgebaut und übte dann keinen Einfluß mehr aus (Abb. 3.5c und 3.13). Um die Wirkung von Dyn-ts direkt nach der Viruseintrittsphase auszuschalten, wurde die andere Hälfte des Ansatzes bei 30°C weiterinkubiert, wobei der wt-Phänotyp des Proteins innerhalb von 1,5 Stunden wieder hergestellt war (Abb. 3.13 d'). In diesem Fall wurden die Zellen nach 4 Tagen fixiert und gefärbt und schließlich infizierte Zellen bei Dyn-ts-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde überprüft, ob die Zellkonfluenz bei Dyn-ts-exprimierenden und –nicht-exprimierenden Zellen etwa gleich war.

3.2.1.2 Einfluß von Dyn-ts auf die HIV-1_{NL4-3} Infektion

Das Ergebnis eines sre-Assays zur Bestimmung des Einflusses von Dynamamin auf die HIV-Replikation ist in Abb. 3.18 gezeigt. Wurden die Zellen nach Infektion ohne Hemmung der Endozytose (+Tet) für zwei Tage bei 37°C inkubiert, fanden sich ca. 160 infizierte Zellen pro Well (Balken 2). Diese Zahl war bei Induktion des transdominant-negativen Phänotyps um ca. die Hälfte reduziert (Balken 1). Das gleiche Ergebnis wurde gefunden, wenn der

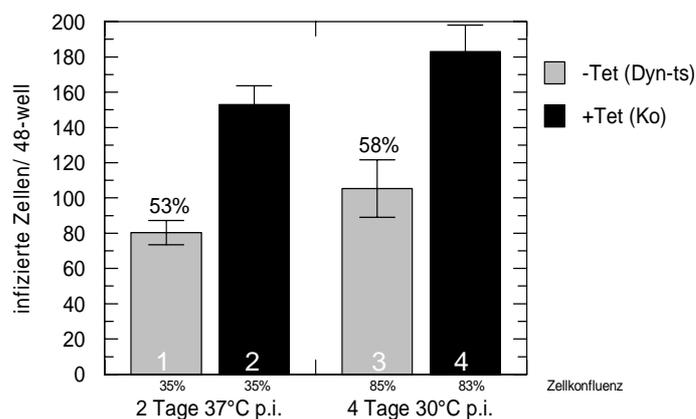


Abb. 3.18: Infektion von Dyn-ts-Zellen für 6 Stunden bei 37°C mit HIV-1_{NL4-3}. grau: Dyn-ts-Expression induziert, schwarz: keine Dyn-ts-Expression. Virale Proteinexpression bei 37°C für zwei Tage (1, 2) bzw. bei 30°C für 4 Tage (3, 4). Unten: durchschnittl. Zellkonfluenz bei der Ernte. Die Inhibition der Tfn-Aufnahme betrug 84% (Kontrolle (Ko)= 0%)

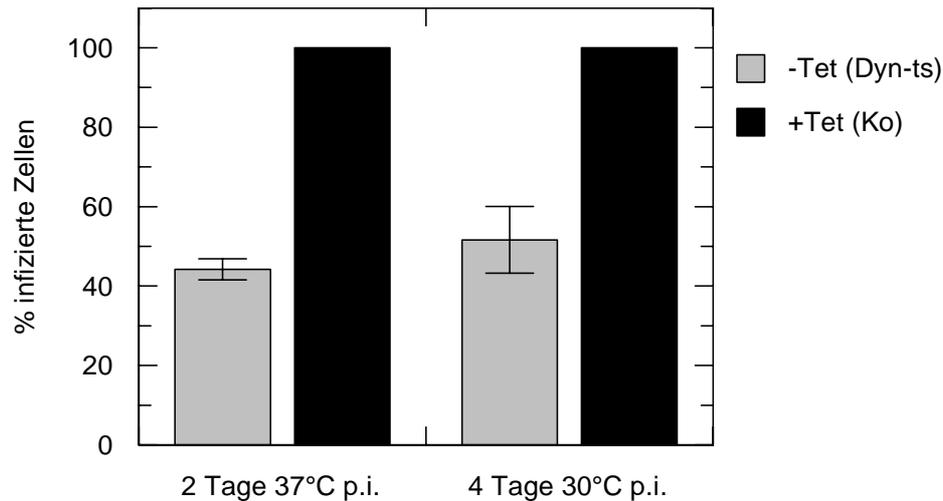


Abb 3.19: Zusammenfassung von sieben (37°C p.i.) bzw. vier (30°C p.i.) unabhängigen sre-Versuchen von HIV-1_{NL4-3}. Der prozentuale Anteil infizierter Zellen in Dyn-ts-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen wurde aus allen Versuchen gemittelt. Transferrin-Aufnahme war bei 70% bis 85% der Zellen inhibiert (Ko 0%).

transdominant-negative Phänotyp durch Temperaturänderung unmittelbar nach Viruseintritt abgeschaltet wurde (Balken 3 und 4). Dieses Ergebnis wurde in insgesamt sieben unabhängigen Experimenten mit 37°C Inkubation p.i. und in vier Versuchen mit 30°C p.i., bei denen jeweils zwei unterschiedliche MOIs eingesetzt wurden, reproduziert (Abb. 3.19).

Um zu testen, ob die Inhibition auch bei kürzerer Virusinkubation stattfindet und somit noch präziser dem Viruseintritt zuzuschreiben ist, wurde das Virus parallel zur bisherigen fünfstündigen Inkubation nach zwei Stunden abgewaschen und die Zellen noch drei Stunden entweder bei 30°C oder 37°C gehalten. Dann erst wurde Tet und AZT zugegeben, da sonst die reverse Transkription des in den ersten zwei Stunden eingedrungenen Virus' gehemmt werden könnte. Nach zwei Tagen Proteinexpression bei 37°C wurden die infizierten Zellen gezählt. Nach fünf Stunden Virusinkubation waren bei zwei unabhängigen Experimenten nur wenig mehr Zellen infiziert als nach zwei Stunden bei durchgehenden 37°C Temperaturbedingungen (Abb. 3.20). Wurden die Zellen nach zwei Stunden bis zur Zugabe von AZT bei 30°C gehalten, so wurden um 75 bis 80% weniger Zellen produktiv infiziert. Die Infektion verlief bei dieser Temperatur langsamer und somit hatten weniger Partikel den AZT-sensitiven Schritt bei AZT-Zugabe abgeschlossen. Die Hemmung der Endozytose durch Dyn-ts war auch bei diesen Bedingungen ähnlich wie bei fünf Stunden Virusinkubation.

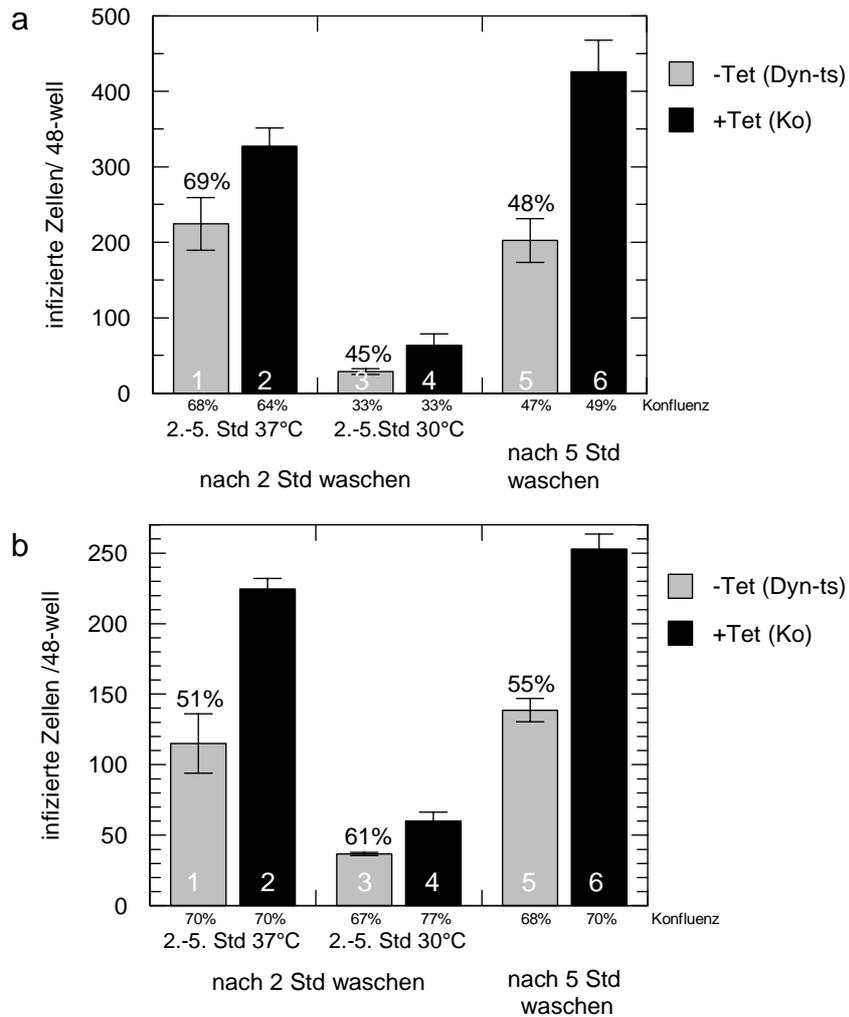


Abb. 3.20 : In zwei unabhängigen sre-Versuchen (a und b) mit HIV-1_{NL4-3} wurde das Virus nach fünf (Balken 5 und 6) oder nach zwei Stunden (Balken 1 bis 4) Inkubation bei 37°C abgewaschen. Die Zwei-Stunden-Ansätze wurden bei 30°C (Balken 3 und 4) oder 37°C (Balken 1 und 2) weiterinkubiert. Nach fünf Stunden wurde AZT und Tet zugesetzt und alle Ansätze zwei weitere Tage bei 37°C inkubiert.

3.2.1.3 Einfluß der Inhibition der Endosomenansäuerung auf die Infektion von HIV-1_{NL4-3}

Viren, die bei Eintritt in die Zielzelle von Endozytose abhängig sind, benötigen im allgemeinen die sauren pH-Bedingungen in den Endosomen, um die Glykoproteine zur Fusion mit der Wirtsmembran zu aktivieren. Da die Inaktivierung des Clathrin-abhängige Endozytose vermittelnden Proteins Dynamin sich negativ auf die Infektion von HIV-1_{NL4-3} auswirkt, sollte getestet werden, ob die Hemmung der Ansäuerung der Endosomen in der 4D9-Zelllinie entgegen bisherigen Ergebnissen einen Einfluß auf die Infektion durch HIV-1_{NL4-}

3 hat. Dazu wurde während der Präinkubationsphase und der Virusinkubation 10mM Ammoniumchlorid zum Medium zugesetzt. Ammoniumchlorid ist eine milde Base, für die gezeigt wurde, daß sie die Infektion von pH-abhängigen Viren wie VSV verhindern kann. Zur Kontrolle wurden HIV-1_{NL4-3} Partikel im Experiment eingesetzt, deren Hüllproteine durch die Glykoproteine von VSV ersetzt wurden. Deren Infektiosität sank in Anwesenheit von Ammoniumchlorid auf null. Die Infektiosität von HIV-1_{NL4-3} wurde dagegen durch Ammoniumchlorid um 30 bis 100% gesteigert (Abb. 3.21). Die Infektionsinhibition durch Dyn-ts blieb auch unter diesen Bedingungen bestehen. Durch diese Versuche wurde bestätigt, daß HIV-1_{NL4-3} nicht abhängig von saurem pH ist, jedoch zum Teil von funktionellem Dynamin.

Die Infektion von VSV-G pseudotypisierten Partikeln wurde durch die Expression von Dyn-ts reproduzierbar um ca. 30% bis 50% erhöht.

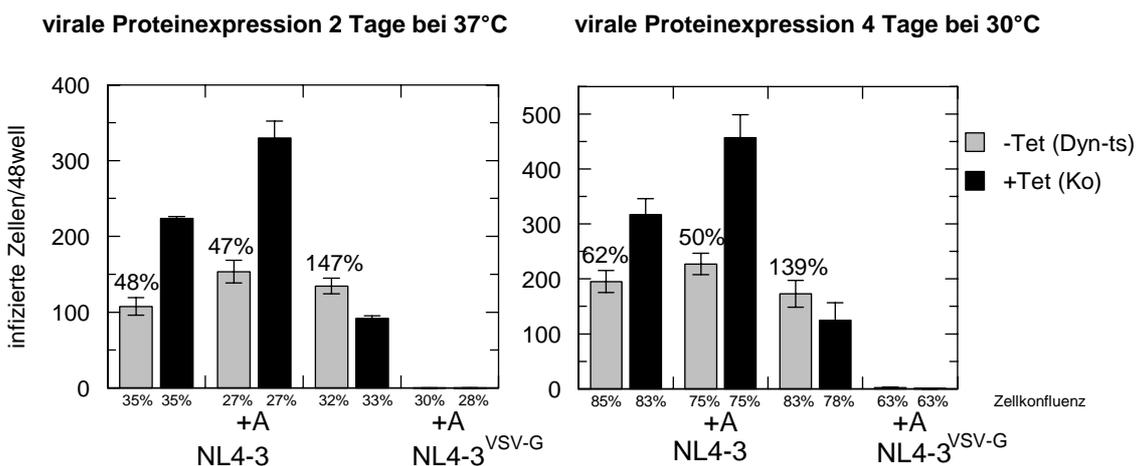


Abb. 3.21: Auswirkung der Hemmung der Ansäuerung von Endosomen durch Ammoniumchlorid (+A) auf HIV-1 Infektion. Zellen wurden bei der Präinkubation bei 37°C und während der Infektion in An- oder Abwesenheit von Ammoniumchlorid gehalten. (a) Proteinexpression 2 Tage bei 37°C (b) 4 Tage bei 30°C nach Virusinkubation. Die Tfn-Aufnahme bei Dyn-ts-exprimierenden Zellen war nach der Präinkubationsphase bei 84% der Zellen (ohne Ammoniumchlorid) bzw. bei 87% (mit Ammoniumchlorid) (und bei 0% bei Kontrollzellen) gehemmt.

3.2.1.4 Einfluß von Dyn-ts auf Infektion durch HIV-1_{SF2} und HIV-1_{MVP8161}

Die Dynamin-Abhängigkeit des Zelleintritts der Virusisolate HIV-1_{SF2} und HIV-1_{MVP8161} sollte in dem gleichen Assay getestet werden. Für HIV-1_{SF2} war

gezeigt, daß es bei Aufnahme durch einen vesikulären Mechanismus stärker infektiös wird, während der Virustiter von HIV-1_{NL4-3} gesenkt wird. Auch zeigte HIV-1_{SF2} bei Inhibition der Endosomenazidifizierung eine Infektionsreduktion (Fackler und Peterlin, 2000) und ließ damit vermuten, daß es im Vergleich zu HIV-1_{NL4-3} den Zelleintritt durch Endozytose stärker nutzt. Abb. 3.22 zeigt, daß die Zahl der infizierten Zellen durch Dyn-ts-Expression auch im Fall von HIV-1_{SF2} in zwei exemplarischen Experimenten auf 35 bis 60% gesenkt wurde. Die Hemmung der Endosomenansäuerung durch Zugabe von Ammoniumchlorid bewirkte keine Hemmung der HIV-1_{SF2} Infektion. Vielmehr wurde der Virustiter durch Ammoniumchlorid ähnlich wie bei HIV-1_{NL4-3} auf etwa das Doppelte angehoben.

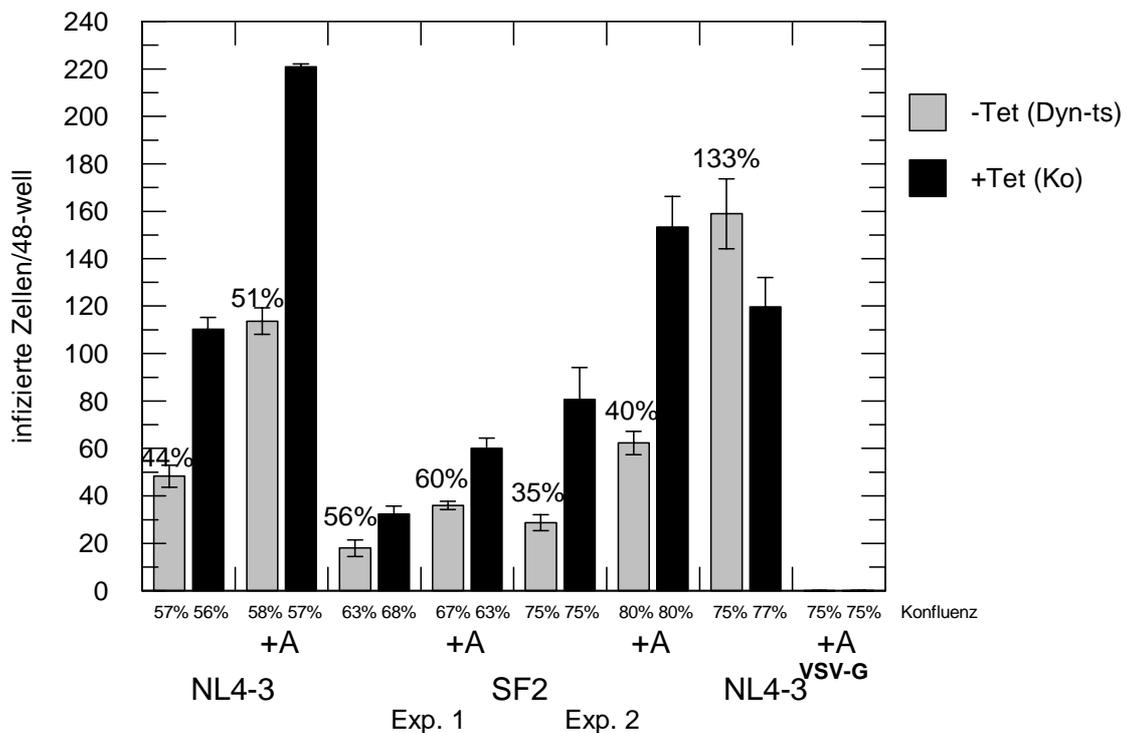


Abb. 3.22: Vergleich der Hemmung durch Dyn-ts und des Einflusses von Ammoniumchlorid auf Infektion durch HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{SF2}. NL4-3^{vsv-G} wurde wie in Abb. 21 zur Kontrolle eingesetzt. 4D9-Zellen wurden fünf Stunden bei 37°C mit dem Virus inkubiert, virale Proteinexpression erfolgte zwei Tage bei 37°C. Hemmung der Tfn-Aufnahme bestand bei 65% (Exp. 1) bzw. 84% (Exp. 2) der Zellen (Ko 0%).

Das Gruppe-O-Virusisolat HIV-1_{MVP8161} wurde im sre-Assay getestet, da es phylogenetisch von den bisher untersuchten HIV-1 Isolaten weiter entfernt ist und dazu dienen sollte, Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Nutzung Dynamin-vermittelter Endozytose unter den Virustypen zu untersuchen. Die

Expression von Dyn-ts bewirkte mit 84% weniger infizierten Zellen als in der Kontrolle eine sehr starke Inhibition der produktiven Infektion (Abb. 3.23).

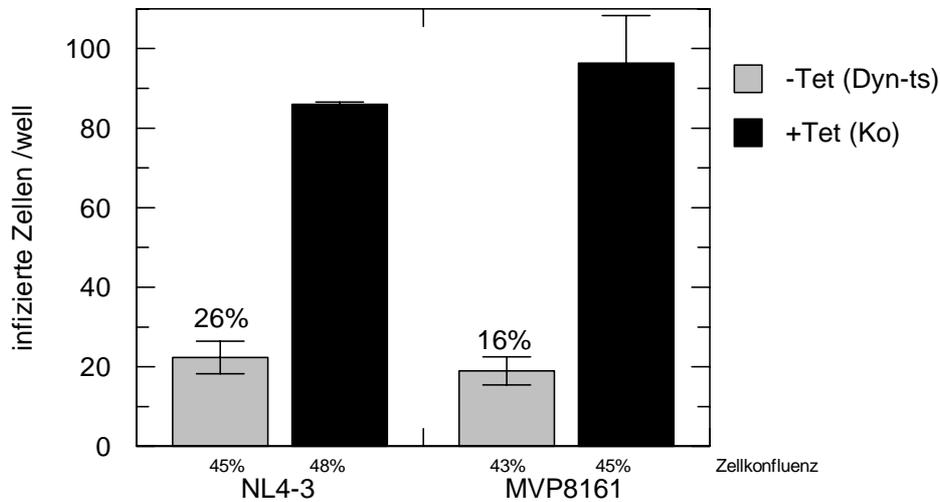


Abb. 3.23: sre 19: Infektion von 4D9-Zellen mit HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{MVP8161} bei 37°C. Die virale Proteinexpression erfolgte für zwei Tage bei 37°C. Inhibition der Tfn-Aufnahme betrug bei – Tet 76%.

3.2.1.5 Infektion von Dyn-ts-exprimierenden Zellen bei der permissiven Temperatur

Zur Kontrolle der Spezifität der Inhibition durch Dyn-ts wurde der Infektionsversuch parallel bei 30°C während der Prä- und der Virusinkubation durchgeführt. Bei dieser Temperatur besitzt die temperatursensitive Dynamini-

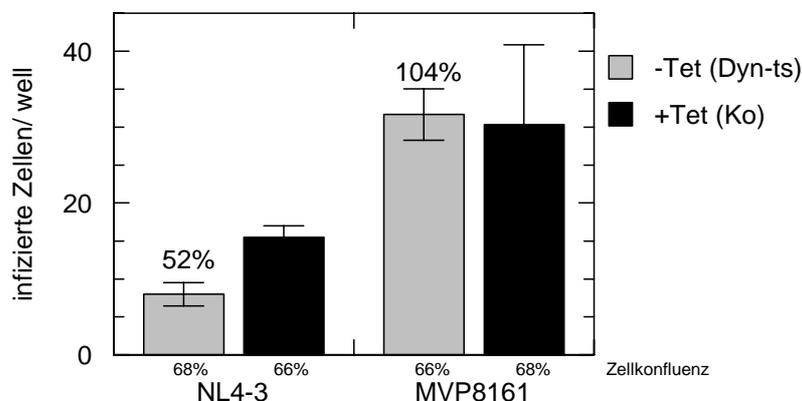


Abb. 3.24: sre 19: Kontrollinfektion von Dyn-ts-Zellen bei der permissiven Temperatur. Die Infektion erfolgte bei 30°C mit HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{MVP8161}. Nach 6 Stunden Virusinkubation erfolgte die virale Proteinexpression für zwei Tage bei 37°C. Grau: Dyn-ts-Expression induziert, schwarz: keine Dyn-ts-Expression. Die Inhibition der Tfn-Aufnahme betrug bei 30°C - oder + Tet: 0%.

Mutante im Hinblick auf Clathrin-vermittelter Endozytose wt-Eigenschaften (Abb. 3.13 d') und somit sollte es bei der Infektion zwischen Dynamin-exprimierenden und –nicht-exprimierenden Zellen keinen Unterschied geben. Unter diesen Bedingungen fand sich jedoch mit HIV-1_{NL4-3} ebenfalls eine Inhibition. In zwei unabhängigen Experimenten war die Inhibition schwächer (ca. 50%) (Abb. 3.24) als bei der parallelen Infektion bei 37°C (ca. 70%) (Abb. 3.23), sie entsprach jedoch in etwa der durchschnittlichen Hemmung in mehreren Versuchen bei 37°C (Abb. 3.19). Im Gegensatz dazu sah man in einem durchgeführten Experiment für das O-Typ Virus HIV-1_{MVP8161} bei 30°C durchschnittlich etwa die gleiche Zahl an infizierten Zellen in Dyn-ts-exprimierenden und –nicht-exprimierenden Zellen (Abb. 3.24).

3.2.2 Analyse von HIV-1-RT-Produkten

3.2.2.1 Etablierung der Quantifizierung von RT-Produkten in infizierten Zellen durch den LightCycler

Um zu untersuchen, ob Dyn-ts die frühen Schritte des Viruseintritts hemmt, wurde eine andere Methode etabliert, die die frühen Replikationsereignisse genauer abbildet. Auf der Grundlage, daß die reverse Transkription von intermediären und späten RT-Produkten durch das frisch in die Zelle eingedrungene Virus erst im Cytoplasma vollzogen wird, sollten diese RT-Produkte quantitativ nachgewiesen werden und ihre Konzentration in Endozytose-defizienten Zellen mit derjenigen in Kontrollzellen verglichen werden. Bleibt bei Endozytose-inhibierten Zellen ein Teil der Viren, der in normalen Zellen produktiv infizieren würde, in den Plasmamembran-nahen Vesikeln eingeschlossen, so sollte sich das in der Menge an RT-Produkten in der Zelle niederschlagen.

Im LightCycler werden wie in einer normalen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Zyklen bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen spezifisch Fragmente aus DNA-Zielmolekülen (Templates) amplifiziert, allerdings wird dabei die Vermehrung des Fragments in Echtzeit parallel detektiert. Der

Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bindet doppelsträngige DNA, was zu einer sehr stark erhöhten Fluoreszenz führt. Mit der exponentiellen Zunahme der Menge an doppelsträngigen Produkten während der Reaktion wird auch eine gleichzeitige exponentielle Erhöhung der Fluoreszenz detektiert, die, je mehr Zielmoleküle eingesetzt wurde, nach um so weniger Zyklen auftritt. Durch den parallelen Einsatz von Standardverdünnungen aus bekannten Konzentrationen des Templates kann in unbekanntem Proben die Template-Konzentration berechnet werden. Durch die Programmierung einer Schmelzkurven-Analyse kann außerdem festgestellt werden, ob nur ein Produkt amplifiziert wurde oder zusätzlich unspezifische Nebenprodukte. Der Schmelzpunkt wird durch die Länge des Produkts und den GC-Gehalt bestimmt und ist für jedes Produkt spezifisch. Befinden sich mehrere verschiedene Produkte in der Probe, so werden mehrere verschiedene Schmelztemperaturmaxima gemessen.

Das System besitzt jedoch eine erhöhte Anfälligkeit dafür, unspezifische Nebenprodukte zu erzeugen und Primer-Dimere zu bilden, da das verwendete LightCycler-Gerät zum Einstellen der Temperaturbedingungen Luft benutzt statt Thermalblöcken oder Wasserbädern und die Zyklen dadurch viel schnell durchgeführt werden. Damit diese, die Quantifizierung verfälschenden Nebenprodukte vermieden werden, müssen für jedes Produkt die Primer und für diese wiederum die Magnesiumchloridkonzentration und die Temperaturbedingungen - besonders für die Primeranlagerung - optimiert werden.

Es wurden Primerpaare für Regionen im Virusgenom ausgesucht, die erst revers transkribiert werden, nachdem das Virus die Wirtsmembran überwunden und das Cytosol erreicht hat. Ein Unterschied in der Produktmenge zwischen Dyn-ts-exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen spiegelt den Block durch Dyn-ts bei diesem Replikationsschritt wieder. Da sogenannte Minus-Strang Strong-Stop DNA (frühe RT-Produkte vor dem ersten Template-Wechsel der RT) zu einem gewissen Teil schon im Virus vorliegen, wurde als Template die U3-Region als intermediär (nach dem ersten Template-Wechsel) und die LTR-gag-Region als spät auftretendes RT-Produkt (nach dem zweiten Template-Wechsel) ausgewählt (Abb. 3.25). Die Primer wurden mit besonderer Beachtung einer geringen Wahrscheinlichkeit, Primer-Dimere zu bilden

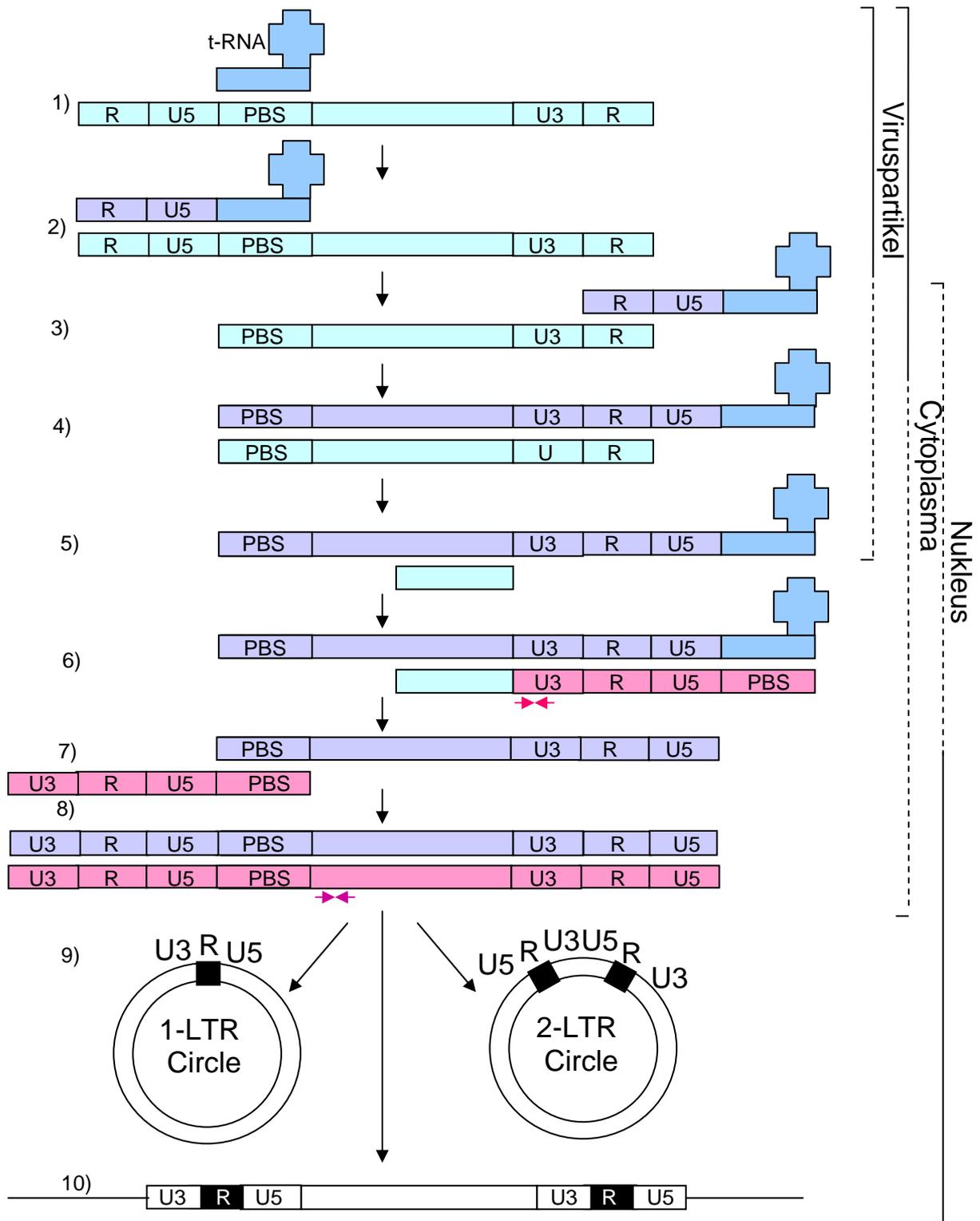


Abb. 3.25: Reverse Transkription bei HIV-1. 1) Genomische Plus-RNA mit t-RNA Primer; 2) Minus-DNA wird am t-RNA-Primer verlängert zur strong stop DNA; 3) Erster Wechsel des Templates; 4) Verlängerung des Minus-DNA Stranges; 5) Großteil der hybridisierten RNA wird entfernt; 6) Plus-DNA Strang-Verlängerung; erstes Auftreten des U3-Produkts auf Plus-DNA; 7) Zweiter Template-Wechsel; 8) Vervollständigung beider DNA-Stränge zur linearen Vollängen-cDNA (Provirus Vorläufer); erstes Auftreten des gag-Produkts auf Plus-DNA; 9) 1- und 2-LTR-Zirkel durch Rekombination bzw. Auto-Integration der Vollängen-cDNA; 10) integrierter Provirus. Rechts: Angabe des subzellulären Kompartiments, in denen die einzelnen Schritte stattfinden. Gestrichelte Linie stellen Unklarheiten in der Lokalisierung der Produktionsstufe dar.

ausgesucht und im Hinblick auf Magnesiumkonzentration und Temperaturbedingungen getestet und optimiert.

3.2.2.2 Test von DNA-Isolierungsmethoden aus Säugerzellen

Um verlässliche Aussage über den quantitativen Vergleich an RT-Produkten in infizierten Dyn-ts-exprimierenden- und Kontroll-Zellen treffen zu können, mußten auch kleine virale DNA-Fragmente quantitativ zusammen mit der genomischen DNA aus den Zellen isoliert werden. Es wurde vier DNA-Isolierungsmethoden auf diese Eigenschaft hin geprüft. Zu diesem Zweck wurden HeLaP4 Zellen in PBS aufgenommen und in 12 Proben á 1×10^5 Zellen aufgeteilt. Zu je vier Proben wurden 20ng, 200ng oder $2 \mu\text{g}$ eines HIV-1-LTR enthaltenden Plasmids, das das revers transkribierte Provirus repräsentiert

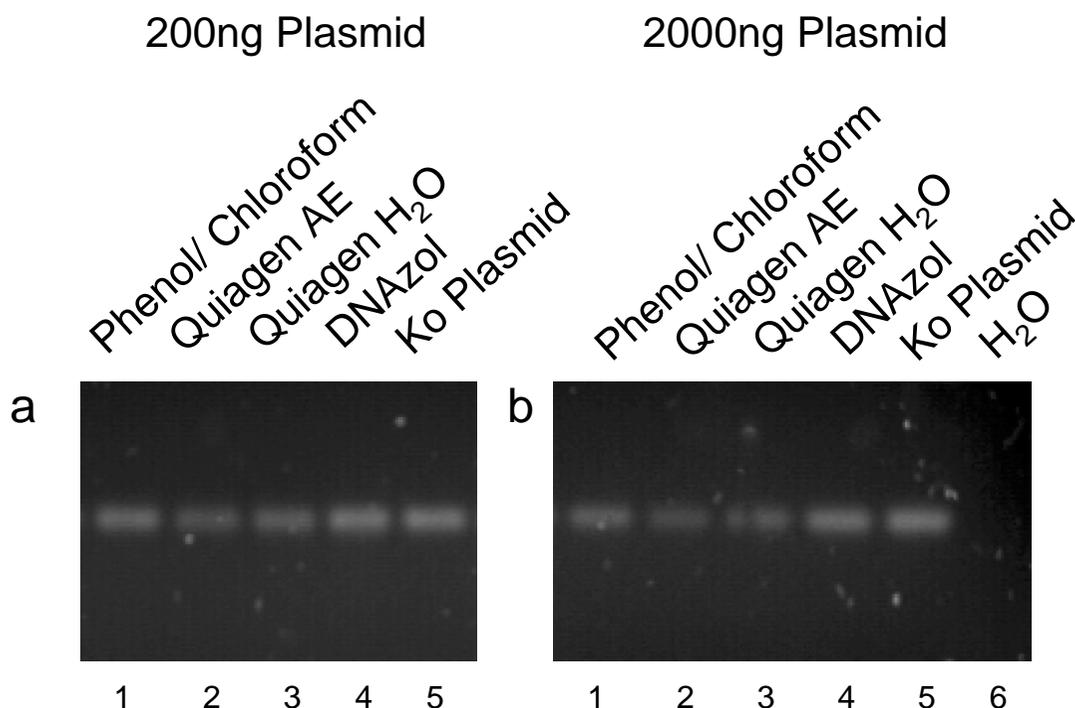
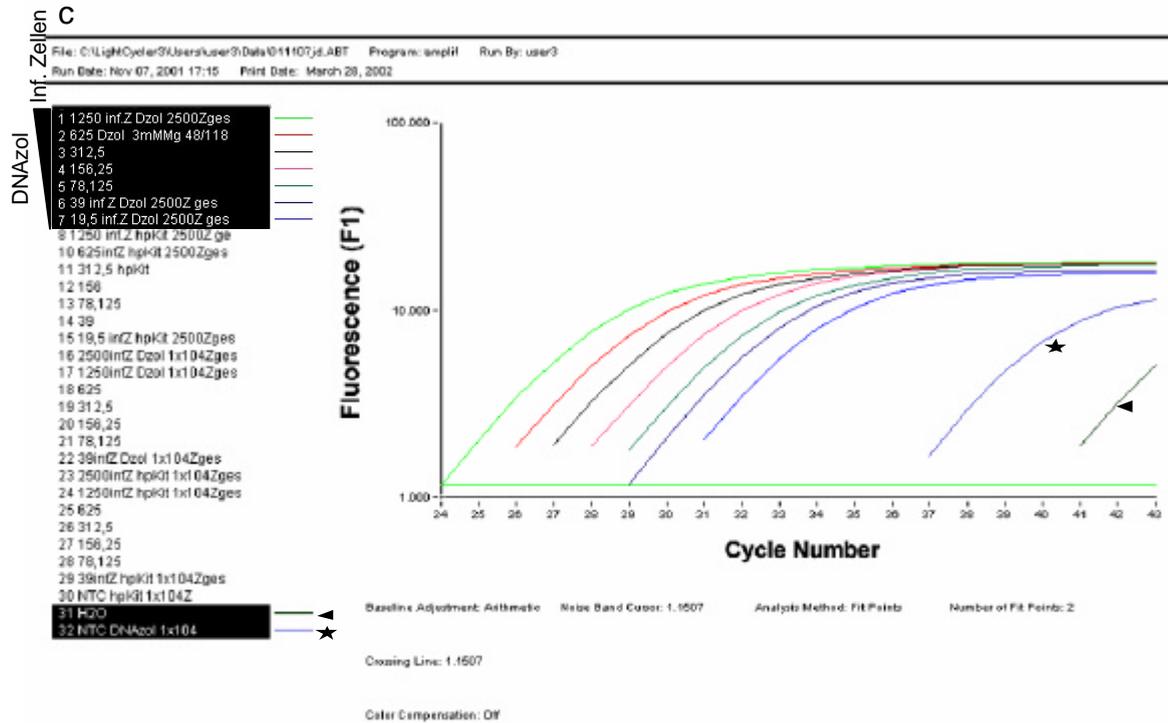
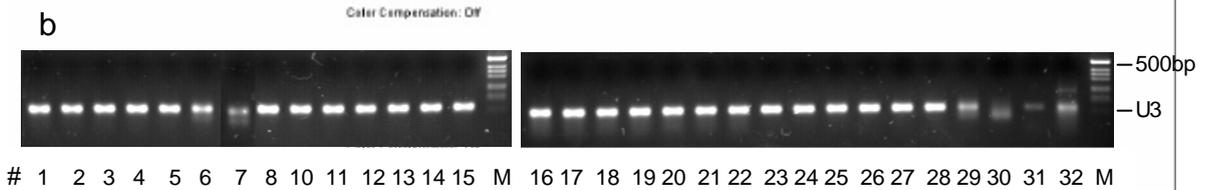
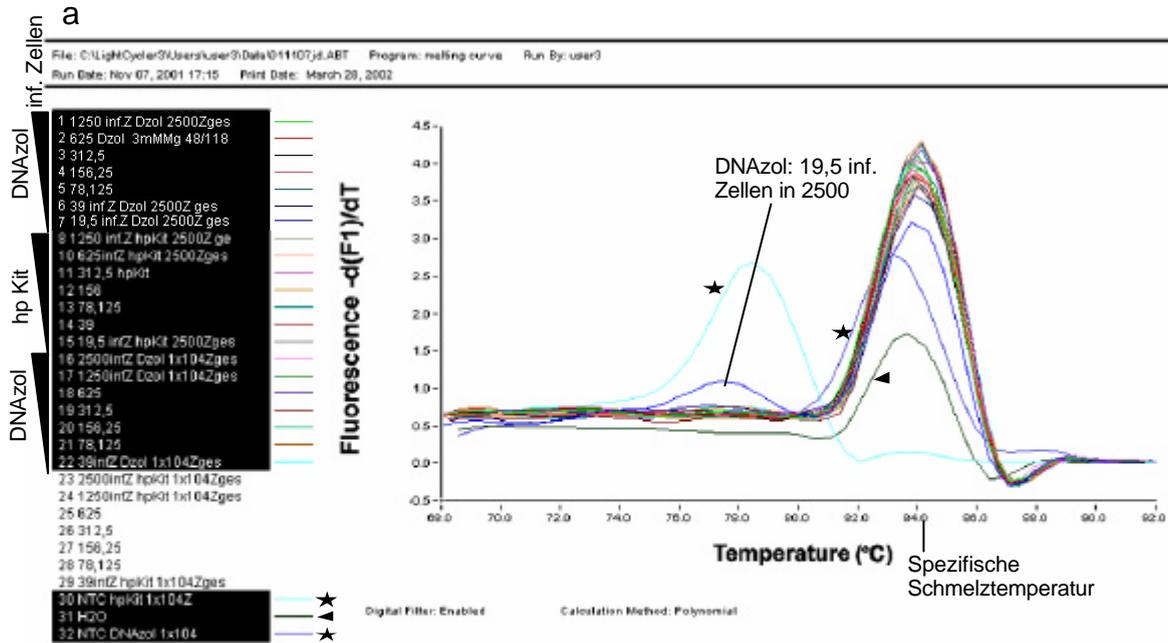


Abb 3.26 : Test zur quantitativen Isolierung von Plasmid-DNA aus Zellen. 200ng (a) bzw. $2 \mu\text{g}$ (b) Plasmid –DNA wurden zu Zellpellets gegeben und diese mit verschiedenen DNA-Isolierungsmethoden aufgereinigt und je 5ng Template (ausgehend vom Input) quantitativ über 18 Zyklen amplifiziert. PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

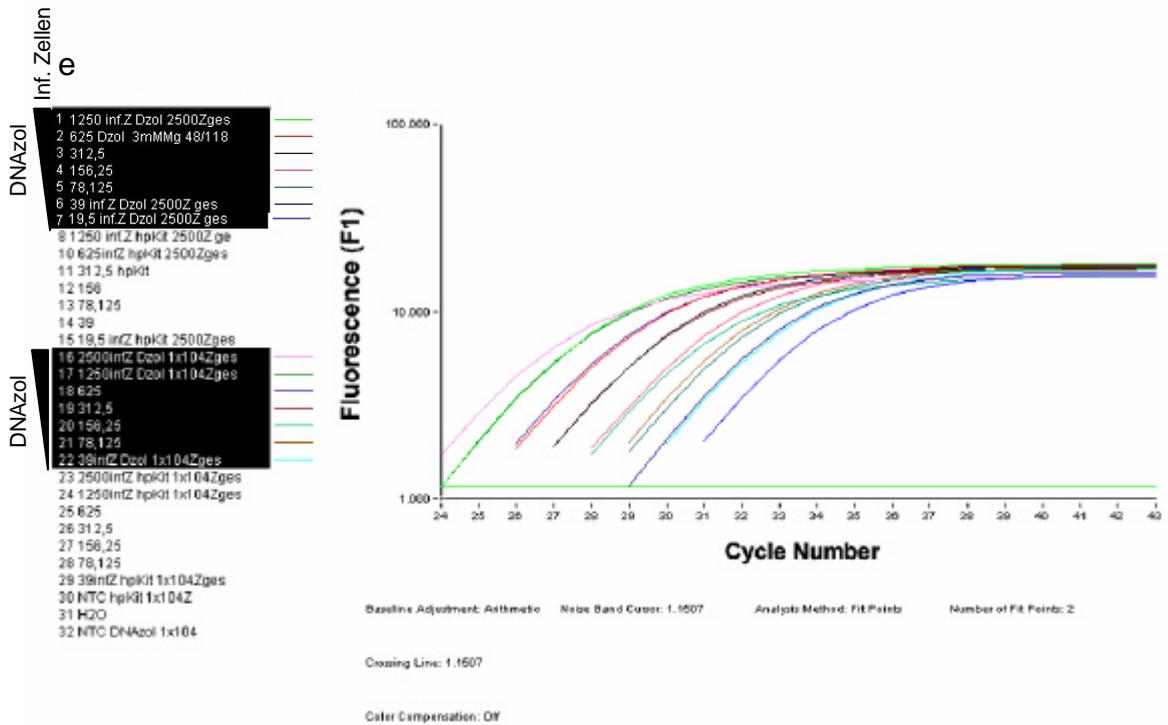
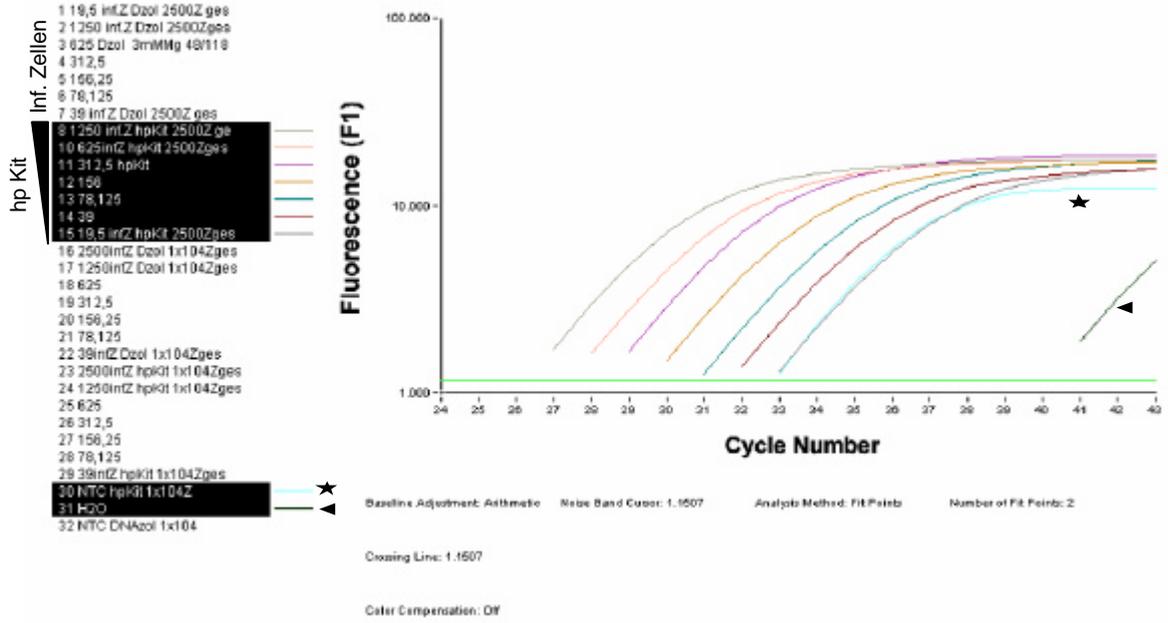
zugegeben und gleiche Proben mit vier unterschiedlichen Methoden aufgearbeitet und jeweils in 50µl resuspendiert. Die Methoden waren im einzelnen: 1. Phenol/Chloroform-Extraktion; 2. und 3. blood Kit von Quiagen, 2. Elution in Kit AE-Puffer, 3. Elution mit H₂O; 4. DNAzol. Zur Kontrolle wurden 20ng, 200ng, und 2µg des Plasmids in 50µl TE-Puffer aufgenommen (5.) und von jeder Lösung 5ng (ausgehend vom Input) in eine quantitative PCR über 18 Runden eingesetzt und die Produkte auf einem Agarosegel sichtbar gemacht. In Abb. 3.26 sind die über 18 Runden amplifizierte Fragmente des LTR-Bereichs aufgezeigt. Die Stärke der amplifizierten Bande der mit Phenol/Chloroform (Abb. 3.26 a und b Spur 1) und mit DNAzol (Abb. 3.26 a und b Spur 4) isolierten Templates entsprach in etwa der Plasmid-Kontrolle (Abb. 3.26 a und b Spur 5), die den Plasmid-Input vor der Behandlung wiedergab. Dagegen gab es einen Verlust an Template-DNA durch die Aufreinigung mit dem blood Kit von Quiagen (Abb. 3.26 a und b Spur 2 und 3). Dies galt sowohl für die Isolierung von 2µg Plasmid-DNA als auch für 10 und 100fach (nicht gezeigt) weniger Plasmid-DNA aus 1×10^5 Zellen. Da die Isolierung mit DNAzol sehr einfach ist und stabile effiziente Isolation der gewünschten Produkte zuließ, wurde sie gegenüber der Reinigung mit Phenol/Chloroform bevorzugt. Da die sre-Experimente für alle getesteten HI-Viren eine Dyn-ts-abhängige Reduktion von 50% aufzeigten, wurde in den folgenden Versuchen festgestellt, ob ein Template-Mengenunterschied um den Faktor zwei durch die quantitative Echt-Zeit-PCR erkannt werden konnte. Außerdem wurde die Analyse an infizierten, aufgearbeiteten Zellen im Gegensatz zur DNA-Zugabe im vorherigen Experiment durchgeführt und das Detektionslimit für infizierte Zellen festgestellt. Zusätzlich wurde eine weitere DNA-Isolierungsmethode mit der DNAzol Methode verglichen.

Zu diesem Zweck wurden $1,3 \times 10^6$ HeLaP4 Zellen mit einer MOI von 0.5 mit HIV-1_{NL4-3} infiziert und sieben Stunden bei 37°C mit dem Virus inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, von der Platte gelöst und in zwei Teile geteilt. Der eine Teil wurde mit DNAzol behandelt, beim anderen die DNA mit dem high pure Kit von Roche isoliert. Aus den DNA-Präzipitaten wurden Verdünnungsreihen pipettiert, welche DNA aus 19,5 bis 1250 infizierten Zellen pro 2µl entsprachen. Mit genomischer DNA aus nicht-infizierten Zellen, die auf



d

File: C:\LightCycler3\User\user3\Data\011107\j6.ABT Program: amplifit Run By: user3
 Run Date: Nov 07, 2001 17:15 Print Date: March 28, 2002



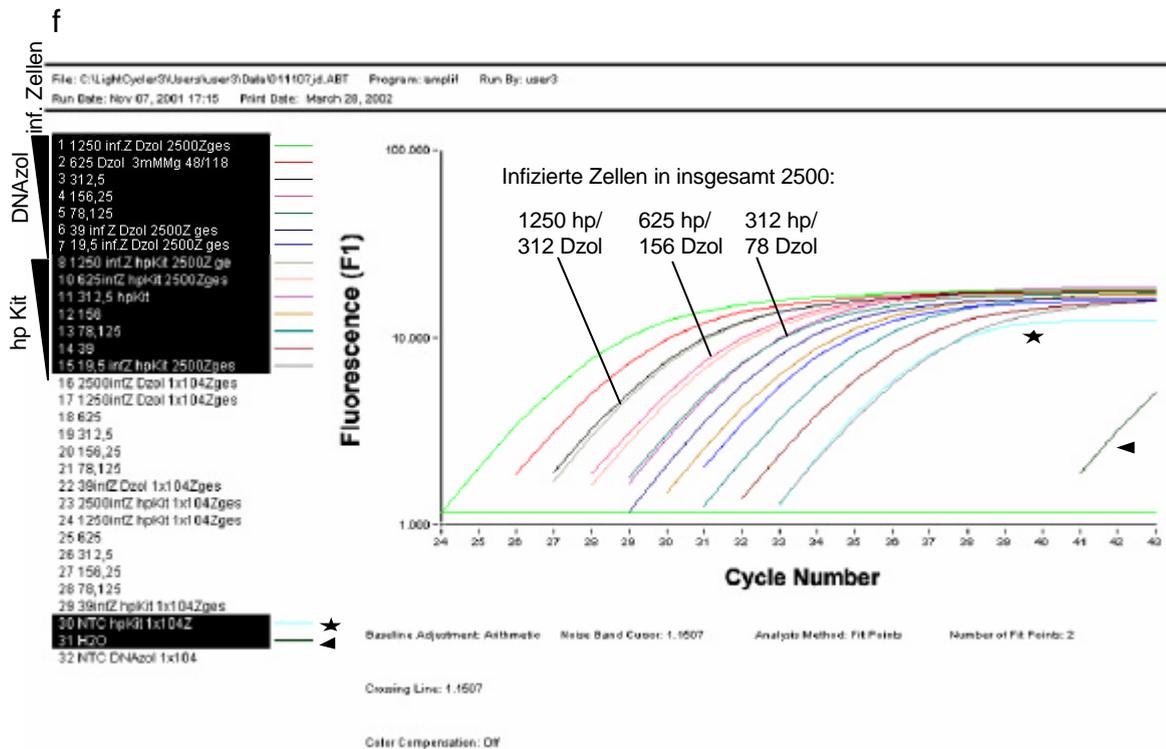


Abb. 3.27: Quantitative LightCycler PCR von HIV-1 RT-Produkten aus infizierten HeLaP4-Zellen. Dargestellt ist die Zunahme an Fluoreszenz (logarithmisch) gegenüber der Zykluszahl. Vergleich der DNA-Isolierungsmethoden DNAzol (Dzol) und high pure Kit von Roche (hpKit). Feststellung des Detektionslimits für infizierte Zellen und des quantitativen Auftrennungslimits. HeLaP4-Zellen wurden mit einer MOI von 0,5 infiziert, nach 7 Stunden abtrypsiniert und eine Hälfte durch den hpKit (#8 bis 15) und eine Hälfte mit DNAzol (#1 bis 7 und #16 bis 22) lysiert und DNA gewonnen. Uninfizierte Zellen wurden ebenfalls so behandelt und DNA-Verdünnungsreihen angelegt aus DNA von 19,5 (bzw. 39) bis 1250 (bzw. 2500) infizierten Zellen gemischt mit uninfizierter DNA zu Gesamtzelläquivalentzahlen von $2,5 \times 10^3$ (#1 bis 15) (bzw. 1×10^4 (#16 bis 22)) Zellen. Die Verdünnungsreihen wurden mit Oligoprimern für die U3-Region von HIV-1 im LightCycler analysiert. (a): Schmelzkurvenanalyse; (b) Spezifitätskontrolle der PCR-Produkte auf dem Agarosegel (c) Verdünnungsreihe DNAzol von DNA aus 19,5 inf. Zellen (#7) bis 1250 inf. Zellen (#1) in insg. 2500 Zelläquivalenten, (d) Verdünnungsreihe hpKit von DNA aus 19,5 inf. Zellen (#15) bis 1250 (#8) inf. Zellen in insg. 2500 Zelläquivalenten, (e) zwei Verdünnungsreihen von DNAzol (f); Vergleich DNAzol mit hpKit. M: 1kb-Marker; Sternchen :NTC = nicht-Template-Kontrolle mit DNA uninfizierter Zellen; Pfeilkopf: H₂O = Kontrolle ohne DNA; Pfeile in (f): Bei gleichem Einsatz an infizierten Zellen wird nach DNA-Isolierung mit dem hp-Kit viermal weniger Template-DNA gewonnen als mit DNAzol.

die gleiche Weise isoliert wurde, wurde die Proben jeweils auf die gesamt Zelläquivalentzahl von 2500 bzw. 1×10^4 Zellen pro 2 μ l aufgefüllt. Es wurden je 2 μ l für die quantitative Amplifikation der U3-Region eingesetzt.

Die Schmelzkurven-Analyse der Verdünnungsreihen zeigte, daß bei der DNAzol-Methode zusätzlich zum spezifischen ein unspezifisches Produkt mit niedrigerer Schmelztemperatur entstand, wenn die Zielmolekül-Konzentration DNA von 39 infizierte Zellen in 2500 Gesamtzelläquivalenten unterschritt (Abb. 3.27 a) (Pfeil). Bis auf die Kontrolle ohne Template von DNA aus uninfizierten Zellen (Sternchen) waren in allen anderen Proben nur spezifische Produkte mit einer Schmelztemperatur von ca. 84°C entstanden (Abb. 3.27 a). Auch in der negativ-Probe ohne DNA (H₂O) gab es eine Kontamination mit Template-DNA (Pfeilkopf). Diese war allerdings sehr gering, wie die Quantifikationsanalysen zeigten (Abb. 27 b, c und e)

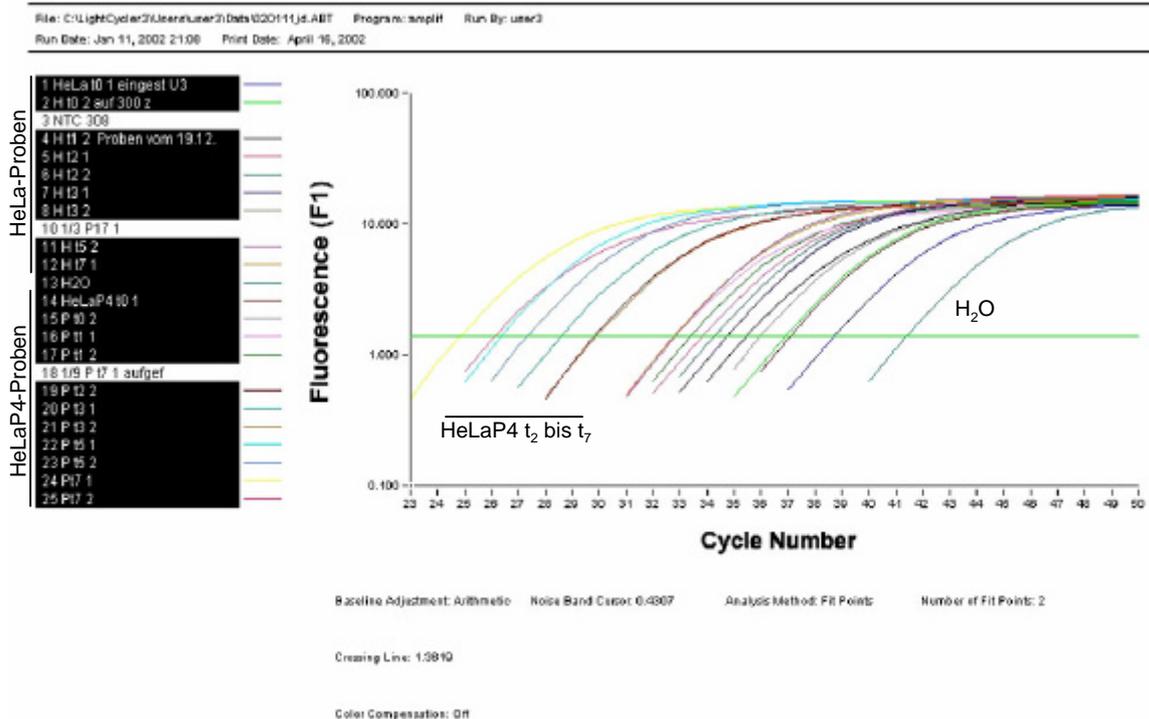
Die Quantifikationsanalyse ist in Abb. 3.27 b bis e durch die logarithmische Darstellung der Zunahme der Fluoreszenz gegenüber der Zykluszahl gezeigt. Bei beiden Reinigungsmethoden war eine gleichmäßige und deutliche Verschiebung der Fluoreszenzzunahme zu früheren Zykluszahlen bei Verdopplung des Templates zu erkennen (Abb. 3.27 b und c). Die Quantifizierung der beiden DNAzol-Verdünnungsreihen, in denen gleiche DNA-Mengen infizierter Zellen auf unterschiedlich hohe Gesamtzelläquivalentzahlen aufgefüllt wurden, zeigte fast exakte Überlappungen bei sich entsprechenden Proben (27 d). Der Vergleich zwischen DNAzol- und high pure-Kit-behandelten Proben zeigte jedoch, daß der gleiche theoretische Input an Template bei den high pure Kit-Proben zu einem späteren Eintritt in die exponentielle Fluoreszenzerhöhungsphase führte als bei den DNAzol-Proben. Die Verzögerung entsprach in etwa einem Faktor vier (Abb. 3.27 b, c, e). Die Aufreinigung mit DNAzol ermöglichte somit die effizienteste Isolierung von HIV-1 RT-Produkten und die spezifische Amplifikation von HIV-DNA-Fragmenten aus infizierten Zellen, bei deren Quantifizierung bis zu 39 infizierte Zellen in insgesamt $2,5 \times 10^3$ bzw. 1×10^4 Zellen spezifisch detektiert werden konnten und eine Unterscheidung zwischen Konzentrationsunterschieden von Faktor zwei möglich war.

3.2.2.3 Nachweis von HIV-1 U3-Produkten in HeLa- und HeLaP4-Zellen

Wichtig für die Etablierung des Assays war weiterhin die Bestimmung des Erntezeitpunktes nach der Infektion zum Nachweis des intermediären RT-Produkts U3 durch die LightCycler-PCR aus infizierten Zellen. Außerdem sollte nachgewiesen werden, daß Viren, die in Endosomen aufgenommen und degradiert werden ohne die Zelle zu infizieren, kein U3-Signal entwickeln. Da HeLa-Zellen keinen CD4-Rezeptor besitzen, können HIV-1 Partikel nicht mit der Membran der Zielzelle fusionieren, es wurde jedoch beobachtet, daß sie in endocytotische Vesikel aufgenommen werden (Maréchal *et al.*, 1998). Es wurden HeLaP4-Zellen und HeLa-Zellen bei 37°C mit einer MOI von 0,5 mit HIV-1NL4-3 inkubiert und Zellen direkt nach der Infektion (t_0) bzw. nach jeder weitere Stunde (t_1 bis t_7) gewaschen und mit DNAzol aufgearbeitet.

In Abb. 3.28 a ist die Quantifizierung von U3-Templates aus den Proben aufgezeigt. Der Anstieg der U3-Templatmenge in infizierten HeLaP4-Zellen war linear zur Dauer der Infektion und überstieg die U3-Produktmenge in HeLa-

a



b

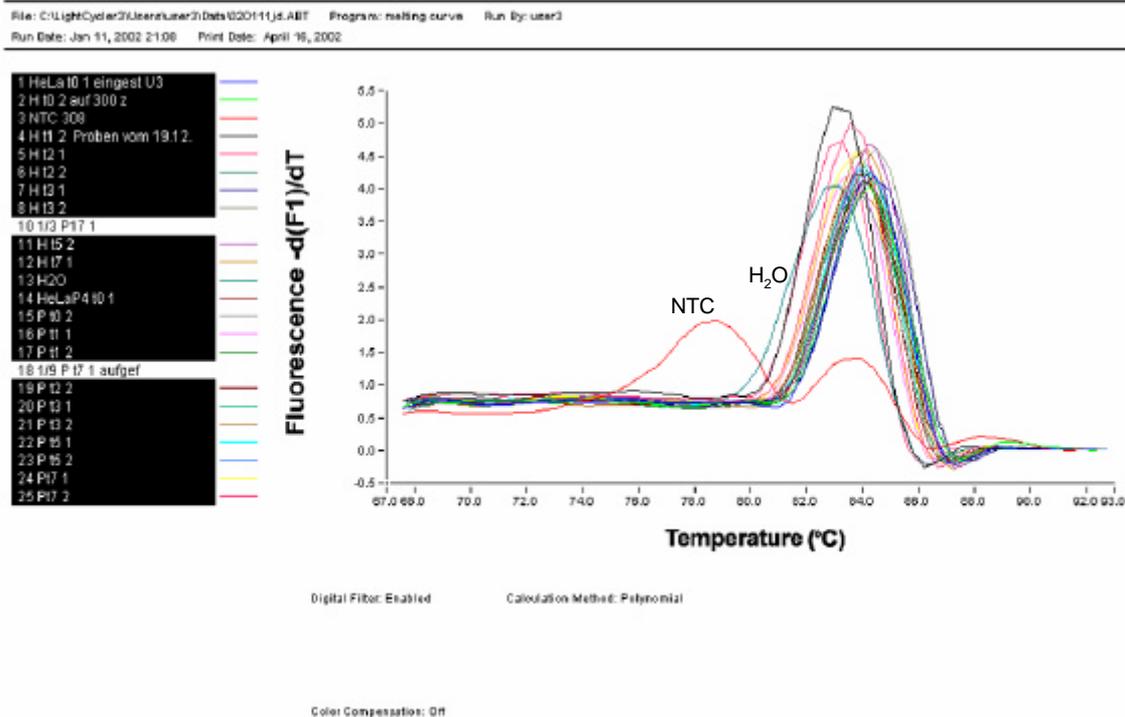


Abb. 3.28: Quantitative PCR-Analyse der U3-Produkte in HeLa- und HeLaP4-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von HIV-1_{NL4-3} (MOI 0,5). HeLa und HeLaP4 Zellen wurden mit HIV-3_{NL4-3} inkubiert und es wurden direkt nach Zugabe (t_0) oder stündlich (t_1 bis t_3) bzw. alle zwei Stunden (t_5 und t_7) Proben der Zellen genommen (jeweils Duplikate). Die Gesamt-DNA wurde mit DNAzol aufgereinigt und gleiche Volumina im LightCycler analytisch amplifiziert. (a) Quantifizierung von U3-Produkten: Fluoreszenzzunahme (logarithmisch) gegen Zykluszahl, (b) Schmelzkurvenanalyse: das spezifische Produkt hat eine T_{m50} von 84°C

Proben ab zwei Stunden p.i. (t_2 bis t_7) deutlich. Die exponentielle Amplifikationsphase wurde in HeLaP4-Proben drei (t_2 und t_3) bis acht (t_7) Zyklen früher erreicht, als bei der längsten Virusinkubation auf HeLa-Zellen.

Auch in HeLa-Zellproben stieg die U3-Templatmenge linear zur Dauer der Virusinkubation in geringem Maße an. Da die Partikel nicht ins Cytoplasma eindringen konnten, um die reverse Transkription zu vollführen, war dies nicht erwartet. Um eine unterschiedliche Effizienz bei der Aufreinigung der Gesamt-DNA aus den Zellproben zu berücksichtigen, wurde die genomische DNA in den Proben als Maß der isolierten Gesamt-DNA ebenfalls quantifiziert. Dies wurde durch die quantitative Amplifizierung eines Fragments des zellulären

Gens glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) erreicht und so die Zellzahl ermittelt, die der isolierten DNA-Menge für jede Probe entsprach. Sodann wurde die Menge an U3-Template auf 1000 Zellen in der jeweiligen Probe bezogen. In Abb. 3.29 ist das Ergebnis dieser Berechnung für den obigen Versuch gezeigt. Hier nahm die Menge an U3-Template in HeLaP4-Zellen mit steigender Infektionszeit zu, während sie in HeLa-Zellen auf niedrigem Niveau blieb und damit den Erwartungen entsprach. Die RT-Produkte von HIV-1_{NL4-3} waren bereits nach zwei Stunden detektierbar und stiegen bis sieben Stunden nach Infektionsbeginn an. Eine sichere Quantifizierbarkeit war nach fünf bis sechs Stunden gegeben.

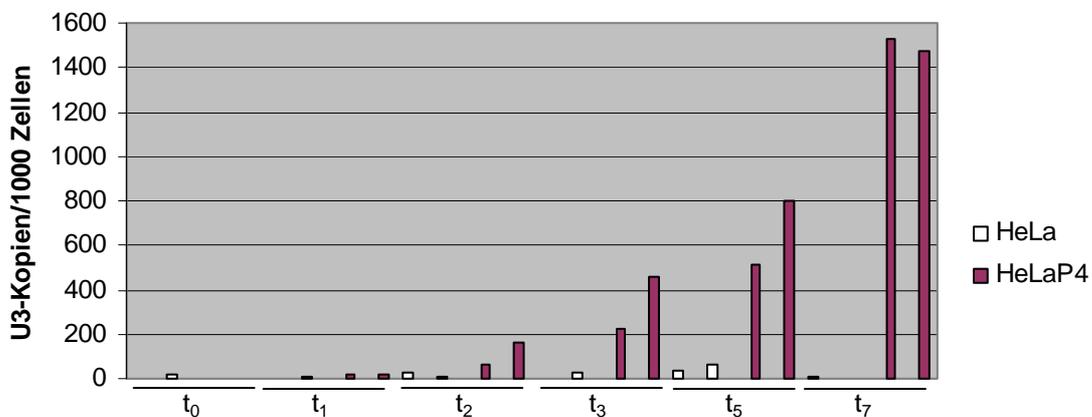
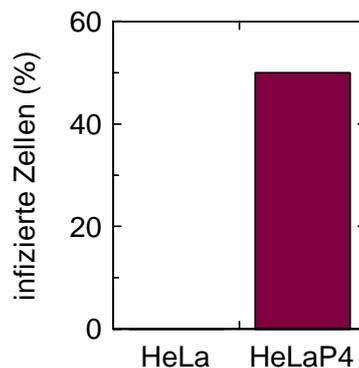


Abb 3.29: (a) Kinetik der HIV-1 RT-Reaktion in HeLa und HeLaP4-Zellen. Zellen wurden wie in Abb. 27 mit HIV-3_{NL4-3} inkubiert und Proben genommen. Die HIV-1 U3-Region wurde quantitativ amplifiziert (siehe Abb. 27) und auf GAPDH-Kopien in den Proben abgeglichen. (b) virales Protein wurde zwei Tage p.i. mit anti-p24 in den Zellen gefärbt



3.2.2.4 Quantifizierung intermediär und spät auftretender RT-Produkte beim sre-Assay

3.2.2.4.1 Versuchsaufbau

Beim Virus-entry-Versuch wurden wie zuvor die 4D9-Zellen in An- oder Abwesenheit von Tet drei Tage bei 32°C gehalten. Für jeden Versuchsansatz wurden zwei bis drei Parallelexperimente durchgeführt. Im Unterschied zur bisherigen Methode wurden die Zellen zwei Tage vor Infektion á $2,5 \times 10^4$ /24-Well ausgesät und mit einer MOI von 0,3 mit HIV-1_{NL4-3} infiziert. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt t_0 und zwischen vier (t_4) und sechs (t_6) Stunden nach Infektion zweimal mit PBS gewaschen und die DNA mit DNAzol gereinigt. Parallel wurden auch die viralen Proteine in infizierten Zellen bei 37°C zur Expression gebracht, die infizierten Zellen gefärbt und gezählt. Außerdem wurde parallel die Transferrinaufnahme in gleich behandelten Zellen nach der Präinkubationsphase durch Fluoreszenzmikroskopische Analyse gemessen (Tab. 3.4). Die DNA-Proben wurden mindestens zweimal (bei starker Varianz dreimal) unabhängig mit dem U3- und dem GAPDH-Primerpaar amplifiziert, gemittelt und die U3-Templatmenge auf 1000 Zellen normalisiert.

3.2.2.4.2 Auswertung von drei unabhängigen sre-Experimenten

Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Im Experiment sre15 wurden direkt, vier und sechs Stunden nach Beginn der Infektion Proben genommen. Es war zu beiden späten Zeitpunkten kein signifikanter U3-Mengenunterschied pro 1000 Zellen zwischen Endozytose-inhibierten Zellen und Kontrollzellen zu verzeichnen (Abb. 3.30). Die Hemmung der Transferrin-Aufnahme betrug bei diesem Experiment 65% und es wurden infizierten Zellen nach zwei Tagen bei 37°C betrug etwa 60% (Tab.3.4).

In einem anderen Experiment (sre18) wurden die Zellen fünf Stunden nach Infektionsbeginn lysiert. Die Quantifizierung der U3-Templates zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen Dyn-ts-exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen (Abb. 3.30 b und c). In diesem Experiment herrschten

bei der Quantifizierung der U3-Kopien teilweise starke Variabilitäten zwischen den einzelnen PCR-Läufen vor. Eine einmalige Quantifizierung mit einem gag-Primerpaar ergab jedoch eine gleiche relative Mengenverteilung in den einzelnen Proben wie die Quantifizierung von U3 (Abb. 3.30 b und d). Auch in diesem Experiment war die Transferrin-Aufnahme stark gehemmt (83%) und die Zahl an infizierten Zellen in Dyn-ts-exprimierenden Zellen signifikant niedriger (30% des Kontrollwerts; Tab. 3.4).

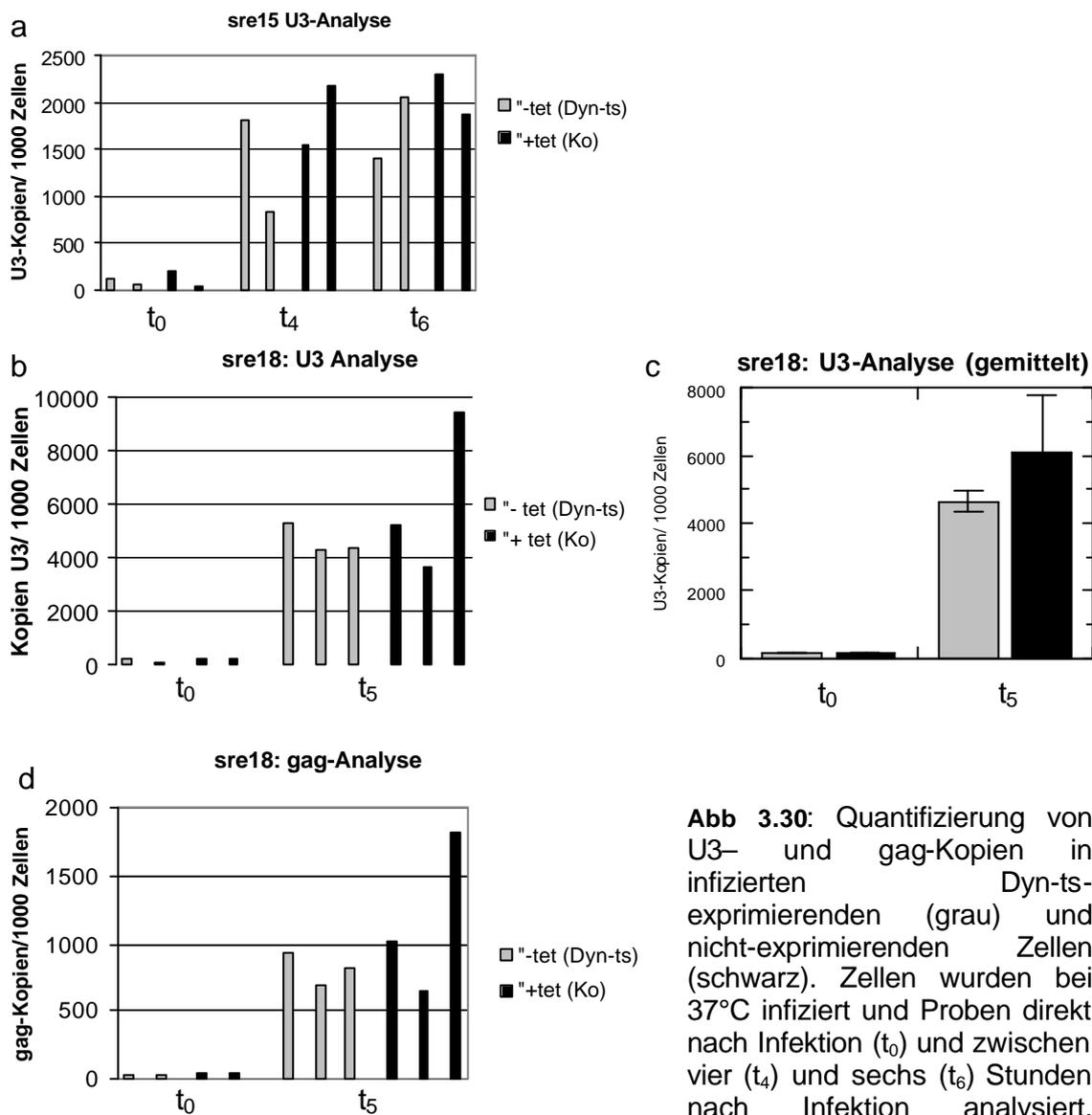


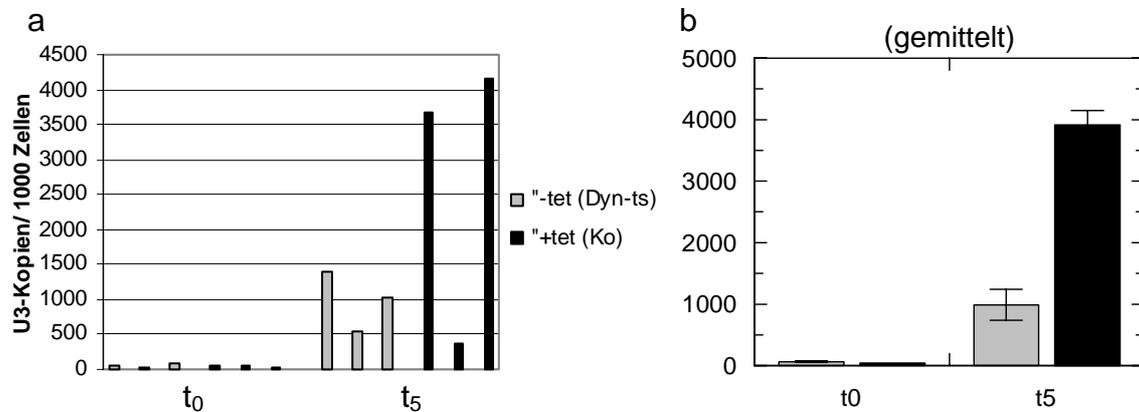
Abb 3.30: Quantifizierung von U3- und gag-Kopien in infizierten Dyn-ts-exprimierenden (grau) und nicht-exprimierenden Zellen (schwarz). Zellen wurden bei 37°C infiziert und Proben direkt nach Infektion (t₀) und zwischen vier (t₄) und sechs (t₆) Stunden nach Infektion analysiert. Kopienzahl der RT-Produkte wurde nach GAPDH-Kopienzahl

normalisiert. Duplikate (t₀, t₄, t₆) bzw. Triplikate (t₅) pro Ansatz. (a): Experiment sre 15; (b bis d): Experiment sre 18; (c): Ansätze aus (b) gemittelt dargestellt

Im dritten unabhängigen Experiment (sre16) war in den Dyn-ts exprimierenden Zellen ca. viermal mehr U3-Template vorhanden als in den -nicht-

exprimierenden Zellen (Abb. 3.31 a). Der zweite Wert wurde in der Mittelung (Abb. 3.31 b) hier nicht mitgewertet, da dieser Wert sehr stark von den beiden Parallel-Ansätzen abwich und auch die Gesamt-DNA-Isolierung bei dieser Probe relativ ineffizient war. In einer einmaligen quantitativen Amplifizierung der gag-Region wurde ebenfalls eine signifikant geringere Menge an gag-Kopien in den Endozytose-defizienten Zellen gefunden. Hier war der Unterschied etwa zweieinhalbfach (Abb. 3.31 b). Die Inhibition der Transferrin-Aufnahme betrug in diesem Experiment 74% (Tab. 3.4).

sre 16: U3-Analyse



sre 16: gag-Analyse

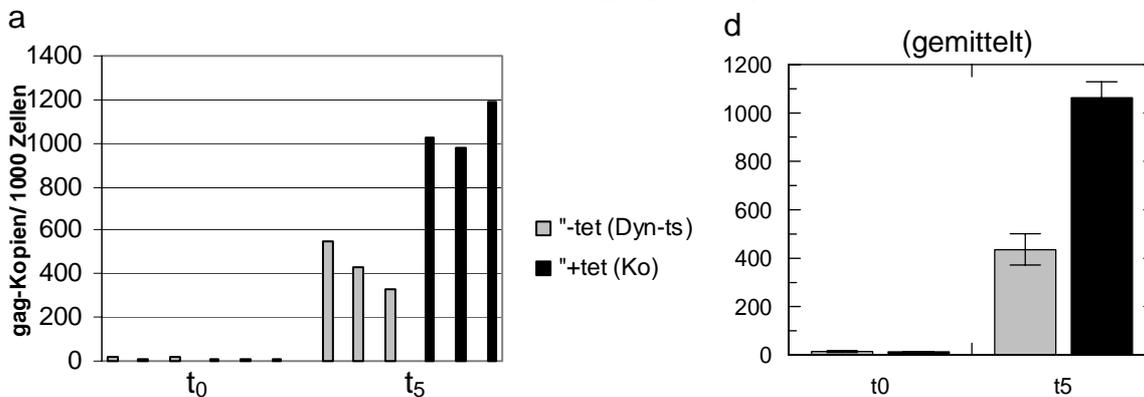


Abb. 3.31: sre16: U3-Kopien- (a, b) und gag-Kopien (c, d)-Quantifizierung in infizierten Dyn-ts-exprimierenden (grau) und nicht-exprimierenden Zellen (schwarz) direkt (t₀) und fünf Stunden nach Infektion (t₅) bei 37°C. Kopienzahl der RT-Produkte wurde nach GAPDH-Kopienzahl normalisiert. Triplikate pro Ansatz. (a und c) Triplikate getrennt, (b und d) gemittelt dargestellt

1	2	3	4	5
		LightCycler: Template-Menge im Vergl. zur +Tet-Ko	Infizierte Zellen im Vergl. zur +Tet-Ko	Inhibierte Tfn- Aufnahme (% der Zellpopulation)
Sre15	U3 t ₄ t ₆	70,%* 82,9%*	41%	65%
Sre18	U3 t ₅	76,3%*	30%	83%
	Gag t ₅	70%*		
Sre 16	U3 t ₅	25,3%	24%	74%
	Gag t ₅	41%		

Tab. 3.4: Zusammenfassung der Ergebnisse von drei unabhängigen sre-Experimenten. Parallele Messung Spalte 5: der Endozytose-gehemmten Dyn-ts-exprimierenden Zellen während der Infektion durch Fluoreszenzmikroskopie mit Tfn-TX; Spalte 4: der infizierten Zellen nach zweitägiger Proteinexpressionsphase bei 37°C; Spalte 3: der Menge der reversen Transkriptionsprodukte einige Stunden p.i.. Bei Spalte 3 und 4: Ergebnis in Dyn-ts-exprimierenden im Vergleich zu –nicht-exprimierenden Zellen (=100%). (*): aufgrund überlappender Standardabweichung nicht signifikanter Unterschied zu Kontrolle + Tet (Ko).

Die divergierenden Ergebnisse dieser Analyse ließen somit noch keine eindeutigen Schlüsse darüber zu, bei welchem Schritt die Replikation von HIV-1 durch Dyn-ts beeinflusst wird. Dazu müssen noch mehr sre-Experimente durchgeführt werden, um schließlich eindeutig festzulegen, ob die U3-Template-Menge signifikant durch die Expression von Dyn-ts in den Zellen abnimmt. Sollte sich dies nicht bestätigen, könnte durch analytische Amplifizierung von 2-LTR-circles, die ein Nebenprodukt von Integrase-Aktivität sind und ausschließlich im Kern vorkommen, festgestellt werden, ob der Dyn-ts Block bei einem späteren Zeitpunkt, d. h. beim Kerntransport eine Rolle spielt.

4 Diskussion

4.1 Etablierung einer CD4- und transdominant-negatives Dynamin exprimierenden Zelllinie zur Analyse des Einflusses von Dynamin auf das HIV-1 Entry

4.1.1 Die CD4-Expression in der Massenkultur transduzierter Zellen ist nicht stabil

Damit die HeLa-Zellen, die die Dynamin-Varianten exprimieren mit HIV-1 infiziert werden können, müssen die Zellen den CD4-Rezeptor und den vom Virus nutzbaren Ko-Rezeptor der Chemokinrezeptorfamilie exprimieren (Pelchen-Matthews, 1999). HeLa-Zellen exprimieren natürlicherweise den Chemokinrezeptor CXCR4, der unter anderem von den hier verwendeten Isolaten HIV-1_{NL4-3}, HIV-1_{SF2} und HIV-1_{MVP8161} benutzt wird. Um jedoch CD4 zu exprimieren, mußte das Gen zunächst durch Transduktion stabil im Zellgenom integriert werden. Da sich der Selektionsmarker für Geneticin-Resistenz durch das Konstrukt, das das Gen für den Tet-Transaktivator enthält, bereits in den Zellen befindet, konnten die CD4-positiven Zellen nicht durch Inkubation mit dem Selektionsmedium selektioniert werden, sondern wurden durch „magnetic antigen cell sorting“ (MACS) abgetrennt. Obwohl die CD4-FACS-Analyse direkt nach der Analyse nur für Dyn-ts-Zellen einen leichten Fluoreszenzanstieg gegenüber ungefärbten Zellen zeigte, war die MACS-Methode sensitiv genug, um in allen drei Zellvarianten CD4-positive Zellen zu isolieren, die über drei MACS-Runden in der Zellpopulation zunehmend angereichert wurden (Abb. 3.2). Allerdings wurden bei jeder folgenden MACS-Selektion trotz höherer Säulenkapazitäten nur bis zu 10% des Zellinputs isoliert und auch die FACS-Analyse zeigte zwischen der ersten und der dritten Woche nach der letzten MACS-Behandlung eine Abnahme an CD4-positiven Dyn-ts-Zellen um fast 20% (Abb. 3.10). Hierfür könnte es zwei Gründe geben: 1. die Zellen waren bei der Selektion CD4-positiv und schalteten dann das Gen ab oder verloren es, 2. auch CD4-negative Zellen wurden mitisoliert und proliferierten schneller als die

CD4-positiven Zellen. Für den 2. Grund spricht, daß bei den später etablierten klonalen Zelllinien der CD4-Rezeptor über die untersuchte Zeit von zwei Monaten stabil exprimiert wurde und keine Nebenpopulation aus CD4-negativen Zellen entstand.

4.1.2 Expression von Dynamin-1-Varianten differiert in Dynamin-wt, -K44A und -ts Zellen nach CD4-Transduktion

Nach der CD4-Transduktion und -Selektion war bei Dyn-wt und-K44A-Zellen nur noch eine sehr stark eingeschränkte bzw. komplett fehlende Fähigkeit der Zellen zu verzeichnen, die Dynamin-Variante nach Induktion in Abwesenheit von Tet zu exprimieren (Abb.3.4). Da das CD4-Konstrukt den gleichen Resistenzmarker wie das Konstrukt für den Tet-Transaktivator enthält, könnten die Zellen letzteres Gen aus dem Genom durch Rekombination verloren und trotzdem im Selektionsmedium überlebt haben. Der Tet-Transaktivator aktiviert im Tet-off-System in Abwesenheit von Tet den Tet-Promotor und die Expression des davon kontrollierten Gens (in diesem Fall Dynamin). Bei Zugabe von Tet kann der Transaktivator die Promotorregion nicht binden und aktivieren. Exprimiert die Zelle jedoch den Transaktivator nicht mehr, so wird sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Tet kein Dynamin mehr gebildet, obwohl das dynamin-Gen noch vorhanden ist.

Im Gegensatz dazu war die Dyn-ts-Produktion in den entsprechenden transduzierten Zellen nach Immunoblot Ergebnissen nicht eingeschränkt. Der Grund für diesen Unterschied zwischen den Zelllinien könnte darin liegen, daß es sich bereits vor der Transduktion um Mischpopulationen aus Dynamin-exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen handelte und sich in Dyn-K44A- und Dyn-wt-Zellen bereits weniger Dynamin-exprimierende Zellen befanden (Abb. 3.4). In der Dyn-ts Zellpopulation könnte sich nach Transduktion ein genauso hoher Anteil an Dyn-ts-exprimierenden Zellen befunden haben oder es könnten weniger Zellen einzeln mehr Dyn-ts oder mehr Zellen einzeln weniger Dyn-ts produziert haben als vor der Transduktion. Nach Vergleich der Dyn-ts-Menge im Zelllysat (Abb. 3.4) mit der Expression bzw. damit zusammenhängend der Inhibitor der Transferrin-Aufnahme auf

Einzelzellbasis (Abb. 3.9) ist es wahrscheinlich, daß nach der Transduktion ein größerer Anteil an Zellen einzeln weniger Dyn-ts exprimierte.

4.1.3 Dyn-ts-Expression und Transferrin-Aufnahme in Dyn-ts/CD4⁺ Zellen

Wie schon erwähnt, wurde Dyn-ts nicht von allen Zellen der Dyn-ts/CD4⁺-Massenkultur exprimiert, sondern nur von knapp 70% der Zellen. Diese Zellen waren jedoch nicht alle in der Lage nach 1,5 Stunden bei 37°C die Aufnahme von Tfn zu unterbinden sondern nur bis zu 80%, entsprechend etwa 50% der Gesamtpopulation. Die Ursache für die niedrige Zahl Dyn-ts-exprimierender Zellen lag nicht in der Transduktion- und Selektionsbehandlung, da die Werte für nicht-transduzierte Zellen niedriger waren (Abb. 3.9). Der Befund, daß nicht alle Dyn-ts-exprimierenden Zellen die Transferrin-Aufnahme inhibierten, war nicht darauf zurückzuführen, daß die Zeit für die Ausbildung des Phänotyps zu kurz war, da nach zwei Stunden oder sechs Stunden bei der nicht-permissiven Temperatur die Tfn-Aufnahme nicht wesentlich stärker inhibiert war (Abb. 3.8). Für die Dyn-ts Zelllinie wird eine nicht-permissive Temperatur von 38°C angegeben, die auf der *shibire*-Mutante von *Drosophila melanogaster* beruht, welche die homologe Mutante zu Dyn-ts darstellt (Damke 1995). Jedoch gab es zwischen 37°C und 38°C keinen Unterschied bei der Tfn-Aufnahme (Abb. 3.8). Der Grund für die Diskrepanz zwischen der Zahl Dyn-ts exprimierender und Tfn-Aufnahme inhibierender Zellen wurde somit nicht deutlich und der Unterschied bestand auch in der klonalen Zelllinie 4D9 (Abb. 3.14). Ob die mangelnde Inhibition aufgrund einer relativ geringeren Expressionsstärke in den betreffenden Zellen zustande kam, war mittels der verwendeten Detektionsmethode (indirekte Immunfluoreszenzfärbung Dyn-ts-HA-exprimierender Zellen) nicht feststellbar.

Die Endozytose-Inhibition war bezogen auf die gesamte Population in der 4D9-Zelllinie viel stärker und die Voraussetzungen für die geplanten Analysen somit verbessert.

4.1.4 Klonale Dyn-ts-Zelllinien exprimieren stabil CD4 und hemmen effizient die Aufnahme von Transferrin

Es wurden durch das FACS-Sort Gerät in 864 Wells CD4-positive Dyn-ts-Einzellen sortiert. Da das Gerät erst vor kurzem aufgestellt und noch nicht richtig justiert war, waren nur in 59 Wells tatsächlich Zellen positioniert worden. Wegen dieser geringen Ausbeute wurde bei Platte 5 das Gerät darauf eingestellt, 10 Zellen in jedes Well zu legen. Aus dieser Platte wurden sodann auch die meisten Klone gewonnen, wobei durch mikroskopische Beobachtung sichergestellt wurde, daß nur einzelne Zellen deponiert worden waren.

Von den 59 Zellen wuchsen nur 11 zu Kolonien aus. Durch die Benutzung von konditioniertem Medium, das Wachstumsfaktoren und Botenstoffe von anderen Zellen enthält, hätte diese Zahl wahrscheinlich erhöht werden können.

Zur Zeit der Sortierung der Zelllinie 1E11, war das FACS-Sort-Gerät auf Isolierung von Zellen mit höherer CD4-Expression als bei den anderen eingestellt. Die Zelllinie zeigte in späteren Analysen auch tatsächlich eine im Mittel 2,5fach stärkere CD4-Expression als die anderen untersuchten Klone (Abb. 3.11;Tab. 3.3). Trotzdem wurde für den sre-Assay die Zelllinie 4D9 eingesetzt, da diese eine stärkere Adhärenz an der Unterlage aufwies und die Zellen somit bei den zahlreichen Waschschrinen während des Versuchs weniger stark abgewaschen wurden als 1E11-Zellen.

Die CD4-Expression der Zelllinien war bei Kultivierung über zwei Monate stabil. Sie zeigten im Vergleich mit Dyn-ts/CD4⁺-Zellen einen hohen Anteil an Dyn-ts-exprimierenden Zellen in der Population und eine stark erhöhte Effizienz, die Aufnahme von Tfn zu hemmen. Diese neuen Zelllinien stellten somit eine große Verbesserung gegenüber den Dyn-ts/CD4⁺-Zellen dar und boten die optimalen Voraussetzungen zur Etablierung des single-round-entry Assays.

4.2 Optimierung der Bedingungen zur single-round-entry (sre-) Assay-Methodenetablierung

Der geplante Versuchsaufbau sollte den Vergleich der HIV-1 Infektion von Dyn-ts-exprimierenden Zellen und der gleichen Zelllinie bei unterbundener Dyn-ts-

Expression (in Anwesenheit von Tet) ermöglichen. Da sich der Unterschied nur auf die Eintrittsphase auswirken sollte, mußte sichergestellt werden, daß alle anderen Bedingungen bei den zu vergleichenden Proben möglichst gleich waren.

4.2.1 Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose hat keinen Einfluß auf die Dichte der HIV-1 Entry-Rezeptoren CD4 und CXCR4

Rezeptoren an der Oberfläche von Zellen unterliegen einem Zyklus von Expression, Plasmamembran-Transport, Internalisierung und Recycling oder Degradation, der bei CD4 und CXCR4 von endocytotischen Prozessen abhängt. Würde die Rezeptordichte an der Oberfläche durch Dyn-ts-Expression und Inhibition der Endozytose im Vergleich zu den Kontrollzellen beeinflusst, so könnte das zu einer indirekten Beeinflussung der Infektion führen, die unabhängig von den zu untersuchenden Parametern ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Rezeptordichte sich bei Dyn-ts-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen bei permissiver oder nicht-permissiver Temperatur nicht signifikant unterschied (Abb. 3.15).

4.2.2 Einfluß von Tet auf den viralen Titer

Da sich in der vorgestellten Arbeit die Kontrollzellen nur durch die Anwesenheit von Tet im Medium von den Endozytose-inhibierten Zellen unterscheiden, wurde untersucht, ob sich Tet unspezifisch auf den infektiösen Titer von HIV-1 auswirkt. In drei Experimenten wurde eine geringe Erniedrigung des HIV-1_{NL4-3} Titers durch Tet auf HeLaP4-Zellen beobachtet. Um jegliche Verfälschung während des sre-Assays auszuschließen, wurden alle Proben ab der Präinkubationsphase am Infektionstag einer identischen Behandlung unterzogen. Sie wurden ohne Tet infiziert, da die Kinetik des Dyn-ts Abbaus zeigte, daß schon nach vier Stunden bei 37°C in Anwesenheit von Tet weniger Zellen in der Lage waren, die Transferrin-Aufnahme zu inhibieren (Abb. 3.14). Allerdings zeigte sich, daß der Großteil an infektiösen Partikeln sofort bei Kontakt mit den Zellen mit der Infektion begann, da nach fünfständiger

Virusinkubation nur etwa 10 bis 20% mehr Zellen infiziert wurden als nach zweistündiger Inkubation (Abb. 3.20). Das Risiko, daß in den zuvor in Anwesenheit von Tet behandelten Kontrollzellen während der Präinkubation und der Infektion funktionelles, dominant-negatives Dyn-ts gebildet wurde war sehr gering, da erstens die Zeit bis zum Viruseintritt zu kurz war und zweitens gezeigt wurde, daß bei 38°C gebildetes Dyn-ts nicht die Fähigkeit hat, Clathrin-abhängige Endozytose zu unterbinden. Vermutlich müssen die Dyn-ts-Proteine bei einer permissiven Temperatur gebildet werden, um funktionell gefaltet zu werden und mit Dyn-wt Monomeren interagieren zu können (Damke *et al.*, 1995).

4.3 Aufbau des sre-Assays

Die Analyse des Einflusses von transdominant-negativem Dynamamin auf die frühen Replikationsvorgänge von HIV-1 erfolgte im ersten Teil durch den Vergleich der Anzahl Virusprotein-exprimierender Zellen in parallel infizierten Dyn-ts-exprimierenden und –nicht-exprimierenden Zellen (Abb. 3.17). Nach Infektion und Tet-Zugabe wurde die Zahl infizierter Zellen in parallelen Ansätzen analysiert, die entweder zwei Tage bei 37°C oder vier Tage bei 30°C weiterinkubiert worden waren. Mit den Parallelansätzen sollte ein möglicher Einfluß auf spätere Replikationsschritte bis zur viralen Proteinexpression untersucht werden. Bei 37°C behielt das vorhandene Dyn-ts nach der Infektion seine inhibitorische Funktion. Es wurde wegen der Tet-vermittelten Repression jedoch kein neues Protein produziert und das vorhandene über ca. 30 Stunden abgebaut (Abb. 3.5), bzw. war nach 20 Stunden zu gering konzentriert, um Endozytose in den Zellen zu hemmen (Abb. 3.14), könnte jedoch in dieser Zeit die Replikation beeinflussen. Im Gegensatz dazu führte der Wechsel zu 30°C zum unmittelbaren Abschalten des transdominant-negativen Phänotyps (Damke *et al.*, 1995). Durch die Zugabe des RT-Hemmers AZT wurde verhindert, daß etwaige aktive, jedoch noch nicht zu Infektion gekommene Partikel z.B. aus blockierten Endosomen bei nun wieder funktionierender Endozytose in die Zelle eindringen. Die Infektion verlief bei 30°C erheblich langsamer. Bei beiden Ansätzen fand in etwa immer die gleiche Infektions-Reduzierung durch Dyn-ts statt (Abb. 3.18 und 3.19) Dies zeigt, daß die Dyn-ts-Effekte, die mittels

Virusprotein-Expression bei 37°C gemessen wurden, auf frühe Replikationsereignisse bezogen werden können.

4.4 Einfluß von Dyn-ts auf den Zelleintritt von HIV-1

4.4.1 Vergleich der Infektionseffizienz zwischen Dyn-ts- exprimierenden und –nicht-exprimierenden Zellen durch Quantifizierung Virusprotein-exprimierender Zellen

4.4.1.1 Dyn-ts reduziert die HIV-1_{NL4-3} Infektion

Die Reduzierung produktiver HIV-1_{NL4-3}-Infektion bei 37°C durch Dyn-ts war sowohl bei der Virusproteinexpression bei 37°C als auch bei 30°C messbar und betrug reproduzierbar etwa 50 bis 60% (Abb. 3.19). Die Hemmung betrifft die frühen Replikationsschritte des Virus, also die Schritte Zelleintritt, reverse Transkription, Kerntransport und Integration, da der transdominant-negative Wirkung von Dyn-ts nach fünf bis sechs Stunden p.i. durch Wechsel zur permissiven Temperatur bzw. nach ca. 20 Stunden p.i. durch Abbau des Proteins aufgehoben war bzw. die Detektionsmethode keine späteren Ereignisse berücksichtigte.

4.4.1.2 Inhibition der Endosomenazidifizierung erhöht die Infektiosität von HIV-1_{NL4-3}

Durch die Infektion in Anwesenheit von Ammoniumchlorid wurde bestätigt, daß HIV-1_{NL4-3} pH-unabhängig fusioniert. Die durch lysosomotrope Agenzien bedingte Titererhöhung war früher gezeigt worden (Chazal *et al.*, 2001; Fackler & Peterlin, 2000; Aiken, 1997), und deutet darauf hin, daß die virale Infektion in dieser neu etablierten Zelllinie in dieser Hinsicht gleiche Reaktionen zeigt, wie in anderen Zellen beobachtet.

Als Grund für die Titererhöhung wird angenommen, daß durch die Verhinderung der Endosomenansäuerung Partikel in Endosomen weniger schnell degradiert werden und somit größere Chancen haben, eine Infektion durchzuführen (Aiken, 1997). Dies würde voraussetzen, daß Partikel, die in Endosomen internalisiert wurden, fähig sind, eine produktive Infektion zu beginnen und wäre konsistent mit der gemessenen Infektionsreduzierung bei inhibierter Endocytose durch Dyn-ts.

Eine andere Erklärung für die durch lysosomotrope Agenzien induzierte Virustitererhöhung bestünde darin, daß der endocytotische Internalisierungsprozess durch Hemmung der lysosomalen Degradation zum Erliegen kommt und somit mehr Partikel mit der Plasmamembran fusionieren können, bevor sie durch Clathrin-umhüllte pits in einen unproduktiven Aufnahmeweg geleitet werden. Da jedoch auch in Dyn-ts-exprimierenden Zellen die Endozytose gestoppt wird, dies jedoch nicht zu einer Titererhöhung von HIV-1 führte, ist es eher unwahrscheinlich, daß inhibierte Endosomenazidifizierung erhöhte virale Plasmamembranfusion bewirkt.

4.4.1.3 HIV-1_{SF2} Infektion wird durch Dyn-ts reduziert und durch Ammoniumchlorid erhöht

Für das Virusisolat HIV-1_{SF2} war von Fackler & Peterlin gezeigt, daß es im Gegensatz zu HIV-1_{NL4-3} durch niedrige pH-Bedingungen in transfizierten Zellen Syncytium-Bildung induzieren konnte und die Infektion durch die Hemmung der Endosomenansäuerung reduziert wurde. Zudem erhöhte sich - anders als bei HIV-1_{NL4-3} - der infektiöse Titer, wenn es experimentell zur Aufnahme durch einen vesikulären Mechanismus gebracht wurde (Fackler & Peterlin, 2000). Dies ließ eine stärkere Rolle eines endocytotischen Mechanismus für die produktive Aufnahme dieses Virusisolates vermuten. In den hier gezeigten Experimenten wurde konsistent dazu eine Reduktion der Infektion durch Dyn-ts festgestellt, die aber auch für HIV-1_{NL4-3} bestand. Der HIV-1_{SF2}-Titer wurde ähnlich wie bei HIV-1_{NL4-3} durch Ammoniumchlorid angehoben. Dies steht im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen von Fackler & Peterlin, was durch technische Unterschiede bei der Virusproduktion oder in Unterschieden der Zielzellen bedingt sein könnte. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen

Beobachtungen deuten auf einen prinzipiell ähnlichen Eintrittsmechanismus von HIV-1_{SF2} und HIV-1_{NL4-3} hin.

4.4.1.4 Die Infektion des Virusisolats HIV-1_{MVP8161} wird durch Dyn-ts stark reduziert.

Die Infektion von HIV-1_{MVP8161} wurde durch die Expression von Dyn-ts noch stärker (zu 84%) als HIV-1_{NL4-3} (74%) im parallelen Experiment gehemmt (Abb. 3.23). Das Experiment mit dem zur HIV-1 Gruppe O gehörenden Virus zeigte, daß sich die Hemmung Dynamin-vermittelter Prozesse auch bei phylogenetisch weiter entfernten Mitgliedern des HIV Typs 1 auf die frühen Replikationsprozesse negativ auswirkt. Der Unterschied in der Infektionsreduktion zwischen HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{MVP8161} könnte auf unterschiedlich starke Dynamin-Abhängigkeit und evtl. unterschiedlich starke Nutzung von Endozytose zum Zelleintritt bei verschiedenen HIV-1 Isolaten hinweisen.

4.4.1.5 Reduktion der HIV-1 Infektion durch Dyn-ts ist bei der nicht-permissiven Temperatur stärker als bei der permissiven.

Um die Spezifität der Infektionsreduktion durch die temperatur-sensitive Dynamin Mutante zu kontrollieren, wurden Infektionen bei der permissiven Temperatur durchgeführt. Bei dieser Temperatur erfolgt die Clathrin-abhängige Endozytose durch Dyn-ts-exprimierende Zellen wie mit endogenem wt-Dynamin (Abb. 13d' und e'). Infolgedessen sollte es zwischen diesen Zellen und Kontrollzellen keine Unterschiede beim sre-Assay geben. Bei der Infektion mit HIV-1_{NL4-3} wurde jedoch eine Infektionsreduktion bei Dyn-ts-exprimierenden Zellen gemessen, die in etwa der mittleren Reduktion aus den bisherigen Experimenten entsprach (Abb. 3.24). Vergleicht man jedoch direkt die Hemmung der Infektion im parallel durchgeführten Versuch bei der nicht-permissiven Temperatur, war diese doppelt so hoch (Abb. 3.23). Daß Dyn-ts-Protein auch bei der permissiven Temperatur eine unspezifische Hemmung der Genexpression bewirkt, ist unwahrscheinlich, da in keinem Experiment mit

VSV-G-pseudotypisierten Partikeln, deren Zusammensetzung sich nur in der äußere Hülle von HIV-1_{NL4-3} Partikeln unterschied, eine Reduktion der infizierten Zellzahl durch Dyn-ts beobachtet wurde. Zudem wurde für das Virus HIV-1_{MVP8161} keine Reduktion bei der permissiven Temperatur gefunden, dagegen eine sehr starke Reduktion bei 37°C. Die Ergebnisse von Infektionen bei 30°C sind statistisch schwieriger auszuwerten, da die Zahl der infizierten Zellen sehr gering war und relativ stark schwankte. Zudem wurden die Versuche für HIV-1_{NL4-3} nur zweimal und für HIV-1_{MVP8161} nur einmal durchgeführt. Dieses Ergebnis muß daher noch überprüft werden.

4.4.1.6 Die Infektion VSV-G-pseudotypisierter HIV-1 Partikel wird nicht durch Dyn-ts inhibiert

VSV ist ein typisches pH-abhängiges Virus, für das die Zellaufnahme über Clathrin-umhüllte Vesikel beschrieben wurde. Trotzdem wurden mit dem VSV-Glykoprotein pseudotypisierte HIV-1 Partikel im sre-Assay durch Dyn-ts nicht inhibiert sondern die Infektion eher verstärkt (Abb. 3.21 und 3.22). Andererseits konnten sie durch Hemmung der Endosomenazidifizierung komplett blockiert werden und verhielten sich in dieser Hinsicht wie erwartet.

Daß VSV-G-pseudotypisierte Partikel trotz Dyn-ts-bedingter inhibierter Endozytose ungehemmt in den Zellen replizierten, könnte an einer Ansäuerung der an der Plasmamembran hängenden Clathrin-umhüllten Vesikel liegen. Es wurde beschrieben, daß Protonenpumpen an Clathrin-umhüllten Vesikeln vorhanden sind (Forgac *et al.*, 1983), es ist jedoch nicht klar, wann sie dorthin rekrutiert werden. Da diese Vesikel nur etwa eine Minute nach Ablösung stabil sind, bevor die Clathrinhülle dissoziiert, könnte die Rekrutierung noch vor der Vesikel-Ablösung erfolgen. Unter diesen Voraussetzungen könnte in den durch Dyn-ts an der Membran fixierten Vesikeln eine Ansäuerung stattfinden, die die Aktivierung des VSV-Glykoproteins ermöglichen würde.

Für eine Ansäuerung von Dyn-ts-fixierten Vesikeln könnte die Beobachtung sprechen, daß es auch bei Dyn-ts-exprimierenden Zellen zu einer relativen HIV-1-Infektionserhöhung kommt, wenn die Endosomenazidifizierung inhibiert wird (Abb. 3.21 und 3.22). Da angenommen wird, daß die Titererhöhung durch Verhinderung vorzeitiger Partikel-Degradation bei niedrigem pH-Wert zustande

kommt (siehe 4.4.1.2) müßte diese Ansäuerung in fixierten Vesikeln zur Degradation der HIV-1-Partikel führen.

Eine andere Erklärung für die mangelnde Hemmung von HIV1^{VSV-G} Partikeln durch Dyn-ts beruht auf der Beobachtung, daß durch Überexpression der Mutante ein anderer endocytotischer Mechanismus, die wenig charakterisierte „fluid phase pinocytose“ zunächst auf 50% reduziert wird, nach 30min jedoch stark hochreguliert wird (Damke *et al.*, 1995). Dies könnte einen Kompensationsmechanismus für den Verlust der Clathrin-vermittelten Aufnahme darstellen und darauf hinweisen, daß auch die HIV-1^{VSV-G} Partikel-Aufnahme von solchen Kompensationsmechanismen beeinflusst wird.

Insgesamt stellt der hier beobachtete Befund für HIV-1^{VSV-G} Pseudotypen jedoch ein überraschendes Ergebnis dar, das durch zukünftige Untersuchungen bezüglich seiner biologischen Bedeutung für die Aufnahme von VSV-Partikeln überprüft werden muß.

4.4.2 Quantifizierung von HIV-1 RT-Produkten mittels LightCycling

4.4.2.1 Optimierung der quantitativen LightCycler Amplifizierung

Um die Inhibition durch Dyn-ts auf die frühen Replikationsereignisse einzugrenzen, wurden die RT-Produkte einige Stunden nach der Infektion durch LightCycling quantifiziert. Diese Detektionsmethode ist sehr sensitiv, jedoch auch anfällig für Schwankungen, die durch die mehrfache Quantifizierung einer Probe ausgeglichen werden mußten. In manchen Fällen wurden die Ergebnisse zusätzlich durch die Amplifizierung eines anderen viralen Genbereichs (gag) bestätigt. Um Unterschiede bei der Effizienz der DNA-Isolierung oder beim Abwaschen der Zellen auszugleichen, war es nötig, für jede Probe die Kopienzahl des zellulären Gens GAPDH zu ermitteln. Dies gab die Menge der isolierten Gesamt-DNA jeder Probe wieder und wurde zur Normalisierung benutzt.

4.4.2.2 U3-Produkte der Plus-Strang DNA können zwei Stunden p.i. im Zytoplasma nachgewiesen werden

Zur Analyse von entry-Unterschieden sollte das nachzuweisende RT-Produkt möglichst früh nach dem Eintritt entstehen, durfte aber nicht schon im Partikel gebildet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß das intermediäre Plus-Strang DNA U3-Produkt bereits zwei Stunden nach produktiver Infektion detektierbar ist; es findet sich jedoch nicht in freien Partikeln oder in Partikeln, die unproduktiv in Endosomen eingeschlossen vorliegen (Abb. 3.29). Dies stimmt mit Experimenten von Maréchal *et al.* überein, die zeigen, daß p24-Antigen nur dann cytosolische Fraktionen erreicht, wenn virales Material rezeptorvermittelt produktiv aufgenommen werden kann (Maréchal *et al.*, 1998). Außerdem zeigt es, daß die RT-Reaktion in Endosomen nicht weitergeführt wird.

4.4.2.3 Vergleich der Infektionseffizienz zwischen Dyn-ts- exprimierenden und –nicht-exprimierenden Zellen durch Quantifizierung von RT-Produkten

Der Vergleich der U3-Produkte zwischen Dyn-ts-exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen nach fünf Stunden Virusinkubation war in den drei bisher durchgeführten Experimenten inkonsistent. In zwei Versuchen wurde kein signifikanter Unterschied gefunden (Abb. 3.30), während in einem Versuch eine signifikante Reduktion von viralen RT-Produkten in Dyn-ts-exprimierenden Zellen beobachtet wurde (Abb. 3.31). Soweit durchgeführt, bestätigten die Analysen für die Menge an gag-Template jeweils diejenige für die U3-Templates, was darauf schließen ließ, daß sich kein Dyn-ts-induzierter Block zwischen diesen beiden Schritten in der Replikation befand.

Aufgrund der vorhandenen Daten war es noch nicht möglich eine klare Aussage über die Art der Dyn-ts-vermittelten Inhibition auf die Virusreplikation zu machen. Im Verlauf der Experimente wurden Verbesserungen in der technischen Anfertigung der Versuche erreicht. So sollten durch die Wiederholung der Infektionen und der Quantifizierungen der U3- und gag-

Produkte reproduzierbare, einheitliche Ergebnisse erzielt werden können, die zeigen, ob der Dyn-ts-Block bei diesen frühen Ereignissen zu suchen ist.

4.5 Schlußfolgerungen und Möglichkeiten der Dyn-ts-induzierten HIV-1-Infektionsreduzierung

Nach bisherigen Analysen des HIV-1 Zelleintritts wurde allgemein angenommen, daß HIV-1 ausschließlich über die Plasmamembran in das Zytoplasma eindringt (Stein *et al.*, 1987; McClure *et al.*, 1988). Es war zwar beobachtet worden, daß in HeLaP4-Zellen 90% der internalisierten Partikel in Endosomen vorliegen, jedoch wurde diese Aufnahme als unproduktiv angesehen, da sie auch in Zellen, die kein CD4 exprimieren beobachtet wird (Maréchal *et al.*, 1998). Zudem ist die HIV-1-Fusion pH-unabhängig, während alle bisher bekannten Viren, die durch Clathrin-vermittelte Endosomen in die Zelle eindringen einen niedrigen pH-Schritt benötigen. Auch die Internalisierung von CD4 scheint für die Infektion nicht notwendig zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß einer transdominant-negativen Mutante von Dynamin auf HIV-1 Viruseintritt und frühe Replikation untersucht. Dynamin ist für die endosomale Aufnahme Clathrin-umhüllter Partikel notwendig und spielt auch beim Transport von Caveolae Vesikel eine Rolle. Des weiteren interagiert Dynamin mit dem Aktin Zytoskelett.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reduktion von 50-60% an produktiv mit HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{SF2} infizierten Zellen durch Dyn-ts festgestellt. Für das HIV-1 Isolat der Gruppe O (HIV-1_{MVP 8161}) war diese Inhibition sogar noch stärker (84%). Da die genauere Analyse der frühen Replikationsereignisse durch die Quantifizierung der U3-RT-Produkte vorläufig uneinheitliche Ergebnisse brachte, konnte die Natur des Blockes noch nicht festgestellt werden.

Daher lassen sich in Vorwegnahme der weiteren Analysen der U3-RT-Produktmengen in Dyn-ts-exprimierenden und –nicht-exprimierenden Zellen mehrere Möglichkeiten hinsichtlich des Dyn-ts-Blocks beschreiben, die anschließend näher diskutiert werden sollen.

Fall 1: Die Menge an U3-RT-Produkten in Dyn-ts-exprimierenden Zellen ist signifikant niedriger als bei Kontrollzellen

Möglicher Grund:

- a) Die HIV-1-Infektion wird dadurch reduziert, daß Partikel in Clathrin-umhüllten Vesikeln, die an der Plasmamembran verbleiben, nicht zur Infektion kommen
- b) Eine durch Dynamin-vermittelte Aktin-Funktion bei der Endozytose reduziert die Infektion.
- c) Eine andere Dynamin-vermittelte Funktion des Aktin Zytoskeletts reduziert die Infektion.
- d) Die gestörte Ablösung von Caveolae Vesikeln reduziert die Infektion.

Fall 2: Die Menge an U3-RT-Produkten ist in Dyn-ts-exprimierenden Zellen Kontrollzellen etwa gleich

Möglicher Grund für die Hemmung der HIV-Infektion:

- a) Der Transport des RTC bzw. PIC zum Kern ist inhibiert.
- b) Für die Komplettierung der reversen Transkription ist eine Dynamin-abhängige Funktion des Aktin Zytoskeletts nötig
- c) Die Infektionsbedingungen unterscheiden sich technisch von den Experimenten, bei denen die Zahl infizierter Zellen detektiert wurde.

4.5.1 Fall 1: Die Menge an U3-RT-Produkten in Dyn-ts-exprimierenden Zellen ist signifikant niedriger als bei Kontrollzellen

4.5.1.1 Die HIV-1-Infektion wird dadurch reduziert, daß Partikel in Clathrin-umhüllten Vesikeln, die an der Plasmamembran verbleiben, nicht zur Infektion kommen

Die bisher am besten untersuchte Funktion von Dynamin ist die Ablösung von Clathrin-umhüllten Vesikeln von der Plasmamembran unter Hydrolyse von GTP. Dyn-ts hemmt diese Funktion bei der nicht-permissiven Temperatur sehr

wirksam, wobei die Vesikel zwar eingestülpt, jedoch nicht geschlossen werden und nach außen offen an der Plasmamembran verbleiben (Damke *et al.*, 1995, Baba *et al.*, 1999).

Sollte sich nach weiteren U3-Quantifizierungsexperimenten herausstellen, daß es eine signifikante Reduktion der RT-Produkte bei Dyn-ts-exprimierenden Zellen gibt, so könnte das bedeuten, daß HIV-1-Partikel zum Teil durch Dynamin-vermittelt absprossende Clathrin-umhüllte, endocytotische Vesikel in das Zytoplasma transportiert werden und dort mit der endosomalen Membran fusionieren, was durch Dyn-ts eingeschränkt wird. Der Einschluß in diesen, an der Plasmamembran fixierten Endosomen würde bewirken, daß Viruspartikel, die bei ungehinderter Endozytose in das Zytoplasma gelangen würden, aufgehalten werden. Diese Viren würden normalerweise durch Endozytose passiv am gelartigen Aktin cortex vorbeigeschleust und in die Nähe des Zellkern gebracht werden und somit einfacher ein geeignetes Kompartiment zur Replikation erreichen. Da die effektive Hemmung von Clathrin-vermittelter Endozytose nur in 70 bis 85% der Zellen bestand, würde die 50%ige Infektionsreduktion einen erheblichen Anteil an endosomalem Entry bedeuten. Die Infektion wird durch Dyn-ts nicht ganz verhindert. Dies liegt wahrscheinlich nicht nur daran, daß in 15 bis 30% der Zellen die Endozytose unbehindert ist, sondern weist darauf hin, daß ein Teil der Partikel direkt an der Plasmamembran fusionieren kann, bzw. durch die Membran der fixierten Endosomen ins Zytoplasma gelangt. Da etwa 90% aller von HeLaP4-Zellen internalisierten Partikel in Endosomen aufgenommen werden (Maréchal *et al.*, 1998), stellt die produktive endosomale Aufnahme mit etwa 65% Anteil am Entry im Vergleich zum Eintritt über Plasmamembranfusion einen ineffizienteren Weg dar.

Die Erhöhung des HIV-1_{NL4-3}-Titers durch die Verhinderung der Ansäuerung der Endosomen (hier durch die Behandlung mit der milden Base Ammoniumchlorid), könnte ebenfalls auf die partielle Nutzung von endozytotischen Maschinerien hinweisen: durch die Hemmung der endosomalen Azidifizierung könnten mehr Partikel durch die endosomale Membran ins Zytoplasma fusionieren, statt nach kurzer Zeit der Degradation zum Opfer zu fallen (siehe 4.4.1.2).

Obwohl HIV-1 kein saures Milieu zum Eintritt in die Zielzelle benötigt, zeigt jedoch die effiziente Replikation von VSV-G-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln, daß zumindest die Funktion der im Kapsidkern enthaltenen Faktoren durch einen niedrigen pH-Schritt nicht beeinträchtigt wird. Da auch die Fusionsaktivität von HIV-1 Envelope-Proteinen nach Inkubation bei niedrigem pH nicht inhibiert wird (McClure et al., 1988; Stein *et al.*, 1987), ist somit indirekt gezeigt, daß HIV-1 Virionen bei endosomalen Milieubedingungen eine gewisse Zeit stabil und infektiös bleiben.

Das pathogenitätverstärkende HIV-1 Protein Nef steigert die Infektionseffizienz von Partikeln, wenn es in der produzierenden Zelle exprimiert wird (Müller *et al.*, 1995). Werden HIV-1 Partikel durch Pseudotypisierung mit VSV-G in einen produktiven Aufnahmeweg über Clathrin-abhängige Endozytose geleitet, zeigt sich zwischen Nef-enthaltenden und Nef-defizienten Partikeln kein Infektionsunterschied mehr (Aiken *et al.*, 1997; Schaeffer *et al.*, 2001). Der Grund für die Unabhängigkeit von Nef könnte an einer Veränderung des Partikels oder des RTC durch einen niedrigen pH-Schritt liegen (wodurch es z.B. die reverse Transkription-unterstützenden Funktion von Nef nicht länger benötigt) oder darin liegen, daß Endosomen das Partikel in ein für die reverse Transkription geeignetes Kompartiment leiten. Nicht-pseudotypisierte Partikel würden ebenfalls zum Teil durch Endozytose in die Zelle eindringen, jedoch ist der Weg ineffizienter als die direkte Plasmamembranfusion, so daß sich ein Mangel an Nef-Protein stärker auswirkt, die Partikel werden jedoch nicht vollständig durch fehlendes Nef an der Infektion gehindert. Eine Untersuchung ergab, daß die Reinigung von reversen Transkriptionskomplexen aus mit HIV-1^{VSV-G} infizierten Zellen unter mildereren Bedingungen durchgeführt werden kann als aus HIV-1 infizierten Zellen (Fassati A, & Goff, 2001). Auch dies weist auf eine Veränderung des RTC bei Aufnahme durch den endocytotischen Mechanismus hin und würde eher für eine Veränderung des RTC durch den niedrigen pH-Schritt, als für den Transport in ein Infektion erleichterndes Kompartiment sprechen. Die Funktion von Nef im infizierenden Partikel ist noch nicht aufgeklärt, gibt jedoch weitere Hinweise auf eine produktive Rolle der endocytotischen Virusaufnahme.

4.5.1.2 Eine durch Dynamin-vermittelte Aktinfunktion bei der Endozytose reduziert die Infektion

An der Dyn-ts-induzierten Reduktion des HIV-1 Entry durch Hemmung der Endozytose könnte auch Aktin beteiligt sein, das sowohl indirekt als wahrscheinlich auch direkt mit Dynamin interagieren kann. Src-homology 3 Domänen (SH3) enthaltende Interaktionspartner können durch die prolinreiche-Domäne (PRD) am C-Terminus von Dynamin gebunden werden. Solche Partner finden sich bei Faktoren der endocytotischen Maschinerie, die diese mit dem Aktin Zytoskelett verbinden können (Schafer, 2002; Qualmann *et al.*, 2000,; Kessels *et al.*, 2001). Aktin scheint für Endozytose notwendig zu sein (Lamaze *et al.*, 1997), der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt. Das Aktin Zytoskelett könnte die Endozytose-Maschinerie an einer Stelle zusammenbringen, indem es eine physikalische Diffusionsbarriere darstellt bzw. die Komponenten verankert (Qualmann *et al.*, 2000) oder das corticale Zytoskelett muß lokal gelockert werden, um Endozytose zu ermöglichen. Ein weiteres Modell besagt, daß Aktinpolymerisierung am Hals der umhüllten Vesikel nötig sei, um diese nach der Ablösung von der Membran wegzutransportieren. Darauf deuten „Actin comet tails“ hin, das sind komentenschweifartige Aktinengebilde, die bei bakterieller Infektion durch *Listeria* oder bei Vaccinia Virus-infizierten Zellen vermehrt induziert werden und diese Pathogene durch das Zytoplasma „schieben“ (Cudmore *et al.*,1995, 1996;) Sie wurden auch in Assoziation mit Endosomen, Pinosomen, Clathrinumhüllten und sekretorischen Vesikeln beschrieben (Frischknecht *et al.*, 1999; Merrifield *et al.*, 1999; Rozelle *et al.*, 2000) und spielen wahrscheinlich eine Rolle bei deren Mobilität. Es wurde gezeigt, daß Dynamin über die PRD Domäne in diese Aktin tails rekrutiert wird, und die Dynamin-Mutanten K44A und D208N konnten die Anzahl von induzierten Aktin tails reduzieren und ihre Mobilität verlangsamen (Lee *et al.*, 2002).

Die in den hier vorgestellten Experimenten induzierte HIV-1 Infektionsreduzierung durch Dyn-ts könnte durch eine durch Dyn-ts gestörte Aktin-Funktion bei der Endozytose zustandekommen, die jedoch bisher nicht gezeigt wurde und gegebenenfalls zusätzlich zur durch Dyn-ts inhibierten Vesikelablösung wirken könnte.

4.5.1.3 Eine andere Dynamin-vermittelte Funktion des Aktin Zytoskeletts reduziert die Infektion

Einige Studien deuten darauf hin, daß Dynamin in Interaktion mit Aktin auch Endozytose-unabhängige Funktionen in der Zelle ausüben kann. So wurde Dynamin z.B. an Podosomen - aktinreichen Strukturen an Zelladhäsionsstellen – detektiert. Das GFP-Fusionsprotein der 2aa-Spleißvariante von Dyn-ts verhindert diese Strukturen und unterbindet die Aktinanreicherung, während die Dynamin-Mutante K44A dies nicht bewirkt (Ochoa *et al.*, 2000; Qualmann *et al.*, 2000). Dies zeigt, daß es sich nicht um eine sekundäre Folgeerscheinung der Endozytose-Inhibition handelt und weist zudem darauf hin, daß Dynamin direkt oder indirekt auf die Rekrutierung von Aktin Einfluß nehmen kann und dies durch die in dieser Arbeit benutzte Mutante gestört ist. Weiterhin zeigt es, daß Dynamin abgesehen von der Trennung von Membranen weitere Funktionen besitzt, wodurch unterschiedliche Mutationen verschiedene Phänotypen bewirken. Dies könnte auch eine Erklärung für die beobachtete gewisse Hemmung der HIV-1_{NL4-3} Infektion bei der permissiven Temperatur sein. Da nur die Tfn-Aufnahme bei 30°C und 37°C kontrolliert wurde, ist es denkbar, daß Dynamin-Funktionen, die das Zytoskelett betreffen auch bei 30°C inhibiert sind. In einer Untersuchung wurde eine Beteiligung von Aktin bei der frühen HIV-1 Replikation gefunden. Phosphoryliertes Matrixprotein, das in Assoziation mit dem reversen Transkriptionskomplex (RTC) beschrieben wurde, wurde 20 min nach der Infektion in Fraktionen des Zytoskeletts und nach 60 min zusätzlich in nukleären Fraktionen und kaum im Cytosol und in Membranfraktionen gefunden. Durch die Behandlung mit Cytochalasin D (CCD), einem Aktin Polymerisierungsinhibitor, wurde diese Assoziation gehemmt. Späte Produkte der reversen Transkription wurden ebenfalls in Fraktionen des Zytoskeletts sowie im Nukleus gefunden und ihr Auftauchen durch die Behandlung mit CCD verzögert. Der virale Titer wurde durch ebenfalls CCD gesenkt, jedoch nicht, wenn der Inhibitor zwei Stunden nach der Infektion zugegeben wurde (Bukrinskaya *et al.*, 1998). Da kein Einfluß von CCD auf den Virustiter VSV-G pseudotypisierter HIV-1-Partikel festgestellt wurde und dabei die Assoziation von Matrixprotein mit dem Zytoskelett durch CCD nicht verändert war

(Bukrinskaya 1998), ist eine Störung von Endozytose-Prozessen unwahrscheinlich. Diese Studie könnte auf eine funktionelle Beteiligung des Aktin Zytoskeletts an der Komplettierung der reversen Transkription hindeuten, der z.B. die Rekrutierung von geeigneten Faktoren (da im Partikel offensichtlich nicht alle Faktoren vorhanden sind, so daß die reverse Transkription höchstens bis zur Minus-Strang Strong Stop DNA durchgeführt werden kann (Abb. 3.29) oder die Hinleitung des RTC auf ein geeignetes Kompartiment zugrundeliegen könnte.

Sollte Dyn-ts-vermittelte, gestörte Aktinfunktion die Ursache für Reduzierung von U3-Produkten in Dyn-ts-exprimierenden Zellen sein, würde die Beeinflussung dieser frühen RT-Schritte gegen einen gestörten Kerntransport sprechen (siehe 4.5.2.1), es sei denn der Effekt verstärkt sich bei der 2-LTR-Zirkel Quantifizierung gegenüber späten RT-Produkten.

Dieser Effekt durch Dyn-ts wäre jedoch sehr indirekt und unwahrscheinlicher als die Funktion bei der endocytotischen Vesikelablösung.

4.5.1.4 Die gestörte Ablösung von Caveolae Vesikeln reduziert die Infektion

Eine weitere Möglichkeit, die die Inhibition von HIV-1-Infektion durch Dyn-ts erklären könnte, wäre die Beteiligung von Caveolae beim Viruseintritt. Es wurden Hinweise gefunden, daß Dynamin bei der Ablösung dieser Vesikel von der Plasmamembran eine Rolle spielt, da Dynamin am Vesikelhals von Caveolae detektiert wird und mit Caveolin kolokalisiert. Zudem kann die Loslösung der Vesikel durch anti-dynamin-Antikörper oder die Überexpression einer GTPase-defekten Dynamin-Mutante inhibiert werden (Oh *et al.*, 1998; Henley *et al.*, 1998). Die pH-unabhängige Fusion von HIV-1 wäre mit einer möglichen produktiven Aufnahme durch Caveolae konsistent, ebenso wie die Beobachtung, daß HIV-1 cholesterinreiche Mikrodomänen der Zielzelle zum Eintritt nutzt und evtl. auch benötigt (Popik *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2001). Für Simian Virus 40 (SV40) wurde die produktive Aufnahme durch Caveolae beschrieben. SV40 geht dabei zusätzlich ein komplexes Zusammenspiel mit dem zellulären Zytoskelett und den Transportmechanismen der Zelle ein. Es induziert die Rekrutierung von

Dynamin und Aktin durch die vorherige Phosphorylierung von Tyrosin-Resten in Caveolae-Proteinen und verursacht in dessen Folge den vorübergehenden Zusammenbruch der Aktinfaseranordnung. Es werden Aktin „patches“ und schließlich Aktin „tails“ aufgebaut, die die mit einzelnen Partikeln beladenen Caveolae Vesikel zu einem vesikulären Zwischenlager der Partikel transportieren, dem Caveosom. Anschließend werden sie in tubuläre, Caveolin-freie Vesikel sortiert, die sie an Mikrotubuli entlang zum glatten Endoplasmatischen Retikulum bringen, wo die Replikation weitergeführt wird (Pelkmans *et al.*, 2001, 2002).

HIV-1-Fusion wurde bei elektronenmikroskopischen Analysen bis jetzt nur an der Plasmamembran, aus Clathrin-umhüllten Vesikeln (Grewe *et al.*, 1990) und aus Macropinosomen in Macrophagen (Maréchal *et al.*, 2001) gefunden. Diese Ereignisse sind jedoch nur sehr selten festzuhalten und geben schwerlich die relative Nutzung der jeweiligen Wege wider. Außerdem ist die Produktivität dieser Ereignisse auf diesem Wege nicht beweisbar. Um zu unterscheiden, durch welchen der Dynamin-abhängigen Endozytose-Mechanismen HIV-1 aufgenommen wurde, müßten spezifische Inhibitoren für einen der beiden Wege bei der Infektion benutzt werden (siehe 4.6.).

4.5.2 Fall 2: Die Menge an U3-RT-Produkten ist in infizierten Dyn-ts-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen gleich.

4.5.2.1 Der Transport des RTCs bzw. PICs zum Kern ist inhibiert

Ein möglicherweise nach dem Entry etablierter Dyn-ts-Block, der den Transport zum Zellkern betrifft, könnte durch die quantitative Amplifikation von 2-LTR-Zirkeln nachgewiesen werden, die exklusiv im Kern vorkommen (Sharkey *et al.*, 2000, Abb. 3.25) und die Effizienz des viralen Kerntransports widerspiegeln. In diesem Fall würden die Ergebnisse auf einen vom endosomalen (und wahrscheinlich Caveolae-) Transport unabhängigen Dyn-ts-Effekt auf HIV-1 hinweisen, da die U3-Produkte nicht in Endosomen sondern erst im Zytoplasma entstehen können und die U3-Produktmenge in diesem Fall keine Unterschiede aufweisen würde. Somit würden gleiche U3-Produktmengen bei Dyn-ts-

exprimierenden und –nicht–exprimierenden Zellen dafür sprechen, daß Dynamin auf andere Weise den viralen Transport zum Zellkern erleichtert - eventuell über das Zusammenspiel mit Mikrotubuli oder Aktin. Das Aktin Zytoskelett ist, da es nicht zum Zellkern führt, sondern in der Zellperipherie ein Netzwerk ausbildet nicht das optimale Mittel, um für viralen Kerntransport verwendet zu werden. Baculovirus ist jedoch in der Lage, eine Reorganisation zu dicken „actin cables“, die zum Zellkern führen zu induzieren (Ploubidou, *et al.*, 2001).

Dagegen gibt es mehrere Beispiele für Viren, die Mikrotubuli-Komponenten des Zytoskeletts zum zytoplasmatischen Transport gebrauchen. Die Transportfunktion der von der Zellperipherie zur Zellkernnähe gerichteten Mikrotubuli und ihres Motorproteins Dynein wird von verschiedenen Virusarten benutzt, z.B. von Herpes simplex Virus, Adenovirus 2, Pseudorabies Virus, Vaccinia Virus und Adeno-assoziiertem Virus (Ploubidou *et al.*, 2001).

Wenn auch bisher keine Funktion in der Assoziation von Dynamin mit Mikrotubuli gefunden wurde, so bindet Dynamin Mikrotubuli *in vitro* (Shpetner & Vallee, 1989) und könnte somit durch mögliche Störung der Interaktion durch die Dyn-ts Mutante eine HIV-1 Abhängigkeit von Mikrotubuli aufzeigen. Es wurde bereits eine Assoziation von RTC mit Mikrotubuli im Zytoplasma gefunden (Tom Hope, persönliche Mitteilung), allerdings wurde keine Beeinträchtigungen der HIV-1 Infektion durch Nocodazol (ein Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisation) beobachtet (Bukrinskaya *et al.*, 1998).

4.5.2.2 Für die Komplettierung der reversen Transkription ist eine Dynamin-abhängige Funktion des Aktin Zytoskeletts nötig

Die andere Erklärung für eine Dyn-ts-induzierte Infektionshemmung bei unbeeinflusster U3-Template Produktion könnte sein, daß das Umfeld des mit Dynamin interagierenden Aktin Zytoskelett und dessen Faktoren zur Komplettierung der reversen Transkription nötig ist. Dies wäre möglich, aber unwahrscheinlich, da nach der Entlassung des RTC in das Zytoplasma zumindest alle Faktoren in Dyn-ts-exprimierenden Zellen vorhanden wären, um die Produktion von U3-enthaltenden Produkten zu ermöglichen. Daher könnte mit großer Wahrscheinlichkeit die gesamte reverse Transkription durchgeführt

werden. Außerdem wurde bisher kein Unterschied zwischen der Produktion von U3- (frühen) und gag- (späten) Produkten zwischen Dyn-ts-exprimierenden und –nicht-exprimierenden Zellen beobachtet (Abb. 3.30 und 3.31).

4.5.2.3 Die Infektionsbedingungen unterscheiden sich technisch von den Experimenten, bei denen die Zahl infizierter Zellen detektiert wurde

Eine andere Erklärung für die mögliche Unabhängigkeit von Dynamin bei der U3-Produktion könnte auch die Verwendung einer höheren MOI für die LightCycler Versuche (0,3) gegenüber den Versuchen mit der viralen Proteinexpression (0,01) sein, die einen Dyn-ts Effekt durch überproportionalen Anstieg von Plasmamembran-Fusion gegenüber endosomaler Aufnahme überlagern könnte. Dies ist allerdings wenig wahrscheinlich, da auch bei den LightCycler Versuchen in parallelen Proteinexpressionsanalysen 60 bis 70% weniger infizierte Zellen in Anwesenheit von Dyn-ts gezählt wurden.

4.6 Weiterführende Experimente

Um zwischen den Möglichkeiten des Dyn-ts-Einflusses zu unterscheiden, könnten andere Faktoren der endozytotischen Maschinerie ausgeschaltet werden und deren Auswirkung auf die Infektion untersucht werden. Hier bietet sich Eps15 als Angriffspunkt an, das unterhalb von Dynamin den AP2-Komplex mit anderen Faktoren der Clathrin abhängigen Endozytose verbindet. Die transdominant-negative Mutante von Eps15 verhindert effizient die Clathrin-vermittelte Endozytose, ohne Rezeptoren, die durch Caveolae internalisiert werden zu beeinflussen (Benmerah *et al.*, 1996; Lamaze *et al.*, 2001). Zur spezifischen Inhibition des Transports von Caveolae könnte transdominant-negatives Caveolin benutzt werden, das bereits zur Aufklärung des SV40-Zelleintritts benutzt wurde (Pelkmanns *et al.* 2001, 2002).

Wie schon erwähnt, würde die quantitative Amplifizierung von 2-LTR-Zirkeln die Beeinflussung des Kerntransports durch Dyn-ts widerspiegeln. Der Einfluß auf den Kerntransport und auch die Anforderungen des Virus an das Zytoskelett zur

Vervollständigung der reversen Transkription könnte durch Zytoskeletthinhibitoren sichtbar gemacht werden. Der Vergleich der reversen Transkriptionskinetik zwischen VSV-G pseudotypisierten HIV-1-Partikeln und HIV-1_{NL4-3} könnte über eine Veränderung des RTCs bei Viruseintritt durch Endosomen Aufschluß geben. Um virusinduzierte Phosphorylierungsereignisse zu untersuchen, wie sie z. B. bei SV40 vorkommen, kann der Effekt von Kinase-Inhibitoren auf die produktive Infektion analysiert werden. Für solche Analysen bietet sich besonders die Quantifizierung von RT-Produkten an, da Experimente nach nur einigen Stunden und nach wenigen Replikationsschritten abgeschlossen werden können und somit weniger sekundäre Nebeneffekte zeigen und die Methode zudem sehr sensitiv ist.

HIV-1, wie auch andere Viren, haben ein vielschichtiges Zusammenspiel mit ihren Wirtszellen entwickelt, um deren Funktionen für sich nutzbar zu machen. Zelleintritt und Kerntransport von HIV-1 sind noch so wenig erforscht, daß erst jetzt deutlich zu werden beginnt, wie komplex die Interaktionen sind. Es ist nicht möglich, durch einzelne Experimente, die z.B. die Abhängigkeit von pH-Bedingungen und Rezeptorinternalisierung darstellen, den komplexen Eintrittsweg zu bestimmen. Die beobachtete Dynamin-Abhängigkeit der frühen Replikationsereignisse bei HIV-1 unterstützt die Vermutung, daß diese von zellulären Faktoren der Endozytose-Maschinerie und/oder des Zytoskeletts gefördert werden und daß die Verwendung von transdominant-negativen Mutanten dieser Faktoren sowie die quantitative Amplifikation von RT-Produkten geeignet sind, zur Aufklärung der Mechanismen beizutragen.

5 Zusammenfassung

Der Viruseintritt (Entry) in die Zielzelle und der Transport zum geeigneten Zellkompartiment stellen kritische Schritte im Replikationszyklus dar und werden auf unterschiedlichen Wegen erreicht. Während einige Viren wie Paramyxoviren direkt an der Plasmamembran mit der Zelle fusionieren, nutzen andere Viren zelluläre Transportmechanismen, um weiter ins Zellinnere vorzudringen. So werden z.B. Influenza Viren und das vesikuläre Stomatitis verursachende Virus in Clathrin-umhüllten Vesikeln internalisiert und fusionieren erst nach pH-induzierter Konformationsänderung der Fusionsproteine mit der Endosomemembran. Simian Virus 40 wiederum wird durch Caveolae – spezielle Vesikel aus Cholesterolreichen Membraninvaginationen - in die Zelle aufgenommen.

Der Eintritt von HIV-1 erfolgt Rezeptor-vermittelt und pH-unabhängig und es wurde bisher angenommen, daß die Fusion ausschließlich an der Plasmamembran vollzogen wird. Allerdings wird der Großteil der Partikel unspezifisch über Endosomen in die Zelle aufgenommen. Dies wurde bisher als unproduktive Internalisierung eingeschätzt, die in der Degradation der Partikel in Lysosomen resultiert. Gegen diese Annahme spricht, daß bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen neben Partikeln, die mit der Plasmamembran fusionierten auch solche entdeckt wurden, die den Kapsidkern aus endosomalen Vesikeln ins Zytoplasma entließen. Zudem wurde für den Eintritt von HIV-1_{SF2} eine pH-Abhängigkeit aufgezeigt, sowie eine Erhöhung der Infektiosität bei experimentell verstärkter vesikulärer Internalisierung.

Um die Rolle von endozytotischen Prozessen und Transportmechanismen der Zelle beim HIV-1 Eintritt näher zu untersuchen, wurden HeLa-Zelllinien benutzt, die stabil und Tetrazyklin-regulierbar transdominant-negative Mutanten der zellulären GTPase Dynamin exprimieren. Dynamin ist essentiell für die Ablösung von Clathrin-umhüllten endozytotischen Vesikeln von der Plasmamembran und vermittelt dies vermutlich auch bei Caveolae-Vesikeln. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Bildung von „actin tails“, die für die Motilität von zellulären Vesikeln und manchen eingedrungenen Pathogenen wichtig sind. Durch die Transduktion mit dem CD4-Rezeptorgen wurden Zellen, die transdominant-negatives, Temperatur-sensitives Dynamin- (Dyn-ts-) exprimieren für HIV-1 infizierbar gemacht. Bei dieser Dynamin-Mutante wird die GTP-Hydrolyse bei der nicht-permissiven Temperatur inhibiert und die Clathrin-abhängige Endozytose

gehemmt. Es wurden klonale Zelllinien isoliert, die CD4 stabil über mehrere Wochen exprimierten und die endozytische Aufnahme von Transferrin bei der nicht-permissiven Temperatur in bis zu 85% der Zellpopulation inhibierten.

Es wurde ein Versuchsaufbau etabliert, bei dem die Infektionseffizienz in Zellen, die während des Virus Entry keine Dynamin-vermittelte Endozytose durchführten mit derjenigen in nicht-Dyn-ts-exprimierenden Zellen verglichen wurde. Hier ergab sich im Falle von HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{SF2} reproduzierbar eine Reduktion an Virusprotein-exprimierenden Zellen von 50 bis 60% und eine 84%ige Reduktion für das Virusisolat HIV-1_{MVP8161} (Gruppe O). Dies ließ darauf schließen, daß ein Teil der eindringenden Viren bei den frühen Replikationsschritten von Dynamin-vermittelten, zellulären Prozessen abhängig ist. Die Verhinderung der Endosomenansäuerung mit Ammoniumchlorid erhöhte den Virustiter bei HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{SF2} und bestätigte somit vorherige Veröffentlichungen über die pH-Unabhängigkeit von HIV-1_{NL4-3}, stand jedoch im Kontrast zu einer Studie über den HIV-1_{SF2}-Zelleintritt und ließ einen grundsätzlich ähnlichen Entry-Mechanismus für HIV-1_{SF2} wie für HIV-1_{NL4-3} vermuten. Zur präziseren Untersuchung des Dyn-ts-induzierten Blocks wurden die frühen Replikationsphasen mittels quantitativer Real Time PCR-Analyse von reversen Transkriptionsprodukten (RT-Produkte) untersucht. Es wurden RT-Produkte, die nach Eintritt des Virus ins Zytoplasma gebildet wurden zwischen Dyn-ts-exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen quantitativ verglichen. In bisher drei unabhängigen Experimenten wurden jedoch noch keine konsistenten Ergebnisse erzielt. Weitere Experimente müssen aufklären, ob eine Dyn-ts-induzierte Reduktion dieser RT-Produkte besteht. In diesem Fall ließe dies einen zusätzlich zur Plasmamembranfusion vorhandenen endozytischen Entry-Mechanismus bei HIV-1 vermuten, der entweder Clathrin-umhüllte Vesikel oder Caveolae betrifft und durch spezifischere Inhibitoren aufgeklärt werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre die Beteiligung des Aktin Zytoskeletts an der reversen Transkription, die zuvor vorgeschlagen wurde und an der Dynamin beteiligt sein könnte. Eine andere Auswirkung der Störung der Interaktion zwischen Dynamin und dem Aktin Zytoskelett könnte erst nach dem Eintritt eingreifen und den Kerntransport betreffen. Dieser Fall würde zu keiner Reduktion der zytoplasmatischen RT-Produkte durch Dyn-ts führen und könnte durch die quantitative Analyse kernspezifischer, viraler DNA-Produkte belegt werden.

6 Literatur

- Aiken, C. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol* **71**, 5871-7. (1997).
- Amara, A. et al. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha- dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* **186**, 139-46. (1997).
- Anderson, R. G. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**, 199-225 (1998).
- Baba, T. et al. Role of dynamin in clathrin-coated vesicle formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 235-42 (1995).
- Baba, T., Ueda, H., Terada, N., Fujii, Y. & Ohno, S. Immunocytochemical study of endocytotic structures accumulated in HeLa cells transformed with a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Histochem Cytochem* **47**, 637-48. (1999).
- Barre-Sinoussi, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-71. (1983).
- Benmerah, A., Begue, B., Dautry-Varsat, A. & Cerf-Bensussan, N. The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein. *J Biol Chem* **271**, 12111-6. (1996).
- Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* **49**, 347-56. (1987).

- Brown, D. A. & London, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 111-36 (1998).
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A. & Stevenson, M. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* **188**, 2113-25. (1998).
- Bushman, F. D., Fujiwara, T. & Craigie, R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* **249**, 1555-8. (1990).
- Chazal, N., Singer, G., Aiken, C., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D. Human immunodeficiency virus type 1 particles pseudotyped with envelope proteins that fuse at low pH no longer require Nef for optimal infectivity. *J Virol* **75**, 4014-8. (2001).
- Chen, C. & Okayama, H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**, 2745-52. (1987).
- Coffin, J.M., Huges, S.H., & Varmus, H.E. Retroviruses, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y. (1997)
- Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G. & Way, M. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* **378**, 636-8. (1995).
- Cudmore, S., Reckmann, I., Griffiths, G. & Way, M. Vaccinia virus: a model system for actin-membrane interactions. *J Cell Sci* **109**, 1739-47. (1996).
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E. & Schmid, S. L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* **127**, 915-34. (1994).
- Damke, H., Gossen, M., Freundlieb, S., Bujard, H. & Schmid, S. L. Tightly regulated and inducible expression of dominant interfering dynamin

- mutant in stably transformed HeLa cells. *Methods Enzymol* **257**, 209-20 (1995).
- Damke, H., Baba, T., van der Blik, A. M. & Schmid, S. L. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol* **131**, 69-80. (1995).
- Damke, H., Binns, D. D., Ueda, H., Schmid, S. L. & Baba, T. Dynamin GTPase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. *Mol Biol Cell* **12**, 2578-89. (2001).
- Deng, H. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-6. (1996).
- DeTulleo, L. & Kirchhausen, T. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *Embo J* **17**, 4585-93. (1998).
- Dittmar, M.T., Zekeng, L., Kaptue L., Eberle J., Krausslich H.-G., Gurtler L., Coreceptor requirements of primary HIV type 1 group O isolate from Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 May 20, 15(8):707-12
- Doranz, B. J. et al. 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**, 1149-58. (1996).
- Duan, D. et al. Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* **73**, 10371-6. (1999).
- Fackler, O. T. & Peterlin, B. M. Endocytic entry of HIV-1. *Curr Biol* **10**, 1005-8. (2000).
- Fassati, A. & Goff, S. P. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**, 3626-35. (2001).

- Fiedler, K., Kobayashi, T., Kurzchalia, T. V. & Simons, K. Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **32**, 6365-73. (1993).
- Forgac, M., Cantley, L., Wiedenmann, B., Altstiel, L. & Branton, D. Clathrin-coated vesicles contain an ATP-dependent proton pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1300-3. (1983).
- Frankel, A. D. & Young, J. A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25 (1998).
- Frischknecht, F. et al. Tyrosine phosphorylation is required for actin-based motility of vaccinia but not Listeria or Shigella. *Curr Biol* **9**, 89-92. (1999).
- Gabuzda, D. H. et al. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* **66**, 6489-95. (1992).
- Gallo, R. C. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-3. (1984).
- Goff, S. P. Genetics of retroviral integration. *Annu Rev Genet* **26**, 527-44 (1992).
- Grewe, C., Beck, A. & Gelderblom, H. R. HIV: early virus-cell interactions. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**, 965-74 (1990).
- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J. & McNiven, M. A. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **141**, 85-99. (1998).
- Henley, J. R., Cao, H. & McNiven, M. A. Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. *Faseb J* **13 Suppl 2**, S243-7. (1999).

- Hinshaw, J. E. & Schmid, S. L. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-2. (1995).
- Hinshaw, J. E. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 483-519 (2000).
- Kao, S. Y., Calman, A. F., Luciw, P. A. & Peterlin, B. M. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* **330**, 489-93. (1987).
- Kessels, M. M., Engqvist-Goldstein, A. E., Drubin, D. G. & Qualmann, B. Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *J Cell Biol* **153**, 351-66. (2001).
- Kirchhausen, T. Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**, 699-727 (2000).
- Klatzmann, D. et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-8. (1984).
- Kosaka, T. & Ikeda, K. Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *J Cell Biol* **97**, 499-507. (1983).
- Kosaka, T. & Ikeda, K. Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*. *J Neurobiol* **14**, 207-25. (1983).
- Krausslich, H. G. & Welker, R. Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 25-63 (1996).
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R. & Rodriguez-Boulan, E. Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol* **2**, 125-7. (2000).

- Lamaze, C., Fujimoto, L. M., Yin, H. L. & Schmid, S. L. The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J Biol Chem* **272**, 20332-5. (1997).
- Lamaze, C. et al. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* **7**, 661-71. (2001).
- Lee, S., Zhao, Y. & Anderson, W. F. Receptor-mediated Moloney murine leukemia virus entry can occur independently of the clathrin-coated-pit-mediated endocytic pathway. *J Virol* **73**, 5994-6005. (1999).
- Lee, E. & De Camilli, P. Dynamin at actin tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 161-6. (2002).
- Llorente, A., Rapak, A., Schmid, S. L., van Deurs, B. & Sandvig, K. Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* **140**, 553-63. (1998).
- Maddon, P. J. et al. HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4. *Cell* **54**, 865-74. (1988).
- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V. & Cullen, B. R. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**, 254-7. (1989).
- Marechal, V., Clavel, F., Heard, J. M. & Schwartz, O. Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 2208-12. (1998).
- Marechal, V. et al. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol* **75**, 11166-77. (2001).

- McClure, M. O., Marsh, M. & Weiss, R. A. Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *Embo J* **7**, 513-8. (1988).
- McCune, J. M. et al. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**, 55-67. (1988).
- McKeating, J. A., McKnight, A. & Moore, J. P. Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization. *J Virol* **65**, 852-60. (1991).
- Merrifield, C. J. et al. Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol* **1**, 72-4. (1999).
- Miller, A. D. & Buttimore, C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* **6**, 2895-902. (1986).
- Mothes, W., Boerger, A. L., Narayan, S., Cunningham, J. M. & Young, J. A. Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein. *Cell* **103**, 679-89. (2000).
- Muesing, M. A. et al. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**, 450-8. (1985).
- Muesing, M. A., Smith, D. H. & Capon, D. J. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans- activator protein. *Cell* **48**, 691-701. (1987).
- Mullis, K., et al., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50

- Ochoa, G. C. et al. A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J Cell Biol* **150**, 377-89. (2000).
- Oh, P., McIntosh, D. P. & Schnitzer, J. E. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* **141**, 101-14. (1998).
- Pauwels, R. et al. Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *J Virol Methods* **16**, 171-85. (1987).
- Pauza, C. D. & Price, T. M. Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **107**, 959-68. (1988).
- Pelchen-Matthews, A., Clapham, P. & Marsh, M. Role of CD4 endocytosis in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* **69**, 8164-8. (1995).
- Pelchen-Matthews, A., Signoret N, Klasse P.J., Fraile-Ramos A, Marsh, M., Chemokine receptor trafficking and viral replication. *Immunol Rev.* 1999 pr;168:33-49. Review
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. & Helenius, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**, 473-83. (2001).
- Pelkmans, L., Puntener, D. & Helenius, A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**, 535-9. (2002).
- Perez, L. G., O'Donnell, M. A. & Stephens, E. B. The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium

- formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *J Virol* **66**, 4134-43. (1992).
- Ploubidou, A. & Way, M. Viral transport and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 97-105. (2001).
- Poodry, C. A. & Edgar, L. Reversible alteration in the neuromuscular junctions of *Drosophila melanogaster* bearing a temperature-sensitive mutation, *shibire*. *J Cell Biol* **81**, 520-7. (1979).
- Qualmann, B., Kessels, M. M. & Kelly, R. B. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **150**, F111-6. (2000).
- Rosen, C. A., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. Location of cis-acting regulatory sequences in the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6502-6. (1985).
- Roy, A. M., Parker, J. S., Parrish, C. R. & Whittaker, G. R. Early stages of influenza virus entry into Mv-1 lung cells: involvement of dynamin. *Virology* **267**, 17-28. (2000).
- Rozelle, A. L. et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* **10**, 311-20. (2000).
- Salahuddin, S. Z. et al. Restricted expression of human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) in transformed human umbilical cord blood lymphocytes. *Virology* **129**, 51-64. (1983).
- Sambrook, J. & Gething, M. J. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**, 224-5. (1989).

- Schaeffer, E., Geleziunas, R. & Greene, W. C. Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *J Virol* **75**, 2993-3000. (2001).
- Schafer, D. A. Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 76-81. (2002).
- Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E. & Allard, J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* **127**, 1217-32. (1994).
- Sever, S., Damke, H. & Schmid, S. L. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* **1**, 385-92. (2000).
- Sharkey, M. E. et al. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* **6**, 76-81. (2000).
- Shpetner, H. S. & Vallee, R. B. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* **59**, 421-32. (1989).
- Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N. & van der Blik, A. M. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 351-8. (1998).
- Sodeik, B. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol* **8**, 465-72. (2000).
- Stein, B. S. et al. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**, 659-68. (1987).

- Stevenson, M. et al. Integration is not necessary for expression of human immunodeficiency virus type 1 protein products. *J Virol* **64**, 2421-5. (1990).
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad Sci USA* **76**(9), 4350-4
- Tuma, P. L. & Collins, C. A. Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. *J Biol Chem* **269**, 30842-7. (1994).
- van der Blik, A. M. et al. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* **122**, 553-63. (1993).
- Wiskerchen M., Cheng-Mayer, C., HIV-1 Nef association with cellular serine kinase correlates with enhanced virion infectivity and efficient proviral DNA synthesis. *Virology*. 1996 Oct 1;**224**(1):292-301.
- Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A. & Nemerow, G. Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol* **72**, 3455-8. (1998).

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIDS	engl.: aquired immunodeficiency syndrome; erworbenes Immunschwächesyndrom
Amp.	Ampicillin
A	Ammoniumchlorid
AS	Aminosäure
α	anti
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CA	Capsidprotein
ca.	circa
CD	engl.: cluster of differentiation; Oberflächenprotein/-marker
CCD	Cytochalasin D, Aktin Polymerisierungsinhibitor
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
FACS	Engl.: fluorescence adsorbed cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
Env, <i>env</i>	engl: envelope; Hüllprotein; Gen für das Hüllprotein
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Engl.: gravitation; Maß für die Erdanziehungskraft
G	Guanin

Gag; <i>gag</i>	engl.: group specific antigen; virale Strukturproteine / Gen für die viralen Strukturproteine
gp	Glycoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HeBS	engl.: HEPES buffered saline; HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
hp Kit	high pure Kit von Quiagen
HTLV	Humanes T-Zell Leukämievirus
IF	Immunfluoreszenz
IE	infektiöse Einheit
IN	Integrase
inf.	infiziert
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LTR	engl.: long terminal repeat
μ	mikro
m	milli
M	molar
M	Marker
MA	Matrix
MACS	engl.: magnetic antibody cell sorting
min	Minute
MLV	Murines Leukämie Virus
mRNA	engl.: messenger RNA; Boten-RNA
n	nano
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nukleokapsid
Nef, <i>nef</i>	Nef-Protein; Gen für das Nef-Protein
NTC	engl.: non-template control; DNA ohne Primer-Zielregion
O	Oligo
ORF	engl.: open reading frame; offener Leserahmen

p	Plasmid
p.a.	pro analysi
PBMC	engl.: peripheral blood monocytes ; periphere Blutlymphozyten
PBS	engl.: phosphate buffered saline ; Phosphat-gepufferte Salz-lösung
PCR	engl.: polymerase chain reaction ; Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoeithrin
PHA	Phytohaematglutinin
PIC	Präintegrationskomplex
pNL4.3	proviraler Klon von NL4.3
Pol, <i>pol</i>	Polymeraseproteine: PR, RT, IN; Gen für die Polymeraseproteine
PR	Protease
p24	Kapsid-Protein
Ψ; psi	engl.: packaging signal ; Verpackungssignal von HIV
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Reverse Transkriptase
RTC	Reverser Transkription Komplex
sec.	Sekunde
SIV	engl.: simian immunodeficiency virus; Affen-Immundefizienz Virus
sog.	sogenannt
Std	Stunde
SV40	engl.: simian virus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tat, <i>tat</i>	virales Transaktivatorprotein; Gen für das virale Transaktivatorprotein
TE	Tris/EDTA
Tet	Tetrazyklin
TM	Transmembranglykoprotein (gp41)
TMB	Tetramethylbenzidin

Tfn	Transferrin
TX	Texas Red
U	engl.: unit ; Einheit
UV	ultraviolett
Viv	engl.: viral infectivity faktor; ein akzessorisches HIV-1-Protein
Vpr	engl.: viral protein R; ein akzessorisches HIV-1-Protein
Vpu	engl.: viral protein U; ein akzessorisches HIV-1-Protein
VSV	engl.: vesikular stomatitis virus
VSV-G	Hüllprotein des vesicular stomatitis virus
w/v	Gewichts-/Volumenverhältnis
w/w	Gewichts-/Gewichtsverhältnis
z.B.	zum Beispiel
Z	Zelle(n)

Aminosäuren

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

Publikationen

Daecke, J., Müller, B., Dittmar, M. T., Kräusslich H.-G. (2000).

Charakterisierung von HIV-1 Viren mit Epitopmarkierungen in Matrix, Vpr oder Integrase. Posterbeitrag bei der „Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie“ im April 2000 in Wien

Daecke, J., Fackler, O. T., Dittmar, M. T., Kräusslich H.-G. (2002). Inhibition of Dynamin Interferes with Entry of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV 1). Posterbeitrag auf der “Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie” im April 2002 in Erlangen.

Reuter, S., Daecke, J., Griffiths, D. J., McKnight, A., Kräusslich H.-G., Dittmar, M. T. Characterization of a pre-integration block in HIV-2 replication. Posterbeitrag auf der “Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie” im April 2002 in Erlangen.

Lebenslauf

von: **Jessica Daecke**

Persönliche Daten: geboren am 17.05.1972 in Hamburg

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1978 – 1982 Grundschule I Neu Wulmstorf
 1982 – 1984 Orientierungsstufe Neu Wulmstorf
 1984 – 1991 Gymnasium Neu Wulmstorf
 Abschluß: Abitur

Hochschulstudium: WS 91/92 Gasthörerin der Biologie an der Universität Hamburg
 1992 - 1998 Biologiestudium an der Universität Hamburg

Hauptfach: Genetik/Molekularbiologie

Nebenfächer: Zoologie, Mikrobiologie

Projektstudien:

09/1995 – 10/1995 in der Abteilung Immunologie des Bernhard-Nocht-Instituts in Hamburg, Thema: Optimierung von zwei Verfahren (FACS- und APAAP-Färbung) zum Nachweis von CTLA-4-Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen

02/1996 – 03/1996 in der Abteilung Virologie und Zellbiologie des Heinrich-Pette-Instituts in Hamburg, Thema: Klonierung eines induzierbaren eukaryontischen Expressionsvektors für das HIV-Protein Vpu

08/1997 - 05/1998 Diplomarbeit in der Abteilung Zellbiologie und Virologie des Heinrich-Pette-Instituts in Hamburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-G. Kräusslich
 Thema: Einführung von Epitopmarkierungen in Proteine des humanen Immundefizienz Virus und Charakterisierung der veränderten HI-Viren
 20.05.1998 Erhalt des Diploms von der Universität Hamburg

Promotion: 07/1998 - 07/2002 Beginn in der Abteilung Zellbiologie und Virologie des Heinrich-Pette-Instituts in Hamburg; Fortsetzung ab 11/2000 in der Abteilung Virologie des Hygiene Instituts der Universität Heidelberg unter der Leitung von Prof. Dr. H.-G. Kräusslich
 Thema: Untersuchungen zur Rolle von Dynamin beim Eintritt von HIV-1 in humane Zellen
 Gefördert durch ein Stipendium der Ernst Schering Research Foundation

Danksagung

Die hier vorgelegte Arbeit wurde in der Abteilung für Zellbiologie und Virologie des Heinrich-Pette-Instituts für experimentelle Virologie und Immunologie in Hamburg und in der Abteilung Virologie an der Universität Heidelberg in der Zeit vom Juli 1998 bis März 2002 angefertigt.

Ich danke Prof. Hans-Georg Kräusslich für die Bereitstellung des Themas und für die konstruktiven und motivierenden Diskussionen und die positive Arbeitsatmosphäre.

Ebenso bedanke ich mich sehr bei Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Blanche Schwappach vom ZMBH in Heidelberg für die FACS-Sortierung von Zellen bedanken, durch die es mir möglich wurde, klonale Zelllinien herzustellen, auf denen meine Arbeit basiert.

Mein besonderer Dank gilt auch der Ernst Schering Research Foundation, deren finanzielle Unterstützung diese Arbeit ermöglicht hat und deren Organisatoren und Mitglieder mit Einladungen und Gesprächen das Projekt mit regem Interesse verfolgt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Oliver T. Fackler für die hilfsbereite und kompetente Unterstützung und die vielen Ideen.

Ferner möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kollegen vom HPI, Klaus, Doreen Uwe, Axel und Hormozd für die Hilfsbereitschaft und die durchgehend angenehme Atmosphäre bedanken und nicht zuletzt bei Mira, Daniela, Steffi E. und Harry für viel Spaß im Labor und eine tolle Zeit in Winterhude!

Erwähnen will ich hier auch meinen Lieblings-Ex-Kommilitonen Tom, der das ganze „Elend“ von Anfang an mitgekriegt hat und ohne den das Studium nur halb so lustig gewesen wäre.

Meinen Kollegen in der Abteilung in Heidelberg möchte ich danken für die positive Atmosphäre und besonders Lars, Judith, Ellen, Volker, Sylvia, Denis, Jens, Jochen, Walter, Roland, Sandra, Jana und Steffi R., für die immerwährende Hilfsbereitschaft, das Interesse und das offene Ohr für Probleme sowie die gute Laune. Außerdem danke ich insbesondere Lars für die S3-Überwachungsbereitschaft zu jeder Zeit.

Einen besonderen Dank auch an „PD“ (!) Dr. Matthias T. Dittmar für die allumfassende Unterstützung, Ermutigung, den Rat und den Ansporn.

Ich danke Wiebke und Steffi E. für den verlässlichen Beistand und guten Rat in jeder Situation.

Ich danke meinen Freunden Volker (bester bench-Nachbar!), Matthias „der Künstler“, Sylvia, Oli, Dino und Christoph dafür, daß ich mich schließlich in Heidelberg rundherum wohlfühle.

Einen großen Dank schulde ich Oli (für die lebensrettenden Nackenmassagen) und für seine Unterstützung und die Riesenportionen Geduld und Verständnis, um es mit einer gestreßten Hektikerin aufzunehmen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meiner Schwester für die immerwährende Unterstützung und Anteilnahme.