

**Phänotypische Charakterisierung des viralen  
Hüllproteins (Env) von HIV-1  
durch Konstruktion rekombinanter HIV-1-Varianten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Stefanie Reinberger**

aus Biberach/Riß

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. G. Adam

Tag der Disputation: 22. Februar 2002

Hamburg, den 10. Februar 2002



A handwritten signature in black ink, appearing to read "U. Wienand".

Professor Dr. U. Wienand  
Dekan

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Entdeckung und Klassifizierung der Humanen Immundefizienzviren.....	1
1.2 Morphologie von HIV-1 .....	2
1.3 Die Genomstruktur von HIV-1.....	3
1.4 Der Replikationszyklus von HIV .....	5
1.5 Variabilität von HIV-1.....	6
1.6 Eintritt von HIV-1 in die Wirtszelle .....	8
1.6.1 Rezeptoren von HIV-1 .....	8
1.6.2 Interaktion zwischen Hüllprotein und Rezeptoren.....	11
1.7 HIV und T-Zelldifferenzierung .....	13
1.7.1 T-Zelldifferenzierung im Thymus .....	14
1.7.2 Der Einfluss einer HIV-Infektion auf die T-Zell-Differenzierung .....	16
1.8 Aufgabenstellung .....	16
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1 Material.....	18
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	18
2.1.3 Kits .....	19
2.1.4 Enzyme .....	19
2.1.5 Oligonukleotide .....	19
2.1.6 Medien und Reagenzien für die Arbeit mit Bakterien.....	20
2.1.7 Materialien für die Zellkultur.....	21
2.1.8 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur .....	21
2.1.9 Zelllinien.....	22
2.1.10 Blutproben .....	23
2.1.11 Tiere .....	23
2.1.12 Antikörper .....	23
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	24

2.2.1 Gentechnische Arbeiten.....	24
2.2.2 Kultivierung und Konservierung von E. coli Stämmen.....	24
2.2.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	25
2.2.4 Transformation von Bakterien .....	25
2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	25
2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	26
2.2.7 Alkoholpräzipitation von DNA .....	26
2.2.8 Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen.....	27
2.2.9 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen.....	27
2.2.10 Isolierung von DNA-Fragmenten.....	27
2.2.11 Extraktion genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen.....	28
2.2.12 Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	28
2.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten.....	29
2.2.14 Sequenzierung.....	29
2.2.15 Computerunterstützte Sequenzanalyse .....	30
2.3 Zellbiologische und virologische Methoden.....	30
2.3.1 Zellkultur.....	30
2.3.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	30
2.3.3 Isolierung von Peripheren Blutlymphozyten (PBMC).....	31
2.3.4 Präparation von Makrophagen.....	31
2.3.5 Transfektion von Zellen zur Herstellung von Virusüberständen.....	31
2.3.6 Infektion von Indikatorzelllinien.....	32
2.3.7 Infektion von PBMC .....	32
2.3.8 Infektion von Makrophagen.....	33
2.3.9 Inhibition der HIV-1-Infektion durch AMD3100.....	33
2.3.10 Detektion infizierter Zellen durch Immunfärbung .....	33
2.3.11 ELISA zum Nachweis von Virus im Kulturüberstand.....	34
2.3.12 MACS-Separation von CD34-positiven Zellen.....	35
2.3.13 Markierung von Zellen mit Antikörpern für die FACS-Analyse .....	36
2.3.14 Markierung von Zellen mit PKH-26 .....	36
2.3.15 Expansionskultur von CD34-positiven Zellen.....	36
2.3.16 <i>in vitro</i> Makrophagendifferenzierung .....	37
2.3.17 Kokultur von CD34-positiven Zellen mit der Zelllinie L88.....	37
2.3.18 Optimiertes Protokoll für FTOC.....	38

3 Ergebnisse .....	39
Teil I - Herstellung und Charakterisierung rekombinanter HIV-1-Klone .....	39
3.1 Amplifikation des <i>env</i> -Genes aus HIV-1-Patienten.....	40
3.2 Klonierung der amplifizierten <i>env</i> -Gene.....	42
3.3 Untersuchung zur <i>in vivo</i> Variabilität der klonierten <i>env</i> -Gene .....	43
3.3.1 Untersuchung der V3-Variabilität.....	43
3.3.2 Untersuchung der Variabilität in der V1-V2-Region.....	50
3.4 Phänotypische Charakterisierung der rekombinanten HIV-1-Klone .....	59
3.4.1 Transfektion der rekombinanten HIV-1-Klone .....	59
3.4.2 Ermittlung der <i>in vitro</i> genutzten Korezeptoren durch Infektion von Indikatorzelllinien.....	60
3.4.3 Inhibition der Infektion durch AMD3100 .....	63
3.4.4 Infektion von peripheren Blutlymphozyten.....	65
3.4.5 Infektion von Makrophagen.....	67
3.5 Die rekombinanten Virusklone weisen eine deutliche Variabilität auf.....	68
3.6 Korrelation von Phänotyp und Krankheitsstatus .....	69
3.7 Untersuchungen zur Vorhersage des Phänotyps.....	70
Teil II – Etablierung eines Zellkultursystems zur <i>in-vitro</i> Differenzierung von T- Zellen.....	74
3.8 Präparation von CD34 <sup>+</sup> -Stammzellen.....	74
3.9 Die isolierten CD34 <sup>+</sup> Zellen können zur Proliferation angeregt werden.....	75
3.10 Überprüfung des Differenzierungspotentials der CD34 <sup>+</sup> -Zellen.....	78
3.10.1 Die aufgereinigten Stammzellen sind CD34/AC133-doppelpositiv.....	78
3.10.2 Die CD34-positiven Zellen lassen sich <i>in vitro</i> zu Makrophagen ausdifferenzieren.....	79
3.11 Erster Versuch der T-Zelldifferenzierung: Kokultur mit L88-Zellen.....	82
3.11.1 Bestrahlung der L88-Zellen.....	82
3.11.2 Markierung der CD34-positiven Zellen mit PKH-26.....	83
3.11.3 CD34-positive Stammzellen differenzieren in Kokultur mit L88-Zellen nicht zu reifen T-Zellen.....	86

3.11.4 Kokultur von humanen Stammzellen mit L88-Zellen führt zur Entwicklung von CD14-positiven Zellen.....	87
3.12 Versuch der <i>in vitro</i> T-Zell-Differenzierung durch FTOC .....	89
3.12.1 Präparation von fötalem murinem Thymus und Etablierung der Bedingungen für die Organkultur .....	89
Tab. 3.14 Etablierung der Kulturbedingungen für die Organkultur.....	90
3.12.2 Die Kulturbedingungen sind für die Differenzierung muriner Thymozyten geeignet .....	90
3.12.3 Depletion der murinen Thymozyten durch 2-desoxy-Guanosin.....	93
3.12.4 Einwandern humaner CD34-positiver Zellen in den murinen Thymus ....	93
3.12.5 Die eingewanderten CD34-positiven Zellen differenzieren nicht zu T-Zellen.....	95
3.12.6 Verlust der eingewanderten humanen Zellen nach sieben Tagen Kultur	96
3.12.7 Ausblick.....	98
4 Diskussion.....	99
4.1 Herstellung replikationskompetenter HIV-1-Klone durch long-range PCR ..	99
4.2 <i>in vitro</i> Variabilität der gp120-Regionen V1-2 und V3.....	100
4.3 Die rekombinanten Virusklone zeigten einen sehr variablen Phänotyp.....	103
4.4 Korreliert der Phänotyp mit dem Krankheitsstatus der Patienten? .....	107
4.5 Der Phänotyp von HIV-1-Isolaten kann anhand der Aminosäuren-sequenz des V3-loop vorhergesagt werden.....	109
4.6 Etablierung eines <i>in vitro</i> T-Zell-Differenzierungssystems.....	112
5 Zusammenfassung .....	122
6 Literatur .....	125
7 Anhang .....	140
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	140
7.2 Aminosäuren.....	143

# 1 Einleitung

## 1.1 Entdeckung und Klassifizierung der Humanen Immundefizienzviren

Im Jahr 1981 wurde in den USA ein bis dahin unbekanntes Krankheitsbild einer schweren Immundefizienz beschrieben (Gottlieb *et al.*, 1981; Masur *et al.*, 1981). Die betroffenen Patienten befanden sich in einem schlechten Allgemeinzustand und wiesen verschiedene opportunistische Infektionen auf. Auffallend war die Häufigkeit von sonst seltenen Krankheiten wie *Pneumocystis carinii*-Pneumonie (Gottlieb *et al.*, 1981) und Kaposi Sarkom (Schroff *et al.*, 1983). Die Prognose für die Patienten war außerordentlich schlecht. Ein Jahr nach der Beschreibung der ersten Krankheitsfälle wurde das variable Krankheitsbild als erworbenes Immunschwächesyndrom (engl.: acquired immuno-deficiency syndrome, AIDS) zusammengefasst.

Am Pasteur-Institut in Paris wurde 1983 aus dem Lymphknoten eines Lymphadenopathie-Patienten ein bisher unbekanntes Retrovirus isoliert (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). Dieses zunächst als Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV) bezeichnete Virus wurde 1984 mit der AIDS-Erkrankung in Verbindung gebracht (Brun-Vézinet *et al.*, 1984). Im selben Jahr wurden von zwei amerikanischen Arbeitsgruppen weitere bisher unbekannte Retroviren isoliert: das Humane T-Zell lymphotrophe Virus Typ III (HTLV III; Popovic *et al.*, 1984) und das „AIDS-related virus“ (ARV; Levy *et al.*, 1984). Vergleichende Sequenzierung der Virusisolate zeigte eine große Homologie zwischen den Virusgenomen (Hahn *et al.*, 1984; Ratner *et al.*, 1985). Alle drei Isolate wurden 1986 unter dem Namen Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (engl.: human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) zusammengefasst (Coffin *et al.*, 1986). In der Zwischenzeit unterscheidet man drei phylogenetische Gruppen von HIV-1: die Gruppe M („main phylogenetic group“), der die meisten Isolate zugeordnet werden, und die für die weltweite AIDS-Pandemie verantwortlich gemacht wird, und die selteneren Gruppen O („Outliner“) und N (non-M/non-O), deren Vorkommen bislang weitgehend auf Zentralafrika beschränkt ist. Die weit verbreitete Gruppe M wird zusätzlich in zehn Subtypen (A-J) unterteilt, wobei in Europa hauptsächlich Subtyp B verbreitet ist.

Neben HIV-1 wurde 1986 aus einem westafrikanischen AIDS-Patienten ein weiteres Retrovirus isoliert (Clavel *et al.*, 1986a), das sich in seiner

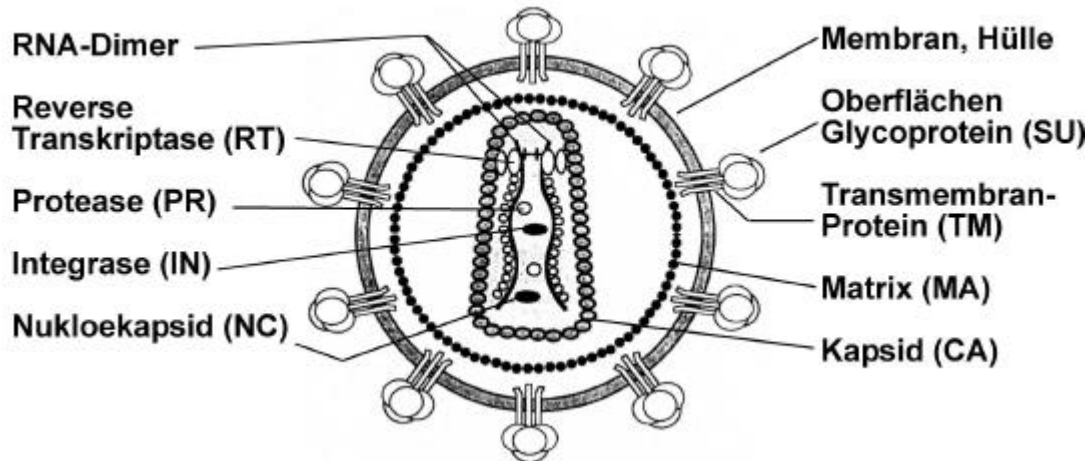
Genomstruktur und Seroreaktion deutlich von den bis dahin bekannten Isolaten unterschied (Clavel *et al.*, 1986b). Dieses Virus wurde als HIV-2 bezeichnet. Aufgrund der morphologischen (Gelderblom *et al.*, 1987) und genomischen (Gonda *et al.*, 1985) Eigenschaften wurde HIV-1 der Familie der Lentivirinae zugeordnet, einer Unterfamilie der Retroviridae. Allen Retroviren ist gemeinsam, dass die Viruspartikel von einer Lipiddoppelschicht umhüllt sind und ein Genom aus zwei Ribonukleinsäure (RNA)-Molekülen aufweisen. Außerdem besitzen alle das Enzym Reverse Transkriptase, das die Umschreibung der (+)RNA in doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) katalysiert (Baltimore, 1970). Die doppelsträngige DNA wird dann als Provirus in das Genom der infizierten Zelle integriert. 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“). Retroviren werden vor dem Hintergrund ihrer evolutionären Entwicklung in sieben Gruppen unterteilt: Lentiviren, Spumaviren und fünf weiteren Gruppen, deren Vertreter aufgrund ihres onkogenen Potentials früher als Onkoviren bezeichnet wurden (Coffin *et al.* 1997).

## 1.2 Morphologie von HIV-1

HIV-1 ist das am besten untersuchte Lentivirus. Das Virion hat einen Durchmesser von etwa 140 nm. Wie bei allen Retroviren ist der Virusinnenkörper (Nukleokapsid) von einer Lipiddoppelmembran umhüllt, die von der Wirtszelle stammt. In der Hülle ist das virale Transmembranprotein gp41 (TM) eingelagert, das nichtkovalent mit dem Oberflächenglycoprotein gp120 (SU) verknüpft ist (Gelderblom *et al.*, 1991). Die Membran ist auf der Innenseite von dem Matrixprotein p17 (MA) ausgekleidet (Gelderblom *et al.*, 1991). Im Inneren des reifen Viruspartikels befindet sich das Kapsid, das aus p24-Proteinen (CA) besteht und eine für Lentiviren charakteristische konische Form hat (Gelderblom *et al.*, 1991). Das Kapsid enthält das Virusgenom, das aus zwei einzelsträngigen (+)RNA-Molekülen besteht. Die RNA liegt als Dimer vor, ist über das Nukleokapsid Protein p7 (NC) gebunden und bildet zusammen mit der Reversen Transkriptase (RT) und der Integrase (IN) den Ribonukleoproteinkomplex. Weitere wichtige Bestandteile des Viruspartikels



sind die virale Proteinase, akzessorische virale Proteine und zelluläre Proteine wie z.B. Cyclophilin (Luban *et al.*, 1993; Franke *et al.*, 1994; Thali *et al.*, 1994).



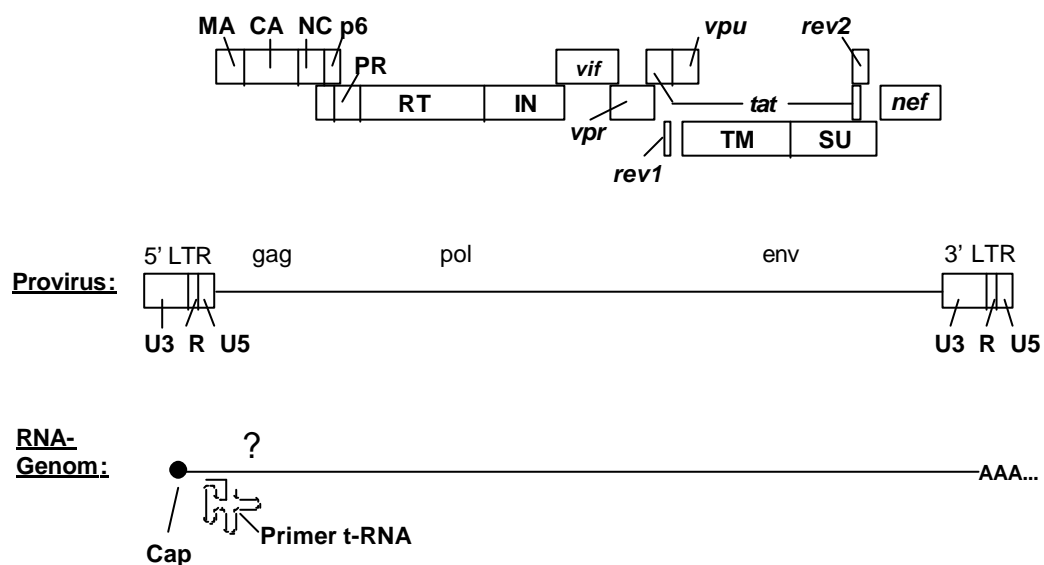
**Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines HIV-1 Virions**  
Dargestellt ist ein typisches HIV-1-Virion (nach Luciw *et al.*, 1996)

### 1.3 Die Genomstruktur von HIV-1

Die Organisation des 9 kb langen Genoms von HIV-1 ähnelt der anderer Retroviren. Das RNA-Genom ist am 3'-Ende polyadenyliert und enthält am 5'-Ende eine charakteristische „Cap-Struktur“. Die kodierende Region des Genoms wird von regulatorischen Sequenzwiederholungen (engl.: long terminal repeats; LTR) flankiert, die aus der R-Region (engl.: repeat-region) und der U3- bzw. U5-Region (engl.: unique region) bestehen. Die LTRs sind für die Initiation und die Termination der Transkription verantwortlich. Alle Retroviren enthalten in ihrem Genom die Strukturgene *gag*, *pol* und *env*. Das Genprodukt von *gag* ist das gruppenspezifische Antigen, bei HIV-1 ein 55kD Polyprotein, das die inneren Strukturproteine Matrix (MA), Capsid (CA), Nucleokapsid (NC) und p6 umfasst. Die enzymatischen Aktivitäten von HIV-1, Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN), werden von *pol* codiert. Der offene Leserahmen (engl.: open reading frame; ORF) von *pol* überlappt mit dem von

*gag*, weshalb die *pol*-Gene durch einen Wechsel des Leserahmens („frameshift“) exprimiert werden. Dies führt bei ca. 5% der Gag-Transkripte zur Produktion des Gag-Pol Fusionsproteins (Jacks 1990). *Env* kodiert für die Glycoproteine der Virushülle, die als das Vorläuferprotein gp160 synthetisiert und dann durch eine zelluläre Protease geschnitten werden, wobei das Oberflächenprotein gp120 (SU) und das Transmembranprotein gp41 (TM) entstehen.

HIV-1 verfügt als komplexes Retrovirus über sechs weitere offene Leseramen, die unter anderem für die regulatorischen Proteine Tat und Rev kodieren, die die virale Transkription aktivieren (Tat) bzw. den Transport unvollständig oder nicht gespeißter viraler RNAs ermöglichen (Rev). Weitere akzessorische Proteine sind Nef, Vpu, Vpr, und Vif, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. (Frankel und Young, 1998).



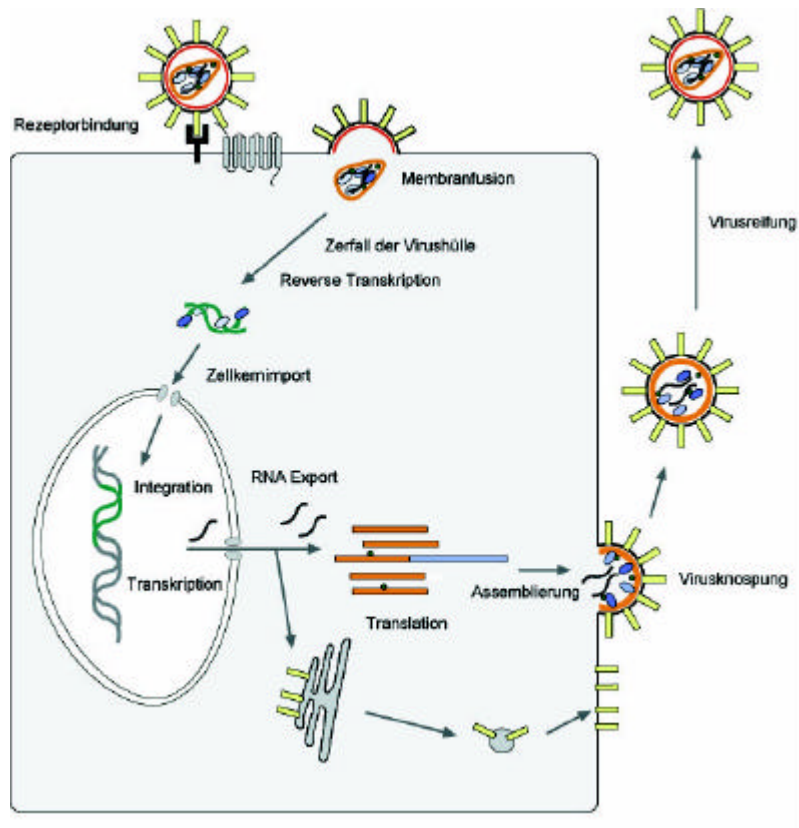
### Abb.1.2: Genomorganisation von HIV-1

Der Obere Teil der Abbildung zeigt die offenen Leserahmen der viralen Proteine (Nomenklatur nach Leis *et al.*, 1988): MA: Matrix; CA: Kapsid; NC: Nukleokapsid; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; IN: Integrase; TM: transmembranales Glykoprotein (gp 41); SU Oberflächen-Glykoprotein (gp120). Die akzessorischen Proteine sind kursiv dargestellt. Im mittleren Teil ist die provirale DNA dargestellt und im unteren das RNA-Genom mit dem Verpackungssignal (?) und der Primer t-RNA.

## 1.4 Der Replikationszyklus von HIV

Die Infektion einer Zelle mit HIV beginnt mit der Bindung des viralen Glycoproteins gp120 an den CD4-Rezeptor der Zielzelle (Klatzmann *et al.*, 1984) und einen Korezeptor, der zur Familie der Chemokinrezeptoren gehört (Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996). Dieses Bindungsereignis induziert konformelle Veränderungen im Transmembranprotein gp41, die zur Fusion der Virusmembran mit der Plasmamembran der Zielzelle und zur Freisetzung des Viruskapsids in das Zytoplasma führen (Perez *et al.*, 1992; Gabuzda *et al.*, 1992). Noch im Zytoplasma wird das RNA-Genom mit Hilfe der Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Nach der Dissoziation der Kapsidhülle formiert sich der Präintegrationskomplex (PIC), der vermutlich aus dem viralen Genom in Form von doppelsträngiger DNA, Matrixmolekülen, Reverser Transkriptase, Integrase und Vpr besteht. Der PIC wird dann in den Zellkern transportiert, wo das virale Enzym Integrase die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom katalysiert (Brown *et al.*, 1987; Bushman *et al.*, 1990). Die DNA dieses Provirus wird nun unter Ausnutzung der zellulären Maschinerie transkribiert, wobei zunächst die Gene *tat*, *rev* und *nef* transkribiert werden (Muesing *et al.*, 1985). Dabei dient Tat nach Bindung an seinen cis-regulatorischen Faktor TAR zur Erhöhung der Transkriptionsrate (Kao *et al.*, 1987; Muesing *et al.*, 1987). Das virale Protein Rev transportiert ungespleißte RNAs und unvollständig gespleißte mRNAs, die für Strukturproteine kodieren, in das Zytoplasma (Rosen *et al.*, 1985; Malim *et al.*, 1989). Env wird im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert und nach der Glycosylierung über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert. Dort wird das unprozessierte gp160-Vorläuferprotein mit Hilfe zellulärer Proteasen in das Oberflächenprotein gp120 und das Transmembranprotein gp41 gespalten, die nicht kovalent verbunden und als Oligomere in die Zellmembran eingelagert werden (McCune *et al.*, 1988). Im Gegensatz dazu erfolgt die Translation der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine im Zytoplasma. 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 unter Aufnahme der Hüllproteine aus der Zellmembran knospen. Bereits außerhalb der Wirtszelle werden die Gag- und Gag-Pol-Polyproteine mit Hilfe der viralen

Protease in ihre Bestandteile (Matrix, Kapsid, Nucleokapsid, p6, Protease Reverse Transkriptase und Integrase) gespalten, wodurch reife Viruspartikel entstehen.



**Abb.1.3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV-1**

Die Abbildung zeigt wichtige Schritte im Replikationszyklus von HIV-1. Die einzelnen Schritte sind im Text erklärt.

### 1.5 Variabilität von HIV-1

Wie bei vielen anderen Lentiviren, findet man bei HIV eine große Anzahl an Sequenzvariationen zwischen den Isolaten aus verschiedenen Patienten (Shaw *et al.*, 1984; Wain-Hobson *et al.*, 1985). Diese hohe Variabilität wird vor allem auf die hohe Fehlerrate bei der Reversen Transkription zurückgeführt. Die Reverse Transkriptase verfügt im Gegensatz zu anderen DNA-Polymerasen über keinen Mechanismus zum Korrekturlesen der synthetisierten DNA, wodurch es zu einer hohen Mutationsrate kommt. Auch im Vergleich zu den Reversen Transkriptasen anderer Retroviren zeigt die von HIV-1 eine *in vitro* zehnfach erhöhte Fehlerrate (Preston *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988). Die

hohe Mutationsrate erlaubt dem Virus, sich permanent vor der Immunreaktion der Körpers zu schützen und Resistenzen gegen antivirale Therapeutika zu entwickeln. Zum Zeitpunkt der Serokonversion findet man in einem Patienten meistens eine sehr homogene Viruspopulation (Zhu *et al.*, 1993), während man in langzeitinfizierten Individuen die Entwicklung von sogenannten Quasispezies beobachtet, die sich in Sequenz und Phänotyp oft stark unterscheiden. (Simmonds *et al.*, 1990).

Der unterschiedliche Virusphänotyp spiegelt sich im Wirtszelltropismus wider. Frühe HIV-1-Isolate wurden auf immortalisierten T-Zelllinien herangezüchtet und durch extensives Passagieren an diese adaptiert. Diese T-Zell-adaptierten Virusstämme haben die Eigenschaft große Syncytien in T-Zelllinien und peripheren Blutlymphozyten (engl.: peripheral blood monocytes; PBMC) zu induzieren, weshalb sie als Syncytium-induzierende (SI) Viren bezeichnet werden. Der größte Teil der T-Zell-adaptierten Stämme repliziert in Makrophagen nur ineffizient (Ho *et al.*, 1986; Nicholson *et al.*, 1986). Diese Virusstämme stellen Prototypen für primäre SI-Viren dar, die aus etwa 50% der symptomatischen HIV-1-Patienten isoliert werden (Koot *et al.*, 1993; Schuitemaker *et al.*, 1992). Primäre SI-Viren sind ebenfalls in der Lage T-Zelllinien zu infizieren und Syncytien zu induzieren, während ihre Fähigkeit Makrophagen zu infizieren kontrovers ist. Der Großteil der HIV-1-Isolate, indem auch die aus asymptomatischen Patienten enthalten sind, infizieren Makrophagen und primäre T-Zellen, sind aber nicht in der Lage in T-Zelllinien zu replizieren. Außerdem induzieren sie keine Syncytien in PBMC, weshalb sie als nicht-Syncytium-induzierende (NSI) Viren bezeichnet werden. Heute weiss man, dass der unterschiedliche Zelltropismus auf die Korezeptornutzung zurückgeführt werden kann, und dass NSI-Viren CCR5 als Korezeptor nutzen, während SI-Viren in der Lage sind, die Zielzelle über CXCR4 oder beide Chemokinrezeptoren zu infizieren (siehe 1.6.1).

Die größte Sequenzvariabilität findet sich im *env*-Gen, was darauf zurückgeführt werden kann, dass das Hüllprotein dem stärksten immunologischen Druck ausgesetzt ist. Innerhalb des Oberflächenglykoproteins gp120 werden fünf konservierte (C1-C5) und fünf variable Regionen (V1-V5) unterschieden (Alizon *et al.*, 1986; Starcich *et al.*, 1986). Als variabel werden dabei Regionen bezeichnet, bei denen nicht mehr als 25% der Aminosäurereste konserviert sind

(Modrow *et al.*, 1987). Die variablen Regionen weisen dabei nicht nur Aminosäuresubstitutionen auf, sondern häufig auch kurze Insertionen oder Deletionen (Alizon *et al.*, 1986; Starcich *et al.*, 1986).

Die variablen Regionen V3 und V1-V2 sind am Eintritt des Virus in die Wirtszelle beteiligt (Wyatt *et al.*, 1995) und sollen an dieser Stelle genauer beschrieben werden. Die dritte variable Region (V3) gilt als Haupt-Neutralisationsdomäne des gp120 (Moore und Nara, 1991; Parren *et al.*, 1999) und kann die humorale Immunantwort des Wirtes induzieren (Haigwood *et al.*, 1991; Clerici *et al.*, 1989; 1991). Die V3-Domäne ist im Durchschnitt 33 Aminosäuren lang und besitzt neben den Cysteinresten, die die Schleife begrenzen, ein weiteres konserviertes Motiv, das die Spitze des V3-loop bildet. Dieses Motiv dient unter anderem als Merkmal zur Einordnung von Isolaten zu verschiedenen Subtypen. Der in Europa vorherrschende Subtyp B zeichnet sich durch die konservierte Sequenz GPGR aus.

Für die V1-V2-Region wurden neben den begrenzenden Cysteinresten keine derartigen konservierten Motive beschrieben. Vielmehr scheint die Variabilität dieser Regionen noch höher zu sein als bei V3, was sich vorallem in der stark variierenden Länge der Sequenzen zeigt

## **1.6 Eintritt von HIV-1 in die Wirtszelle**

Ein Großteil der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit basiert auf dem Zusammenspiel von gp120 und den zellulären Rezeptoren beim Eintritt von HIV in die Zelle. Aus diesem Grund soll der Viruseintritt in die Zelle genauer beschrieben werden.

### **1.6.1 Rezeptoren von HIV-1**

Schon zu Beginn der AIDS-Epidemie zeigten Untersuchungen, dass HIV-1 bevorzugt T-Helferzellen infiziert (Klatzmann *et al.*, 1984a). Es stellte sich heraus, dass der charakteristische Oberflächenmarker dieser T-Helferzellen, CD4 als Rezeptor für die HIV-Infektion dient (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984b).

Schon bald zeigte sich jedoch, dass für effizienten Viruseintritt in die Wirtszelle weitere Kofaktoren oder Korezeptoren notwendig sind (Sattentau und Weiß, 1988), da die Expression von CD4 nicht bei allen Zelltypen eine Infektion erlaubt. Versuche, bei denen humaner CD4-Rezeptor auf nicht-Primates-Zellen, wie z.B. Mauszellen exprimiert wurde, zeigten, daß CD4 nicht als alleiniger Rezeptor für HIV dienen kann (Clapham *et al.*, 1991; Maddon *et al.*, 1986). Es wurde außerdem deutlich, dass die zusätzlich notwendigen Faktoren humanspezifisch sein müssen. Dies und die Tatsache, dass die Zusammensetzung des Hüllproteins sich auf die Fähigkeit Makrophagen zu infizieren auswirkt (Cheng-Mayer *et al.*, 1990), ließ darauf schließen, dass der Zelltropismus von HIV-1 durch diese unbekanntenen Korezeptoren geprägt wird (Broder und Berger, 1995).

Nach langer intensiver Forschung, konnte schließlich ein mit einem G-Protein verbundener Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen (engl.: seven transmembrane G protein coupled receptor; 7TM GPCR) als Korezeptor für HIV-1 identifiziert werden. Es handelte sich dabei um den Chemokinrezeptor CXCR4 (Feng *et al.*, 1996). CXCR4 dient als Korezeptor für T-Zell-adaptierte Laborstämme, was vermuten ließ, dass die makrophagentropen Isolate einen weiteren Korezeptor nutzen. Cocci *et al.* publizierten 1995, den inhibitorischen Effekt der  $\beta$ -Chemokine RANTES (engl.: regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted), MIP-1 $\alpha$  (engl.: macrophage inflammatory protein) und MIP-1 $\beta$  auf makrophagentrope Viren. Kurz darauf wurde der dazugehörige Rezeptor CCR5 gefunden (Samson *et al.*, 1996), der als Korezeptor für makrophagentrope HIV-1 Isolate identifiziert wurde (Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996). Doranz *et al.*, zeigten 1996, dass es neben CCR5 bzw. CXCR4-nutzenden Viren auch solche gab, die beide Rezeptoren nutzen konnten und damit dualtrop waren. In der Zwischenzeit wurden weitere mögliche Korezeptoren für die HIV-1-Infektion entdeckt, die allesamt Mitglieder der 7TM GPCR-Familie sind (Tabelle 1.1). Diese alternativen Korezeptoren werden mit geringerer Effizienz genutzt und ihre Rolle bei der *in vivo* Infektion wird in Frage gestellt.

**Tab. 1.1 HIV-Korezeptoren**

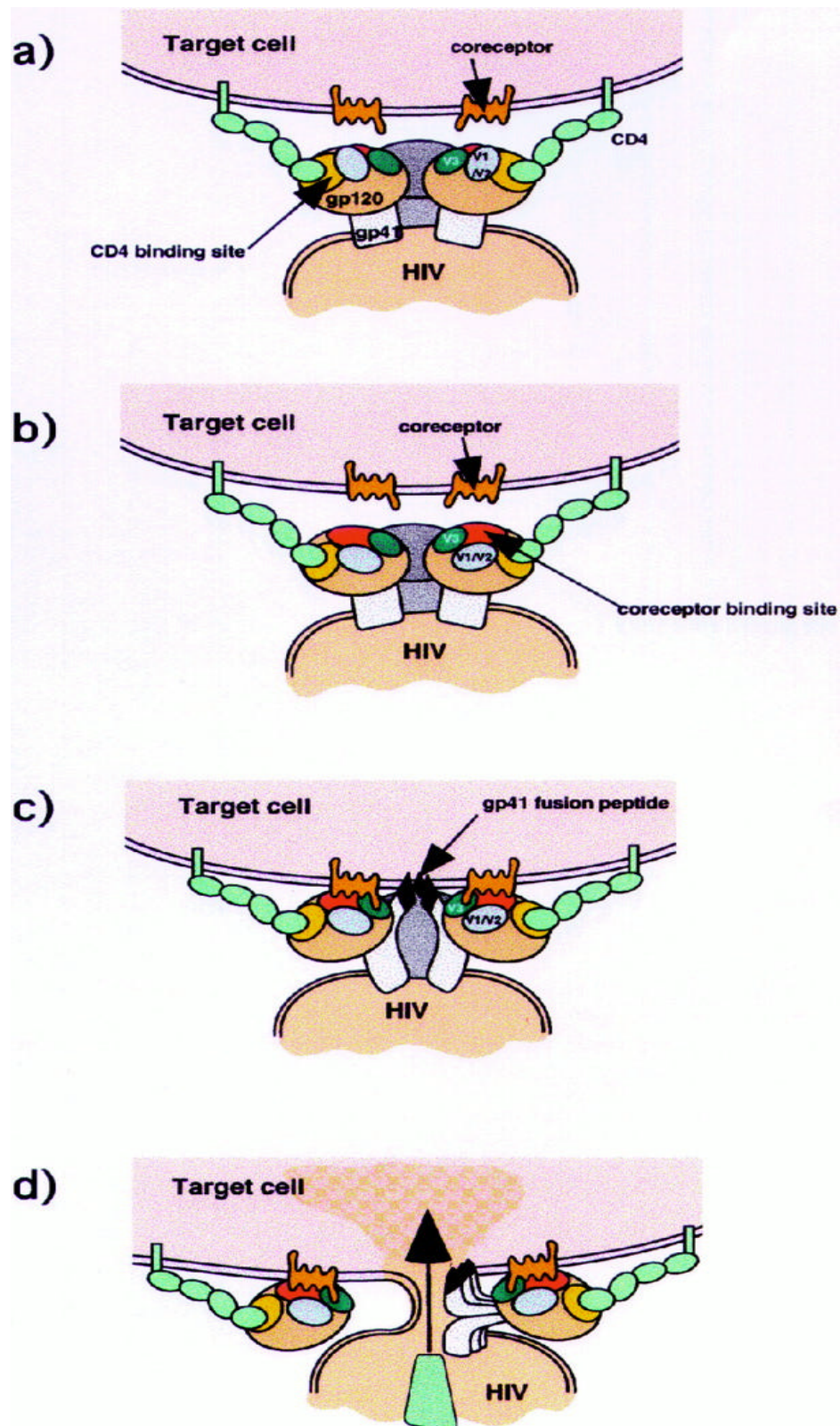
Korezeptor	Virus	Zelltyp / Gewebe	Literatur
CCR1	HIV-2	aktivierte T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen	Guillon <i>et al.</i> , 1998; McKnight <i>et al.</i> , 1998
CCR2b	HIV-1, HIV-2	Monozyten/Makrophagen, T-Zellen	Chen, <i>et al.</i> , 1998; Doranz <i>et al.</i> , 1996
CCR3	HIV-1, HIV-2	Eosinophile, Mikroglia, T <sub>H</sub> 2	Choe <i>et al.</i> , 1996; Sol <i>et al.</i> , 1997
CCR4	HIV-2	T <sub>H</sub> 2, Gehirn	McKnight <i>et al.</i> , 1998; Owen <i>et al.</i> , 1998
CCR5	HIV-1, HIV-2	aktivierte T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen	Deng <i>et al.</i> , 1996; Sol <i>et al.</i> , 1997
CCR8	HIV-1, HIV-2	T <sub>H</sub> 2, Thymozyten, Gehirn	Rucker <i>et al.</i> , 1997
CCR9	HIV-1	Lymphozyten, Gehirn, Plazenta	Choe <i>et al.</i> , 1998
CXCR2	HIV-2	Neutrophile, Gehirn	Bron <i>et al.</i> , 1997
CXCR4	HIV-1, HIV-2	Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Gehirn, Progenitorzellen	Feng <i>et al.</i> , 1996; Schols und De Clercq, 1998
CXCR5	HIV-2	B-Zellen	Kanbe <i>et al.</i> , 1999;
Cx <sub>3</sub> CR1	HIV-1, HIV-2	Natürliche Killerzellen, CD8-T-Zellen, Gehirn	Reeves <i>et al.</i> , 1997; Rucker <i>et al.</i> , 1997
GPR1	HIV-1, HIV-2	Gewebe-Makrophagen, Gehirn	Farzan <i>et al.</i> , 1997; Shimizu <i>et al.</i> , 1999
GPR15 (BOB)	HIV-1, HIV-2	T-Zellen, Darm	Deng <i>et al.</i> , 1997; Farzan <i>et al.</i> , 1997
STRL33 (Bonzo)	HIV-1, HIV-2	T-Zellen, Monozyten/Makrophagen Plazenta	Deng <i>et al.</i> , 1997, Liao <i>et al.</i> , 1997
V28	HIV-1, HIV-2	Lymphozyten, Neuronen	Combadiere <i>et al.</i> , 1998, Reeves <i>et al.</i> , 1997
APJ	HIV-1, HIV-2	CNS	Choe <i>et al.</i> , 1998 ; Edinger <i>et al.</i> , 1998
ChemR23	HIV-1	Makrophagen, Dendritische Zellen	Samson <i>et al.</i> , 1998
RDC1	HIV-1, HIV-2	Lymphozyten, Gehirn	Shimizu <i>et al.</i> , 2000
CMV (US28)	HIV-1, HIV-2	CMV-infizierte Zellen	Pleskoff <i>et al.</i> , 1997



## 1.6.2 Interaktion zwischen Hüllprotein und Rezeptoren

Beim ersten Schritt des Viruseintritts in die Zelle, bindet gp120 an den CD4-Rezeptor (siehe Abb. 1.3a). Die CD4-Bindungsdomäne liegt in der vierten konservierten Region (Lasky *et al.*, 1987; Nygren *et al.*, 1988), wobei andere Bereiche des Oberflächenproteins offensichtlich ebenfalls eine Rolle bei der Bindung spielen (Kowalsky *et al.*, 1987; Olshevsky *et al.*, 1990; Posner *et al.*, 1991). Neben der Anheftung des Virus an die Oberfläche der Wirtszelle, bewirkt dieser Bindungsschritt, wie in Abb. 1.3b dargestellt ist, konformelle Veränderungen im gp120, wodurch Epitope exponiert werden, die normalerweise verdeckt sind (Thali *et al.*, 1993). Zu diesen CD4-induzierten Epitopen gehört auch die Bindungsstelle für den Korezeptor, die durch Kokristallisierungsversuche charakterisiert wurde (Kwong *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1996). Die Korezeptorbindungsstelle besteht aus vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die zwischen den äußeren und den inneren Domänen von gp120 liegen. Sie wird im nativen Stadium wahrscheinlich von den V1-V2- und V3-Schleifen verdeckt. Die Bindung des gp120 an den CD4-Rezeptor induziert die Umlagerung der inneren und äußeren Domänen ebenso wie die der V1-V2 und der V3-Region, wodurch die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur freigegeben und die Korezeptorbindung ermöglicht wird. Durch Mutationsexperimente und Studien mit Antikörpern, konnte gezeigt werden, daß der V3-loop einen Einfluß auf die Determination der Korezeptornutzung hat (Choe *et al.*, 1996; Speck *et al.*, 1997; Trkola *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999, Xiao *et al.*, 1998), wobei auch andere Regionen, wie V1-V2, eine Rolle spielen (Cho *et al.*, 1998).

Die Bindung des Korezeptors führt dann zu weiteren konformellen Veränderungen im Hüllprotein, die noch nicht näher geklärt sind. Dem derzeitigen Modell entsprechend, wird das gp41 durch diese Veränderungen in einen Fusions-aktiven Zustand versetzt. Man vermutet, dass das gp41, wenn es mit gp120 assoziiert ist, in einer metastabilen „non-coiled-coil“ Konformation existiert. Im aktiven Zustand dient, ähnlich dem HA<sub>1</sub>/HA<sub>2</sub> vermittelten Mechanismus der Influenza A und B Viren, eine „coiled-coil“ Formierung als eine Art Sprungfedermechanismus, der die virale Membran näher an die Zellmembran bringt (Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997). Vermutlich wird



**Abb.1.4: Schematisches Modell für den Zelleintritt von HIV-1** (nach Poignart *et al.*, 2001)  
 Dargestellt sind wichtige Schritte im Zelleintritt von HIV-1: a) Der erste Schritt ist die Bindung des gp120 Oberflächenproteins an das CD4-Molekül auf der Zielzelle. b) Die Bindung von gp120 an CD4 führt zu konformellen Änderungen im Hüllprotein, wodurch die Bindungsstelle für den Korezeptor freigegeben wird. c) Das gp41 Fusionspeptid wird in die Membran der Zielzelle inseriert. d) Die Formierung einer „coiled-coil“-Struktur führt zur Membranfusion und Viruseintritt.

durch die konformellen Veränderungen, die durch die Korezeptorbindung ausgelöst werden, das gp41 Fusionspeptid in die Wirtszellmembran inseriert (Abb.1.3c; Gallaher, *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1996; Weissenhorn *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1999). Es kommt dann erneut zu einer Konformationsänderung und zur Bildung der „coiled coil“ Struktur, die parallel zur Zellmembran liegt (Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997). Durch diese Formation werden die virale und die zelluläre Membran zueinander gezogen und es kommt zur Membranfusion (Abb.1.3d; Hunter *et al.*, 1997).

### 1.7 HIV und T-Zelldifferenzierung

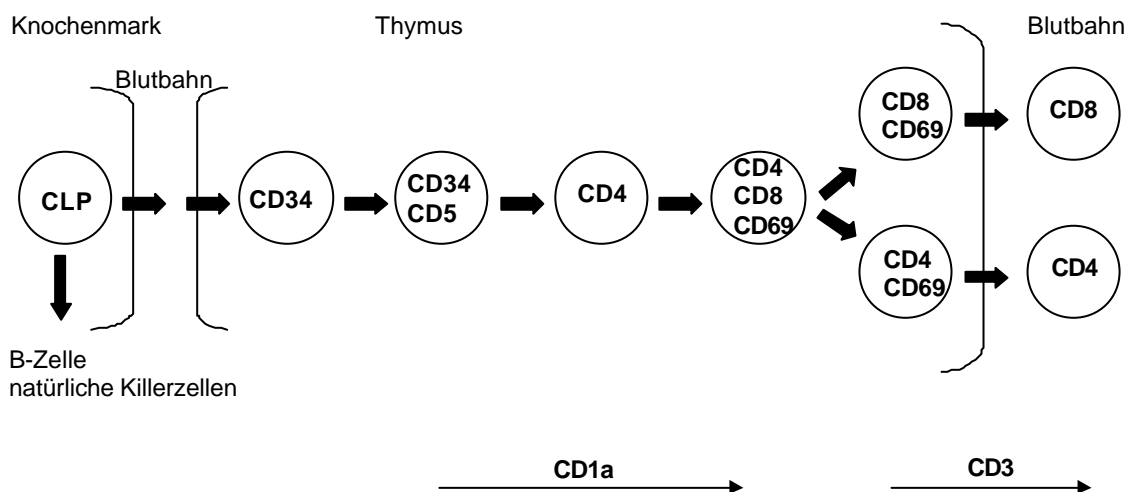
Im Verlauf einer HIV-Infektion beobachtet man einen fortschreitenden Verlust CD4-positiver T-Zellen. Diesen Zellen kommt eine regulatorische Funktion bei der Immunantwort zu (Chesnut und Grey, 1986), weshalb sie auch als T-Helferzellen bezeichnet werden. Die massive Depletion und Dysfunktion der CD4<sup>+</sup>-Zellen führt zum Zusammenbruch des Immunsystems und zur Ausbildung des Krankheitsbildes AIDS. Wodurch die T-Zell-Depletion verursacht wird, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. In diesem Zusammenhang werden verschiedene Mechanismen der Zerstörung bzw. mangelhaften Differenzierung der CD4-positiven Zellen diskutiert. Zum einen wurde festgestellt, dass HIV-Patienten eine außergewöhnlich hohe Rate apoptotischer T-Helferzellen aufweisen (Laurent-Crawford *et al.*, 1991). Im SIV-Tiermodell konnte außerdem gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Apoptoserate und der fortschreitenden Erkrankung besteht (Reinberger *et al.*, 1999). Andererseits stellten Anderson *et al.*, (1997) fest, dass die Anzahl der bei einer HIV-Infektion täglich durch Apoptose untergehenden CD4<sup>+</sup>-Zellen um zwei Zehnerpotenzen niedriger ist als normalerweise täglich neu gebildet werden. Daraus wurde gefolgert, dass die Hauptursache des T-Zell-Verlustes eine gestörte Produktion dieser Zellen ist (Heeney *et al.*, 1995; Fleury *et al.*, 1998). Hellerstein *et al.* (1999) beobachteten bei Patienten, die unter HAART-Therapie standen, bereits nach 12 Wochen einen dramatischer Anstieg der CD4<sup>+</sup>-Population. Die Inhibition der T-Zell-Produktion konnte also durch Suppression der Virusreplikation aufgehoben werden. Als Ursache für die gehemmte Produktion von T-Helferzellen kommen Störungen in Knochenmark und

Thymus sowie Zellzyklusstörungen in Frage. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Differenzierung im Thymus gestört ist, da in allen Stadien der Erkrankung Infektion im Thymus (Stroma und Thymozytenpopulation) gezeigt werden konnte und außerdem die Architektur des Thymus bei HIV-Patienten zerstört ist (Rosenzweig *et al.*, 1993). Darüber hinaus wurde bei HIV-1-infizierten Kindern eine Thymus-Dysfunktion festgestellt (Kourtis *et al.*, 1996). Es ist also von besonderem Interesse, den Einfluß einer HIV-Infektion auf die Vorgänge im Thymus zu untersuchen.

### 1.7.1 T-Zelldifferenzierung im Thymus

Während lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass der Thymus nur während der Ontogenese eine Rolle spielt, weiß man jetzt, dass er auch für das adulte Immunsystem von Bedeutung ist. Im Thymusgewebe findet die Differenzierung von CD34-positiven haematopoetischen Stammzellen zu reifen T-Zellen statt. T-Zellen differenzieren aus CD34-positiven haematopoetischen Stammzellen, die im Knochenmark gebildet werden, und über die Blutbahn in den Thymus einwandern. Wodurch die, für die T-Zell-Differenzierung bestimmten Vorläuferzellen charakterisiert sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Man weiß, dass pluripotente Vorläuferzellen in Knochenmark und fötaler Leber weder CD45RA noch CD10 exprimieren, während beide Marker auf den CD34-positiven Zellen im Thymus exprimiert sind (Res *et al.*, 1996). Galy *et al.* (1995) definierten eine Population im Knochenmark, bei der ebenfalls alle drei Antigene detektiert wurden. Sie stellten fest, dass diese Zellen nicht mehr pluripotent waren, aber zu T-Zellen, Natürlichen Killerzellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen differenzieren konnten, weshalb sie als allgemeine lymphoide Progenitorzellen (engl.: common lymphoid progenitors; CLP) bezeichnet wurden. Vermutlich handelt es sich bei den Vorläuferzellen, die in den Thymus einwandern, um CLP, da sowohl der Phänotyp, als auch das Differenzierungspotential diesem Zelltyp entspricht (Res *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1998). Die folgende Differenzierung zu reifen T-Zellen läßt sich durch Expression bzw. Herunterregulieren charakteristischer Oberflächenantigene beobachten.

Die unreifsten Zellen im Thymus stellen CD34-positive Zellen dar, die entweder kein oder nur sehr wenig CD38 exprimieren (Res *et al.*, 1996). Im nächsten Stadium der Thymopoese wird die Expression von CD5 auf der Zelloberfläche beobachtet. Diese CD34<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> Thymozyten können sich zumindest noch zu T-Zellen und Natürliche Killerzellen entwickeln (Sánchez *et al.*, 1994). Die Expression von CD1a markiert den nächsten Schritt in der T-Zell-Differenzierung. Die CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>-Zellen haben nun auch ihre Fähigkeit, zu Natürlichen Killerzellen zu differenzieren verloren, und sind somit vollständig der T-Zelllinie zuzuordnen (Heemskerk *et al.*, 1997). Im Anschluß an das CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>-Stadium beobachtet man die Expression von CD4 auf der Zelloberfläche, die von einem fast vollständigen Herunterregulieren des CD34-Markers begleitet wird. Es handelt sich um unreife einfachpositive CD4-Zellen (engl.: immature singlepositive; ISP), die den T-Zellmarker CD3 noch nicht auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Del Porto *et al.*, 1995; Ramiro *et al.*, 1996). Das Stadium der CD4 ISP-Zellen wird von einer Expression von CD8 und dem T-Zellmarker CD3 gefolgt (Blom *et al.*, 1997). Schließlich kommt es zur Herunterregulation von CD4 oder CD8, wodurch reife CD4- oder CD8-T-Zellen entstehen, die in die Blutbahn wandern.



**Abb.1.5: Schematische Darstellung der T-Zell-Differenzierung**

Die Abbildung zeigt charakteristische Schritte in der T-Zell-Differenzierung von der multi-potenten Stammzelle (engl.: common lymphoid progenitor; CLP) im Knochenmark, über verschiedene Differenzierungsstadien im Thymus bis zu reifen CD4- bzw. CD8-T-Zelle, die in die Blutbahn wandert.

### 1.7.2 Der Einfluss einer HIV-Infektion auf die T-Zell-Differenzierung

Untersuchung des Thymus von HIV-infizierten Patienten zeigte eine zerstörte Thymusarchitektur, die sich sowohl durch Schäden im Parenchym als auch durch den Verlust lymphoider Zellen manifestierten (Rosenzweig *et al.*, 1993). Einige Studien ergaben, dass sich die Thymozyten-Depletion vor allem auf CD4/CD8-doppelpositive Zellen im Thymuscortex beschränkt (Papiernik *et al.*, 1992). Die Zerstörung und Dysfunktion des Thymus kann mehrere Ursachen haben. Es ist unbestritten, dass HIV-1 in der Lage ist, die Integrität der Epithelzellen im Thymus und die Produktion notwendiger Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zu stören. Daten über die Infektion des Thymusstroma mit HIV sind jedoch kontrovers (Schnittmann *et al.*, 1991; Ramarli *et al.*, 1996). Die gestörte T-Zell-Differenzierung kann andererseits auch das Resultat einer Infektion von Thymozyten sein, wobei sowohl die Eliminierung von Zellen direkt durch Infektion, als auch indirekt durch Zerstörung benachbarter Zellen eine Rolle spielen könnte (Su *et al.*, 1995). Es ist gesichert, dass die in der Differenzierung später auftretenden Subpopulationen der CD4<sup>+</sup>ISP und der CD4/CD8-doppelpositiven Zellen mit HIV-1 infiziert werden können (Gaulton *et al.*, 1997). Es gibt außerdem Publikationen darüber, dass bereits frühe Stadien der T-Zell-Differenzierung, wie die CD34-positiven CLP, die in den Thymus einwandern, Zielzellen für HIV-1 darstellen. Es ist also von großer Bedeutung für das Verständnis, der HIV-Pathogenese, zu bestimmen, welche Thymozytensubpopulationen durch HIV-1 infizierbar sind. Des Weiteren wäre es interessant, herauszufinden, welchen Einfluss eine Infektion früher Stadien auf die Differenzierung hat.

### 1.8 Aufgabenstellung

HIV-1 weist, vor allem im Hüllprotein gp120, eine hohe Sequenzvariabilität auf, die sich im Wirtszelltropismus widerspiegelt. Dabei wird sowohl Variabilität zwischen Isolaten aus verschiedenen Patienten beobachtet, als auch Veränderung der vorherrschenden Virusvariante im Verlauf einer HIV-Infektion. Es wird diskutiert, ob ein Zusammenhang zwischen Virusevolution und Krankheitsverlauf des Patienten besteht.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Eigenschaften des variablen Hüllproteins von HIV-1 im zeitlichen Verlauf der HIV-Infektion. Dazu sollte das *env*-Gen HIV-1 positiver Patienten, deren Therapiebeginn in unterschiedlichen Krankheitsstadien initiiert wurde, untersucht werden. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die vorherrschende Variante des *env*-Genes aus Blutproben der Patienten amplifiziert, um rekombinante Klone herzustellen. Wenn möglich, sollten mehrere Klone aus sequentiellen Blutproben von Patienten hergestellt werden.

Die genotypische Charakterisierung der rekombinanten Klone erfolgte durch Sequenzierung der variablen Regionen V1-V2 und V3 des *env*-Gens. Die Sequenzdaten dienen dazu, sowohl Variabilität innerhalb der Patientengruppe als auch zeitliche Veränderungen aufzuzeigen. Die phänotypische Charakterisierung, im Bezug auf Zelltropismus und Nutzung unterschiedlicher Korezeptoren, sollte durch Infektionsversuche auf speziellen Indikatorzelllinien und Primärzellen erfolgen. Basierend auf der Phänotypisierung kann überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen Virusphänotyp und Krankheitsstatus des Patienten besteht. Die Ergebnisse aus der genotypischen und phänotypischen Charakterisierung sollten außerdem für Analysen zur Vorhersage des Phänotyps von Virusvarianten verwendet werden.

Gut charakterisierte rekombinante Virusklone stellen die Basis für verschiedene *in vitro* Infektionsstudien dar. Für die Untersuchung der HIV-1-Pathogenese ist es besonders interessant, Infektionsstudien auf Thymozyten in verschiedenen Differenzierungsstadien, von der haematopoetischen Stammzelle zur reifen T-Zelle, durchzuführen. Aus diesem Grund wird im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit versucht, ein *in vitro* System zu etablieren, mit dem es möglich sein sollte, haematopoetische Stammzellen zu reifen T-Zellen zu differenzieren. In zukünftigen Projekten soll ein solches System eingesetzt werden, um die gezielte Infektion einzelner T-Zell-Differenzierungsstadien durch charakterisierte HIV-1-Klone zu ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die meisten der verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden von folgenden Lieferanten bezogen: Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg i.Br.), Roth (Karlsruhe), Riedel de Haen (Seelze) und Roche (Mannheim).

#### 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.

**Tab. 2.1 Häufig verwendete Puffer und Medien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Tris-HCl	1M Tris, pH8,0 mit HCl
TE-Puffer	10mM Tris-HCl, pH8,0; 0,5 mM EDTA
Lösung I	25mM Tris-HCl, pH8,0; 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH7,2
MACS-Puffer	PBS, 5mM EDTA, 0,5% FCS
PBS-Tween	PBS, 0,5% Tween
HeBS	280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 12 mM Dextrose, 50 mM HEPES, pH7



### 2.1.3 Kits

In der vorliegenden Arbeit wurden Kits von folgenden Firmen eingesetzt:

**Tab. 2.2 verwendete Kits**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Jet-Sorb Gel Extraktions Kit	Genomed, Bad Oeyenhausen
QIAquick	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
NucleoBond PC 100/500	Macherey-Nagel
DNAzol	Gibco, BRL
DCTS-Kit	Beckman-Coulter, Krefeld
CD34 Direct Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
PKH26	Sigma
1kb DNA-Molekulargewichtsmarker	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus

### 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 Oligonukleotide

Für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen wurden folgende Oligonukleotide (engl.: Primer) eingesetzt:

**Tab. 2.3 Verwendete Oligonukleotide**

Primer	Sequenz	Spezifität
A	GGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA	HIV-1 env (+); PCR
N	CTGCCAATCAGGGAAGTAGCCTTGTGT	HIV-1 env (-); PCR
C	TTGTGGGTCACCGTCTATGGGG	HIV-1 env (+); PCR
Mn	ATTTGCGGCCGCTAGCCCTTCCAGTCCCC CCTTTTCTTTTA	HIV-1 env (-); PCR
7029	TGGCAGTCTAGCAGAAGAAG	V3 (+); Sequenzierung
7382	ATTACAGTAGAAAAATTCC	V3 (-); Sequenzierung
SR1	GCTGTTAAATGGCAGTCT	V3 (+); Sequenzierung
SR2	CCTCCACAATAAAAACTG	V3 (-); Sequenzierung
6447	GTACCCACAGACCCCAAC	V1-V2 (+); Sequenzierung
7029	CTTCTTCTGCTAGACTGCCA	V1-V2 (+); Sequenzierung

### 2.1.6 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 (LB<sub>Amp</sub>) zugefügt.

**Tab. 2.4 Medien für die Arbeit mit Bakterien**

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 <sub>2</sub> und MgSO <sub>4</sub>
TB-Puffer	10 mM Pipes, 55 mM MnCl <sub>2</sub> , 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl, pH 6.7, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.
Ampicillin	100mg/ml in Wasser, sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt

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<sup>+</sup>*, *proAB*, *lacI<sup>f</sup>ZΔM15*, *Tn10*, (*Tet<sup>r</sup>*)] und zeichnet sich durch eine besonders niedrige Rekombinationsfrequenz und eine hohe Transformierbarkeit aus.

Für Klonierungsarbeiten wurde der Vektor pNL4.3 benutzt, ein proviraler Klon des Laborstammes NL4.3, der in pBluescript inseriert wurde. Durch Mutagenese wurde an Position 6331 eine BstEII-Schnittstelle eingefügt (Polzer *et al.*, 2001). Für die Herstellung rekombinanter Klone wurde das *env*-Gen von NL4.3 mit XhoI und BstEII herausgeschnitten und durch entsprechende Patienten-*envs* ersetzt.

### 2.1.7 Materialien für die Zellkultur

Plastikwaren für die Zellkultur stammten von den Firmen Nunc (Wiesbaden-Biebrich), TPP (Trasachingen, Schweiz), Corning (New York, USA). Netwell-Einsätze wurden von der Firma Corning (New York, USA) bezogen. Für die Organkultur wurden Nitrozellulose-Filter der Firma Millipore und Nucleopore-Filter der Firma Schleicher und Schull (Dassel) eingesetzt.

### 2.1.8 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

**Tab. 2.5 Zellkulturmedien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
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
BIT-Medium	BIT 9500 (Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen), Rinderserumalbumin (5%) – Rinderinsulin (50µg/ml) – humanes Transferin (1mg/ml); 1:5 verdünnt mit IMDM, supplementiert mit 2mM Glutamin und Na-Pyruvat.

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

**Tab. 2.6: Medienzusätze und Wachstumsfaktoren**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Fötales Kälberserum (FCS)	BioWhittaker Europe, Verviers, Belgien
Glutamin	Gibco BRL, Gaithersberg, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Gaithersberg, USA
humanes AB-Serum	Blutspendezentrale, Hamburg-Eppendorf
Flt3	TeBu, Frankfurt a.M.
IL3	TeBu, Frankfurt a.M.
SCF	R&D, Wiesbaden
GM-CSF	R&D, Wiesbaden
M-CSF	R&D, Wiesbaden
TNFa	R&D, Wiesbaden

### 2.1.9 Zelllinien

**Tab. 2.7: Verwendete Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Charakterisierung</b>	<b>Medium</b>	<b>Herkunft / Referenz</b>
HelaP4-CCR5	humane Zervix-karzinom-Zelllinie	DMEM	von M. Alizon zur Verfügung gestellt
L88	humane Knochenmarkszelllinie	RPMI	Thalmeier <i>et al.</i> , 1994
GHOST par			
GHOST CCR1			
GHOST CCR2b			
GHOST CCR3	humane Osteosarkomzelllinie	DMEM	Cecilia <i>et al.</i> , 1998
GHOST CCR4			
GHOST CCR5	stabil transfiziert mit verschiedenen Chemokinrezeptoren		
GHOST CCR8			
GHOST CXCR4			
GHOST BOB			
GHOST Bonzo			
GHOST V28			

### 2.1.10 Blutproben

Blutproben von HIV-1-Patienten stammten von freiwilligen Spendern und wurden ebenso wie die klinischen Daten von den behandelnden Ärzten (H.-J. Stellbrink, J. v. Lunzen und B. Zöllner) unter Berücksichtigung des Datenschutzes zur Verfügung gestellt.

Buffycocoats zur Isolation von PBMC stammten aus den Blutspendezentralen Hamburg-Eppendorf bzw. der Uniklinik Heidelberg.

Nabelschnurblut zur Isolation von CD34-positiven haematopoetischen Stammzellen stammte aus dem Marienkrankenhaus und dem Krankenhaus Elim in Hamburg bzw. den Krankenhäusern St. Elisabeth und Salem in Heidelberg. Die Mütter wurden durch das Fachpersonal über die Nabelschnurblutentnahme informiert und haben sich einverstanden erklärt.

### 2.1.11 Tiere

Für die Präparation von fötalem murinem Thymus wurden trächtige Mäuse (Tag 13-15) der Stämme BalbC, 129, oder NMR1 eingesetzt. Die Tiere wurden in den Tierställen des Heinrich-Pette-Instituts bzw. der Uniklinik-Heidelberg gehalten.

### 2.1.12 Antikörper

**Tab. 2.8: Antikörper für FACS-Analysen und ELISA**

Bezeichnung	Spezifität	Bezugsquelle
183	HIV-1 Kapsid	AIDS reagent Programme NIH, USA
Kaninchen a Kapsid	HIV-1 Kapsid	Arbeitsgruppe Kräusslich
a Kaninchen PO	Kaninchen	Dianova, Hamburg
ADP 365	HIV-1 Kapsid	AIDS reagent program,
ADP 366	HIV-1 Kapsid	NIBSC, England
Ziege a Maus IgG-BGAL	Maus	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA
a CD4-PE (rat-IgG <sub>2a</sub> ,?)	Maus CD4	Pharmingen, Heidelberg
a CD8-FITC (rat-IgG <sub>2a</sub> ,?)	Maus CD8	Pharmingen, Heidelberg
a CD1a-FITC	human CD1a	Pharmingen, Heidelberg

a CD1a-PE	human CD1a	Pharmingen, Heidelberg
a CD14-FITC	human CD14	Pharmingen, Heidelberg
a CD34-FITC	human CD34	Pharmingen, Heidelberg
a CD34-PE	human CD34	Pharmingen, Heidelberg
a CD69-FITC	human CD69	Pharmingen, Heidelberg
a AC133-PE	human AC133	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
Maus IgG <sub>1</sub> ,?-FITC	Isotyp-Standard	Pharmingen, Heidelberg
Maus IgG <sub>1</sub> ,?-PE	Isotyp-Standard	Pharmingen, Heidelberg
rat-IgG <sub>2a</sub> ,?-PE	Isotyp-Standard	Pharmingen, Heidelberg

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 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.

### 2.2.2 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 Röhrcchen 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.

### **2.2.3 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 OD<sub>600</sub> (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 10<sup>7</sup> Kolonien pro µg Plasmid DNA erreicht.

### **2.2.4 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.

### **2.2.5 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.

### **2.2.6 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 OD<sub>260</sub> von 1,0. Damit lässt sich die DNA-Konzentration berechnen. Proteine haben eine höhere Extinktion bei 280 nm und der Quotient von OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> 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.

### **2.2.7 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.

### **2.2.8 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. Für präparative Zwecke wurden zwischen 2 und 20 µg DNA (oder 10 – 40 µl Mini-Prep DNA) in einem Volumen von 50 bis maximal 100 µl verdaut.

### **2.2.9 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen**

Eine nicht-denaturierende elektrophoretische Größenauffrennung 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.

#### **2.2.10 Isolierung von DNA-Fragmenten**

Nach elektrophoretischer Trennung im Agarosegel wurden Gelstückchen mit den benötigten DNA Fragmenten bei langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten. Zur anschließenden Extraktion der DNA Fragmente aus dem

Gelmaterial wurde die Kits "Jet-Sorb" der Firma Genomed oder „Qiaquick“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers benutzt. Prinzip: die Agarose wird in Gegenwart hoher Konzentrationen von chaotropen Salzen bei 50°C geschmolzen. Unter diesen Bedingungen bindet die DNA an eine Silikatmatrix, welche von der Agarose abzentrifugiert werden kann. Anschließend wird die DNA in einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt (TE) von der Matrix eluiert.

### **2.2.11 Extraktion genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen**

Zur Extraktion genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml DNAzol (Gibco BRL) lysiert und nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Qualität der gewonnenen DNA wurde im Agarosegel überprüft. Die Ausbeute wurde im Photometer ermittelt (2.2.6).

### **2.2.12 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)

In der vorliegenden Arbeit wurde das HIV-1 env-Gen unter Verwendung einer sogenannten „long range nested PCR“ amplifiziert. Dabei wurde eine spezielle High-Fidelity-Polymerase (Boehringer, Mannheim) eingesetzt, die für die Amplifikation langer DNA-Fragmente geeignet ist. Bei der „nested PCR“ handelt es sich um eine Methode, bei der zunächst mit einem Primerpaar (A, N) ein Fragment vervielfältigt wird. Das Produkt wird in eine zweite Reaktion eingesetzt. Das Primerpaar (C, Mn), das in der zweiten Runde verwendet wird, liegt innerhalb des ersten Paares. Die Reaktion wurde in einem MJ-Research PTC200 Thermocycler (Biozym, Oldenhausen) nach folgendem Protokoll durchgeführt: 1 min bei 94°C, 30 s bei 94°C, 30 s bei 50°C und 6 min bei 68°C. Die Schritte 2-4 wurden insgesamt 40 mal wiederholt. Dafür wurden 200 – 800ng DNA und 200nM dNTPs, je 2 µM Primer, 1U Polymerase in 50-100µl Volumen eingesetzt und mit dem High-Fidelity-Puffer (Boehringer, Mannheim) gepuffert.

Anschließend wurde das jeweils amplifizierte Fragment über ein Agarosegel gereinigt, nach Schneiden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einen Vektor kloniert und durch Sequenzieren überprüft.

### **2.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten**

Vor jeder Ligrationsreaktion wurden die isolierten DNA Fragmente, die entweder kohäsive oder stumpfe Enden trugen, zur groben Quantifizierung nebeneinander im Agarosegel aufgetrennt. 5 bis 50 ng Vektor DNA wurden mit einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuss des DNA Fragments in einem Gesamtansatz von 15 µl mit 3 Einheiten T4 DNA Ligase versetzt und mindestens 4 Stunden bei 16°C inkubiert. Als Kontrolle wurde immer eine zweite Ligation ohne Fragment angesetzt. Zur Transformation von kompetenten Bakterien wurden in der Regel 10 µl des Ligrationsansatzes verwendet.

### **2.2.14 Sequenzierung**

Zum Sequenzieren wurde das Verfahren des AmpliTaq-BigDye PCR-Cyclesequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) angewendet. Dazu wurden 300-500 ng „Midi/Maxi-Prep“ DNA oder PCR-Produkt mit 15 pmol Primer, 2 µl BigDye-Puffer und 6 µl Half-Term-Puffer, in einem Gesamtvolumen von 20 µl einer PCR mit 25 Zyklen unterzogen: 20 s bei 96°C, 11 s bei 50°C, 4 min bei 60°C. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und das trockene Pellet an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dietmar Richter im Zentrum für molekulare Neurobiologie (ZMNH), Hamburg, übergeben. Dort wurde die Gelelektrophorese und Auswertung der Nukleotidsequenz durchgeführt.

Außerdem wurden Sequenzierungen mit dem Kapillarsequenzier CEQ-2000 (Beckman-Coulter, Krefeld) unter Verwendung des DCTS-Kits (Beckman-Coulter, Krefeld) mit 1,6 pmol Primer durchgeführt. Das Protokoll für die PCR-Reaktion war: 20s 96°C, 20s 50°C, 4 min 60°C. Die Reaktion wurde mit 3 M NaAcetat, 100mM EDTA und Glycogen abgestoppt und die DNA mit Ethanol präzipitiert. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 35-40µl deionisiertem Formamid resuspendiert, in eine 96-Loch-Platte gegeben, mit je einem Tropfen Mineralöl bedeckt und in die Kapillaren des Sequenziergerätes geladen.

### **2.2.15 Computerunterstützte Sequenzanalyse**

Zur Bearbeitung von Sequenzen wurde die Software „Vector NTI Suite“ der Firma InforMax (Oxford, UK) verwendet. Automatische Sequenzvergleiche erfolgten unter Verwendung von CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). Phylogenetische Analysen zur Erstellung von Stammbäumen wurden mit der „neighbour joining“-Methode des Programmes CLUSTAL X durchgeführt, wobei jeweils 10-100 verschiedene Stammbäume errechnet wurden, um so den wahrscheinlichsten darzustellen.

## **2.3 Zellbiologische und virologische Methoden**

### **2.3.1 Zellkultur**

Die adhären wachsenden Zellen wurden in DMEM, versetzt mit FCS, Glutamin und Antibiotika, bei 37 °C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5 % CO<sub>2</sub> 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.

### **2.3.2 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 fünf Minuten bei 275 x g zentrifugiert, das Zellpellet in FCS mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxyd (DMSO) resuspendiert 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.

### **2.3.3 Isolierung von Peripheren Blutlymphozyten (PBMC)**

PBMC wurden aus Buffy-Coats bzw. aus Nabelschnurblut isoliert. Die Isolierung erfolgte nach dem Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation. Dazu wurde 15ml Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) in 50ml-Röhrchen vorgelegt und mit 30ml Blut (1:1 verdünnt mit PBS) überschichtet. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 700 x g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Lymphozytensaum aus der Interphase zwischen Ficoll und zellfreiem Plasma abgenommen und dreimal mit PBS gewaschen. Vor dem dritten Waschschrift wurde die Zellzahl bestimmt.

Für Infektionsversuche wurden die isolierten PBMC in 100ml RPMI 1640 kultiviert und mit 0,5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin; Siegma-Aldrich, Steinheim) stimuliert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen mit 20U/ml humanem IL2 (Roche Diagnostics, Mannheim) stimuliert. Die Zellen wurden für zwei bis drei Wochen kultiviert, und regelmäßig in frischem RPMI 1640 mit IL2 aufgenommen.

### **2.3.4 Präparation von Makrophagen**

Für die Präparation von Makrophagen wurden frisch isolierte PBMC (siehe 2.3.3) in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in RPMI1640 mit 5% hitzeinaktiviertem humanem AB-Serum aufgenommen, in 15cm-Bakterienschalen (Greiner, Nürtingen) ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen dreimal vorsichtig gewaschen und danach für drei bis sechs Tage in RPMI 1640 mit 10% humanem AB-Serum kultiviert. Am Tag bevor die Makrophagen für Infektionsversuche eingesetzt wurden, wurden sie wieder zweimal gewaschen, mit Trypsin abgelöst, erneut in RPMI 1640 mit 10% humanem AB-Serum aufgenommen und in 24-Well-Platten ausgesät ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/Napf). Während der Infektionsversuche wurden die Makrophagen einmal wöchentlich mit frischem RPMI 1640 mit 10% humanem AB-Serum versorgt.

### **2.3.5 Transfektion von Zellen zur Herstellung von Virusüberständen**

Die Transfektion von Zellen erfolgte nach der Kalzium-Phosphat-Methode. Für die Transfektion wurden  $5 \times 10^5$  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 – 20 µg provirales Plasmid wurden in 500 µl 0,25 M CaCl<sub>2</sub> Lösung suspendiert und danach wurde diese Lösung sofort mit 500 µl 2 x HBS 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> inkubiert. Die Überstände wurden durch Filtrieren geerntet und entweder portionsweise bei –80°C eingefroren oder direkt in Infektionsversuche eingesetzt. Zur Bestimmung der Virusmenge wurde die Konzentration des HIV-1 Kapsid-Proteins (p24) mittels ELISA (2.3.11) ermittelt.

### **2.3.6 Infektion von Indikatorzelllinien**

Für die Infektion von Indikatorzelllinien wurden GHOST-Zellen in 48-Napf-Platten ausgesät ( $0,5 \times 10^4$  Zellen/Napf). Am nächsten Tag wurde Virusüberstand auf die Zellen gegeben und für drei Tage bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zahl der infizierten Zellen wurde durch Immunfärbung (siehe 2.3.10) ermittelt.

### **2.3.7 Infektion von PBMC**

PBMC wurden wie in 2.3.3. beschrieben aus Buffy-Coats isoliert und mit PHA und IL2 stimuliert. Zur Bestimmung von Infektionskinetiken wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/Napf in 48-Napf-Platten ausgesät (1ml Kulturvolumen) und Virusüberstände (10ng p24) dazugegeben. Die Infektion erfolgte in vierfach-Ansätzen. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen und erneut in IL2-supplementiertem (20 U/ml) Medium aufgenommen. Die infizierten Zellen wurden für drei Wochen in Kultur gehalten, wobei sie regelmäßig mit frischem Medium (RPMI 1640 mit 20

U/ml IL2) versorgt wurden. Zur Bestimmung der Virusmenge wurden Überstände genommen und im ELISA (siehe 2.3.11) die p24-Konzentration ermittelt.

### **2.3.8 Infektion von Makrophagen**

Für die Infektion von Makrophagen wurden diese, wie in 2.3.4 beschrieben, aus Buffy-Coats präpariert. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Napf in einem ml 24-Napf-Platten ausgesät (RPMI 1640 mit 10% humanem AB-Serum; 1ml Kulturvolumen) und über Nacht inkubiert (37°C; Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO<sub>2</sub>), damit sich die Zellen am Plattenboden anheften konnten. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit Virusüberständen (50ng p24). Die Infektionsansätze wurden erneut über Nacht kultiviert und dreimal mit Medium gewaschen. Anschließend wurden die infizierten Zellen für drei Wochen in RPMI mit 10% humanem Serum in Kultur gehalten. Einmal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel. Zur Detektion infizierter Zellen wurde die in 2.3.10 beschriebene Immunfärbung durchgeführt.

### **2.3.9 Inhibition der HIV-1-Infektion durch AMD3100**

Die HIV-1 Infektion über den CXCR4-Rezeptor kann durch Blockierung des Rezeptors mit AMD3100 gehemmt werden. Dazu wurden GHOST-CXCR4-Zellen in einer Dichte von  $0,5 \times 10^4$  Zellen/Napf in 48-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden das Medium abgenommen und die Zellen mit 100µl AMD3100 in RPMI (doppelte Endkonzentrationen: 0, 20, 200, 2000ng/ml) für 30 Minuten vorbehandelt. Anschließend wurde 100µl Virusüberstand (1ng p24) auf die Zellen gegeben und für drei Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Ansätze wurden dann dreimal mit Medium gewaschen, in 500µl Medium mit AMD3100 (0, 10, 100, 1000ng/ml) aufgenommen und für drei Tage kultiviert. Zur Detektion der infizierten Zellen wurde eine Immunfärbung (siehe 2.3.10) durchgeführt.

### **2.3.10 Detektion infizierter Zellen durch Immunfärbung**

Infizierte Zellen wurden durch Immunfärbung von intrazellulärem p24 detektiert (Sonza *et al.*, 1991). Dazu wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem

Methanol:Aceton (1:1) fixiert und mit PBS und 1% FCS gewaschen. Die Detektion von p24 erfolgte entweder mit dem gegen das Kapsidprotein gerichteten Antikörper 183 (1:1000 in PBS mit 1% FCS) oder einem Gemisch (zu gleichen Teilen) aus ADP 365 und 366 (1:40 in PBS mit 1% FCS) zwei monoklonalen Antikörpern, die gegen separate Epitope von p24 gerichtet sind. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank (GHOST-Zellen) bzw. bei Raumtemperatur (Makrophagen) wurden die Zellen zweimal mit PBS / 1% FCS gewaschen und mit dem Zweitantikörper, einem anti-Maus  $\beta$ -Galactosidase Konjugat (1:400), inkubiert (37°C bzw RT). Anschließend wurde mit PBS gewaschen und die Zellen mit  $\beta$ -Galactosidase-Substrat (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- $\beta$ -Galacto-pyranosid) in einer X-Gal-Färbelösung bei 37°C inkubiert, bis eine Blaufärbung zu erkennen war.

### 2.3.11 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 0,25% 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) auf die Platte gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 5µl 0,5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Zur Quantifizierung der Reaktion wurde die optische Dichte in einem Photometer (Dynatech, MR5000) gemessen.

### **2.3.12 MACS-Separation von CD34-positiven Zellen**

CD34-positive Zellen wurden aus Nabelschnurblut gewonnen. Dazu wurden zunächst die PBMC wie in 2.3.3. beschrieben aus dem Nabelschnurblut isoliert, um daraus mit der MACS-Methode (**m**agnetic **a**ntibody **c**ell **s**orting) die CD34-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 CD34-positiver Zellen wurde der CD34-Direkt-Isolation Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) benutzt. Dazu wurden die aus Nabelschnurblut isolierten PBMC (maximal  $3 \times 10^8$  Zellen pro Ansatz) mit MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500µl Puffer aufgenommen und für 30 Minuten mit jeweils 100 µl Fcr Blocking Reagenz (humanes Ig) und CD34-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  $1 \times 10^5$  und  $2 \times 10^6$  Zellen. Die Reinheit der Separation wurde stichprobenartig im

FACS (siehe 2.3.13) überprüft. Die isolierten Zellen wurden entweder direkt in Experimente eingesetzt oder, wie in 2.3.2 beschrieben, eingefroren.

### **2.3.13 Markierung von Zellen mit Antikörpern für die FACS-Analyse**

Für die FACS-Analyse wurden Zellen ( $0,5 \times 10^5$ -  $1 \times 10^6$ ) zunächst durch zweimaliges Waschen in PBS mit 0,5% FCS vorbereitet. Die Zellen wurden anschließend in 100µl PBS mit 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).

### **2.3.14 Markierung von Zellen mit PKH-26**

Zur besseren Unterscheidung von verschiedenen Zelltypen in der Kokultur (2.3.16) bzw. murinen Zellen in den FTOC (**f**etal **t**hymus **o**rgan **c**ulture; 2.3.18) wurden CD34-positive Stammzellen mit dem Membranfarbstoff PKH26 markiert. Für die Markierung wurde der PKH26-Kit (Sigma Aldrich, Steinheim) benutzt. Dazu wurden frisch isolierte oder aufgetaute CD34-positive Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen) zunächst gewaschen und in 1ml Diluent C resuspendiert. In einem zweiten Röhrchen wurde der PKH26-Farbstoff in einer Konzentration von 4-40µM (Endkonzentration 2-20µM) in 1ml Diluent C verdünnt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit der Färbelösung gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit 2ml FCS abgestoppt (1min) und anschließend mit 4ml Medium (RPMI 1640) aufgefüllt und abzentrifugiert. Die so gefärbten Zellen wurden dreimal mit Medium gewaschen, gezählt und in die entsprechenden Versuche eingesetzt.

### **2.3.15 Expansionskultur von CD34-positiven Zellen**

Zur Expansion von CD34-positiven Zellen wurde eine von Laer *et al.* (2000) publizierte Methode benutzt. Dazu wurden jeweils  $2 \times 10^5$  CD34-positive Zellen direkt nach der Isolation oder nach dem Auftauen (Zellzahl wurde nach dem Auftauen bestimmt) in 3ml BIT-Medium aufgenommen, das zuvor mit

Penicillin/Streptomycin, rekombinantes Flt3 (100ng/ml), humanem IL3 (20 ng/ml) und rekombinantes humanem SCF 100ng/ml supplementiert worden war. Die Zellsuspension wurde in 24-Well-Platten (1ml/Napf) ausgesät und kultiviert.

### **2.3.16 *in vitro* Makrophagendifferenzierung**

Die *in vitro* Makrophagendifferenzierung wurde nach einem Protokoll von Caux *et al.*, (1996) durchgeführt. Dazu wurden frisch isolierte oder aufgetaute CD34-positive Zellen ( $4 \times 10^4$  Zellen/ml) in RPMI mit 10mM HEPES supplementiert mit 25ng/ml rekombinantes humanem SCF, 2,5ng/ml rekombinantes humanem TNF $\alpha$  und 50ng/ml rekombinantes humanem GM-CSF aufgenommen und in 6-Well-Platten ausgesät. Nach vier Tagen wurde das Medium abgenommen und durch frisches, mit Zytokinen supplementiertes Medium ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen geerntet. Ein Teil wurde im FACS untersucht der andere mit PBS gewaschen und in frischem RPMI 1640 mit 10 mM HEPES und 25ng/ml M-CSF aufgenommen. Die Zellen wurden so erneut kultiviert (Mediumwechsel an Tag zehn) und nach sechs Tagen geerntet und im FACS analysiert.

### **2.3.17 Kokultur von CD34-positiven Zellen mit der Zelllinie L88**

Für die Kokultur von CD34-positiven Zellen mit der L88-Zelllinie wurden zunächst L88-Zellen mit einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert, damit ein semikonfluenter Zellrasen entstand. Am nächsten Tag wurden sie mit 15 Gy in einer Cäsium<sub>137</sub>-Quelle (Gamma-Bestrahlungsgerät LISA I, Conservatome, Dagneux Montluel, Frankreich) bestrahlt. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen erneut über Nacht kultiviert. Auf die so vorbereiteten L88-Zellen wurden  $5 \times 10^4$  frisch isolierte oder aufgetaute CD34-positive haematopoetische Stammzellen gegeben. Zur besseren Unterscheidung der beiden Zellarten, wurden die Stammzellen zuvor mit PKH26 (2.3.14) markiert. Zur Untersuchung eventueller Differenzierungsprozesse wurden die Kokulturen geerntet und im FACS untersucht.

### 2.3.18 Optimiertes Protokoll für FTOC

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, humane CD34-positive Zellen in fötalem murinem Thymus (engl.: fetal thymus organ culture; FTOC) *in vitro* zu T-Zellen zu differenzieren. Dazu wurde nach den Publikationen von Merkschlager und Fisher (1992) und Clark *et al.* (1999) ein optimiertes Protokoll erarbeitet.

Zunächst wurde fötaler muriner Thymus aus 14-15 Tage alten Embryonen präpariert. Dazu wurden die 8 bis 10 mm langen Föten aus dem Uterus der trächtigen Maus präpariert. Unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops wurde den Föten zunächst der Kopf abgetrennt und anschließend der Brustkorb geöffnet. Dann wurde der oberhalb des Herzens liegende, deutlich zweigeteilte Thymus entnommen und auf schwimmenden Filtern (Nucleopore, Schleicher und Schnell, Dassel) in RPMI 1640 mit 20% humanem Serum kultiviert. Zur Depletion der murinen Thymozyten wurde 1,35mM 2-desoxy-Guanosin zum Medium gegeben. Nach fünf Tagen wurde der Thymus von den Filtern genommen und für vier bis fünf Stunden in Medium gewaschen. In der Zwischenzeit wurden Suspensionen aus humanen CD34-positiven Zellen (frisch isoliert oder aufgetaut;  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI1640 mit 20% humanem AB-Serum) vorbereitet und in Tropfen zu 20 $\mu$ l in Terazaki-Platten ausgesät. In jeden dieser Tropfen wurde ein gewaschener Thymus gelegt. Die Platten wurden über Kopf gedreht, wodurch die Thymi in hängenden Tropfen („hanging drops“) in der Zellsuspension kultiviert wurden. Die „hanging drop“-Kultur ermöglicht ausreichenden Gasaustausch und das Einwandern der CD34-positiven humanen Zellen. Nach zwei Tagen Kultur bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Organe aus der Zellsuspension genommen und in Schalen mit RPMI1640-Medium gelegt, um nicht eingewanderte humane Stammzellen abzuwaschen. Die Thymi wurden dann erneut auf schwimmenden Filtern kultiviert (RPMI 1640 mit 20% humanem AB-Serum), was die Differenzierung der CD34-positiven Zellen zu reifen T-Zellen ermöglichen sollte.

### 3 Ergebnisse

#### Teil I - Herstellung und Charakterisierung rekombinanter HIV-1-Klone

HIV-1-Isolate aus verschiedenen Patienten weisen eine hohe Variabilität in ihrer Aminosäure-Sequenz auf. Diese Variabilität ist im Gen für das Hüllprotein besonders stark ausgeprägt und beeinflusst die Spezifität des Virus für Wirtszellen. Da im Verlauf einer HIV-1-Infektion in einem Patienten immer wieder neue Virusvarianten gefunden werden können, wird diskutiert, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Varianten und dem Krankheitsverlauf besteht.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte das *env*-Gen der vorherrschenden Virusvariante aus dem Blut HIV-1-infizierter Patienten amplifiziert werden, um so rekombinante provirale Plasmide herzustellen, die das jeweilige Patienten-*env* in einem isogenen Hintergrund enthalten. Dafür wurden Blutproben von freiwilligen Spendern einer Hamburger Patientengruppe eingesetzt. Alle Patienten standen unter HAART-Therapie, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion begonnen wurde, und auf die sie unterschiedlich gut ansprachen. Die Patientengruppe war dementsprechend sehr heterogen in Bezug auf Symptome und Krankheitsstadien, die für die einzelnen Patienten diagnostiziert wurden. Die klinischen Daten zu den Patienten wurden uns freundlicherweise von den betreuenden Ärzten (H.-J. Stellbrink, J. v. Lunzen und B. Zöllner) unter Berücksichtigung der Datenschutzes zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 3.1. aufgelistet. Wenn möglich, wurden sequenzielle Blutproben für die Untersuchung eingesetzt.

Die rekombinanten HIV-1-Klone, die aus diesem Patientenmaterial generiert wurden, sollten genotypisch und phänotypisch (im Bezug auf Wirtszelltropismus und Korezeptornutzung) charakterisiert werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen Phänotyp der Virus-Klone und dem Krankheitsstadium der Patienten besteht, und ob es möglich ist, anhand der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine, eine Vorhersage über den Phänotyp von HIV-Isolaten zu machen.

**Tab. 3.1 Klinische Daten der HIV-1 Patienten**

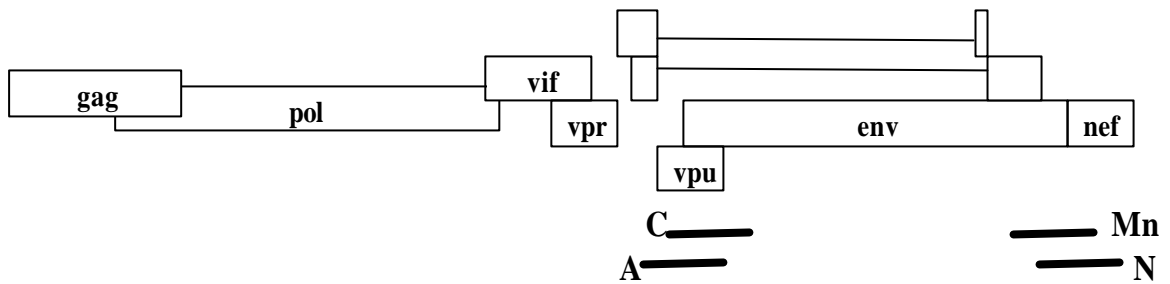
Patient	Datum	Viruslast	Allgemeiner Zustand zu Therapie-Beginn	Stadium
K1	05-98	< 50	Symptomfrei	A1
H6	12-93	k. D.	Symptomfrei	A1
	01-95	k. D.		
U7	05-98	< 50	AIDS	B3
J5	01-98	~2000-5000	AIDS	B3
H4	12-98	< 50	AIDS	C3
D5	01-94	~2000	AIDS	C3
	01-98	k.D.	AIDS im Endstadium - Patient ist zwischenzeitlich verstorben	

Dargestellt sind die Daten der Patienten, aus denen das *env*-Gen erfolgreich kloniert werden konnte  
k.D.: keine Daten

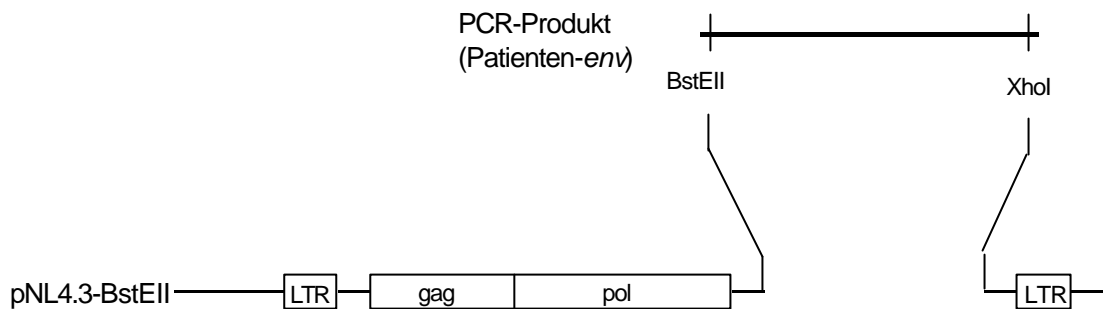
### 3.1 Amplifikation des *env*-Genes aus HIV-1-Patienten

Zur Herstellung rekombinanter HIV-1-Klone wurde aus Blutproben von HIV-1 infizierten Patienten Lymphozyten-DNA isoliert. Wenn vorhanden, wurden sequentielle Blutproben benutzt. Die Lymphozyten-DNA wurde dann zur Amplifikation des *env*-Gens in eine sogenannte long-range-nested-PCR eingesetzt. Bei dieser hochsensitiven PCR-Methode wurde zunächst mit dem Primerpaar A und N ein 3,3 Kilobasen (kb) langes Fragment amplifiziert. Dieses wurde in eine weitere PCR eingesetzt, in der mit einem zweiten Primerpaar (C und Mn) ein Fragment von 3 kb amplifiziert wurde (schematische Darstellung in Abb. 3.1A). Obwohl alle Patienten unter anti-retroviraler Therapie standen und demzufolge die Viruslast sehr niedrig war, konnte aus den Blutproben von insgesamt sechs Patienten das Gen für das Hüllprotein amplifiziert werden. Bei drei Patienten waren sequentielle Blutproben in der PCR erfolgreich. Abb. 3.1B zeigt beispielhaft die Amplifikationsprodukte aus Patient U7. Die Länge von ca. 3 Kilobasen entspricht dem vollständigen *env*-Gen.

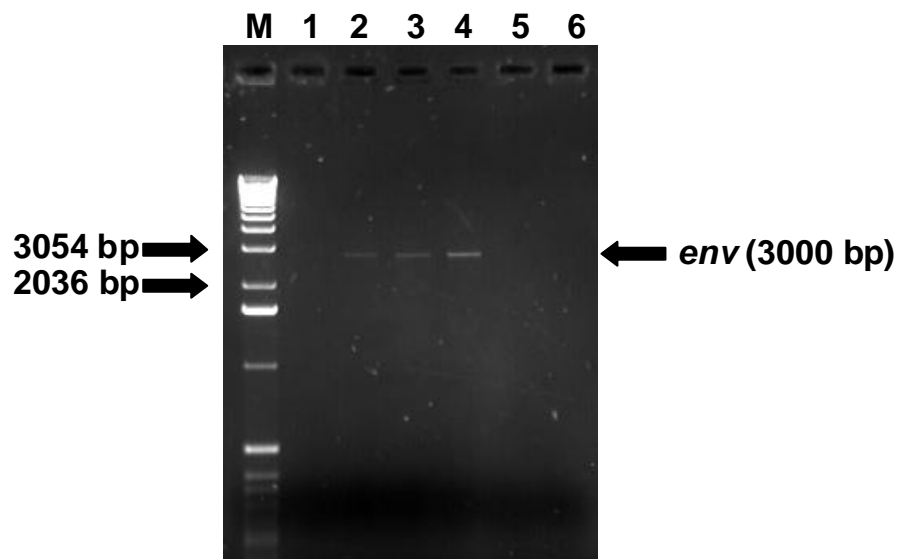
A



B



C



### Abb. 3.1 Amplifikation des *env*-Gens aus HIV-1-Patienten

(A) Schematische Darstellung der long-range-nested-PCR. A, N, C und Mn bezeichnen die eingesetzten Primer.

(B) Schema für die Klonierung der amplifizierten *env*-Gene in pNL4.3-BstEII.

(C) Darstellung der PCR-Produkte aus Patient U7. Die Spalten 1-4 zeigen die PCR-Produkte nach Einsatz von 200, 400, 600 und 800ng Lymphozyten-DNA. Die Spalten 5 und 6 zeigen die H<sub>2</sub>O-Kontrolle. In Spalte M wurde der Längenmarker (1kb-DNA-Ladder; Gibco) aufgetragen.

### 3.2 Klonierung der amplifizierten *env*-Gene

Die amplifizierten *env*-Gene wurden in pNL4.3-BstEII kloniert. Dabei handelt es sich um einen proviraler Klon, der in pBlueskript inseriert, und bei dem durch Mutagenese eine BstEII-Schnittstelle eingefügt wurde (Polzer *et al.*, 2001). Die Klonierung der *env*-Gene in den Vektor erfolgte über BstEII und XhoI-Schnittstellen (siehe Schema in Abb.3.1B). Auf diese Weise entstanden rekombinante provirale DNAs, die sich durch die jeweiligen Patienten-*env*-Gene unterschieden. Insgesamt wurden 30 rekombinante HIV-1-Klone hergestellt, die in Tabelle 3.2 aufgelistet sind. Das PCR-Produkt aus der 2. Blutprobe von Patient U7 (Entnahmedatum: 01-00) konnte nicht erfolgreich kloniert werden. Für nachfolgende Untersuchungen zur *in vivo* Variabilität der Hüllproteine wurde das PCR-Produkt eingesetzt.

**Tab. 3.2 Rekombinante HIV-1-Klone**

Patient	Datum	PCR-Produkt	Klone
K1	05-98	+	KN 3-2 KN 6-1 KN 9-4
H6	12-93	+	12-5 12-6 12-7
	01-95	+	A1 A2 A5 A6 A7
U7	05-98	+	K1 K5-4
	01-00	+	-
J5	01-98	+	G17 G19 G20 G21 G22
H4	12-93	+	B2 B4
D5	01-94	+	C20 C21 C22 C24
	01-98	+	H9 H10 H11 H13



### 3.3 Untersuchung zur *in vivo* Variabilität der klonierten *env*-Gene

Die HIV-Isolate aus verschiedenen Patienten weisen eine hohe Sequenzvariabilität auf, die vor allem auf die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase zurückzuführen ist. Eine besonders hohe Variabilität wurde für das Gen des Hüllproteins, insbesondere im Bereich der variablen Regionen (V1-V5), beschrieben. Um zu ermitteln, wie hoch die Variabilität der klonierten *env*-Gene aus der Hamburger Patientengruppe ist, wurden die V1-V2 und V3-Regionen aller Patienten sequenziert und untereinander verglichen. Zunächst wurde die Nukleotidsequenz der V1-V2 und V3-Regionen für alle Klone bestimmt, um einzelne Basenaustausche nachweisen zu können und so die intraindividuelle Sequenzvariabilität zu bestimmen. Die Nukleotidsequenz wurde auch als Grundlage für die interindividuelle Analyse der *env*-Gene aus der Patientengruppe benutzt. Darüber hinaus wurde die Aminosäuresequenz für die Klone ermittelt um darzustellen, ob sich eventuelle Basenaustausche als Aminosäuresubstitutionen widerspiegeln.

#### 3.3.1 Untersuchung der V3-Variabilität

Als variable Region werden Bereiche definiert, bei denen nicht mehr als 25% der Aminosäurereste konserviert sind (Modrow *et al.*, 1987). Demnach ist die Variabilität im V3-Bereich für die Hamburger Patientengruppe mit 37,1% relativ niedrig. Vergleicht man die Sequenzen der einzelnen Klone, die aus der selben Blutprobe eines Patienten gewonnen wurden, so sieht man, dass sie sehr wenig variabel sind (Abb. 3.2 und Tab 3.3). Eine Ausnahme stellen die Klone aus der zweiten Blutprobe von Patient H6 dar (Klone A1, A2, A3, A5, A6), die eine Variabilität von 18,9% zeigten. Während die Sequenzen der Klone A1, A2, A3 und A6 nur um 1% variierten, wick die V3-Sequenz von A5 sehr stark (18,9%) von den anderen Klonen ab. Bei diesem Patienten konnten demnach zwei Populationen, P2 (A1, A2, A3, A6) und P3 (A5) identifiziert werden. Für weitere Experimente sollte nach Möglichkeit mit Klonen aus beiden Populationen weitergearbeitet werden, um zu zeigen wie sich die unterschiedlichen Sequenzen auf den Phänotyp der Populationen auswirken.

**Tab. 3.3 Variabilität der V3-Region**

Patient	Datum	Virusklon	V3-Variabilität
K1	05-98	KN3-2 KN6 KN9-4	0%
H6	12-93	P1: 12-6 12-7	P1: 0%
	01-95	P2: A1 A2 A3 A6	P2: 1%
		P3: A5	P1/P2/P3: 19% P1/P2: 1,03% P1/P3: 18,9% P2/P3: 18,9%
U7	05-98	P1: K1 K5-4	P1: 0%
	01-00	P2: U7-00	P1/P2: 3,9%
J5	01-98	G17 G19 G20 G21 G22	1,02%
H4	12-93	B2 B4	0%
D5	01-94	P1: C21 C22 C24	P1: 0%
		01-98	P2: H9 H10 H11 H13
Gesamtpopulation			37,1%

Rekombinante Viren, die aus sequenziellen Blutproben eines Patienten entstanden waren, wurden als zwei verschiedene Populationen P1 und P2 bezeichnet. Klon A5 wurde aufgrund der stark von den anderen Klonen abweichenden Sequenz als separate Population P3 behandelt.

Bei allen anderen Patienten lag die maximale Sequenzabweichung für Klone, die aus der selben Blutprobe gewonnen wurden, bei maximal 2,9%.

Von Patient H6, U7 und D5 konnten die V3-Regionen aus sequenziellen Blutproben analysiert werden. Bei allen drei Patienten zeigten die Klone aus der zweiten Blutprobe (P2) Aminoäuresubstitutionen gegenüber den Klonen aus der

ersten Blutentnahme (P1). Die V3-Sequenzen der beiden Viruspopulationen P1 und P2 von Patient D5 variierten um 4,9%, die von Patient U7 um 3,9%. Auffällig waren wiederum die Klone aus Patient H6. Während die Population P2 (A1, A2, A3, A6) nur um 1% von P1 abwich, konnten für P3 viele Basenaustausche (16 Austausch und Deletion von drei Nucleotiden) beobachtet werden, die sich in einer Abweichung von 18,9% widerspiegeln.

Um nachzuweisen, ob sich einzelne Nukleotidsubstitutionen in den V3-Regionen der Viruspopulationen als Aminosäureaustausche manifestieren, wurde die Aminosäuresequenz für die Klone ermittelt (Tab. 3.4). Bei Patient D5 konnte in der Population P2 (Klone H9-H13) ein Aminosäureaustausch festgestellt werden: in Klon H11 war an Position 24 Threonin gegen Serin ausgetauscht. Alle anderen intraindividuellen Basenaustausche erwiesen sich als stille Mutationen. Im Gegensatz dazu konnten bei sequentiellen Klonen, Veränderungen in der Aminosäuresequenz detektiert werden. Bei Patient D5 fand in Position 34 ein Austausch von Arginin gegen Lysin statt; bei Patient U7 zeigte die V3-Sequenz aus der zweiten Blutprobe eine Substitution von Phenylalanin durch Leucin an Position 22 und eine Deletion der 27. Aminosäure. Die Aminosäuremutationen wirkten sich jedoch nicht auf die Ladung der V3-Regionen aus. Auffällig waren wiederum die Klone, die aus Patient H6 gewonnen wurden. Die Klone A1, A2, A3 und A6 zeigten, wie aus der Nukleotidsequenz zu erwarten war nur einen einzelnen Aminosäureaustausch an Position 13. Im Gegensatz dazu, wies die V3-Sequenz von Klon A5 im Vergleich zu 12-6 und 12-7 (P1) acht Substitutionen und eine Deletion auf. Die A5-Sequenz zeigte eine hohe Ähnlichkeit mit denen der Klone C21-C24 und H9-H13 aus Patient D5. Die V3-Region aus diesen Viren zeigte eine auffällige APGR-Variation in dem als hoch konserviert beschriebenen GPGR-Motiv der V3-Spitze, die von der Deletion einer Aminosäure an Position 27 gefolgt wird.

Patient K1

KN3-2V3 TGTACCAGACCCTCCAACAATACAAGAAAAAGTATAACTATAGGACCAGGACAAGTATTCTATAAAACAGGAGTATAATAGGAGATATAAGAAAAGCATATTGT  
KN9-4V3 -----  
KN6-5V3 -----

Patient H6

12-5V3 TGTACAAGACCTGGCAACAATACAAGAAAAAGTATACCTATAGGACCAGGGAAAAGCATTTTATGCAACAGGAGCCATAATAGGAGATATAAGAAAAGCACACTGT  
12-6V3 -----  
12-7V3 -----

A1V3 -----A-----A-----  
A2V3 -----A-----A-----  
A3V3 -----A-----A-----  
A6V3 -----A-----A-----G-----  
A5V3 -----CAAT-----G-G-----A-----C-----G-AG-GG---A-. . .-----T-----

Patient U7

K1V3 TGTACAAGACCCGGCAACAATACAAGAAAAAGTATACATTTTGGACCGGGGAGTGCATTTTATACAACAGAAATAATAGGAGATATAAGACAAGCACATTGT  
K5-4V3 -----  
U7-00V3 -----T-----A-----A-----T-----C-----C-----

Patient J5

G17V3 TGTACAAGACCCAACAACAATACAATAAAAAGGTATACATATAGGACCAGGGAGTGCATTTTATACAACAGGACAAATAGTAGGAGATATAAGACAAGCACATTGC  
G19V3 -----  
G20V3 -----G-----T  
G21V3 -----T  
G22V3 -----T

Abb. 3.2: Erklärung nächsteSeite

Patient H4

B2V3 TGTACAAGACCTAACAACAATACAAGAAAACGTATTAGTTTAGGACCAGGGAGAGTATTTTATAACAACAGGAGAAATAATAGGAGATATAAGACGAGCACATTGT  
B4V3 -----

Patient D5

C21V3 TGTACAAGACCCAATAACAATACAAGAAGAGGTATACATATAGCACCAGGGAGAAGATGGTATAACAACAGAAATAATAGGAGATATAAGAAGAGCATATTGT  
C22V3 -----  
C24V3 -----  
  
H9V3 -----A---C-----  
H10V3 -----A---C-----  
H11V3 -----T-----A---C-----  
H13V3 -----G-----A---GC-----

---

**Abb. 3.2: Nukleotidsequenzen der V3-Region**

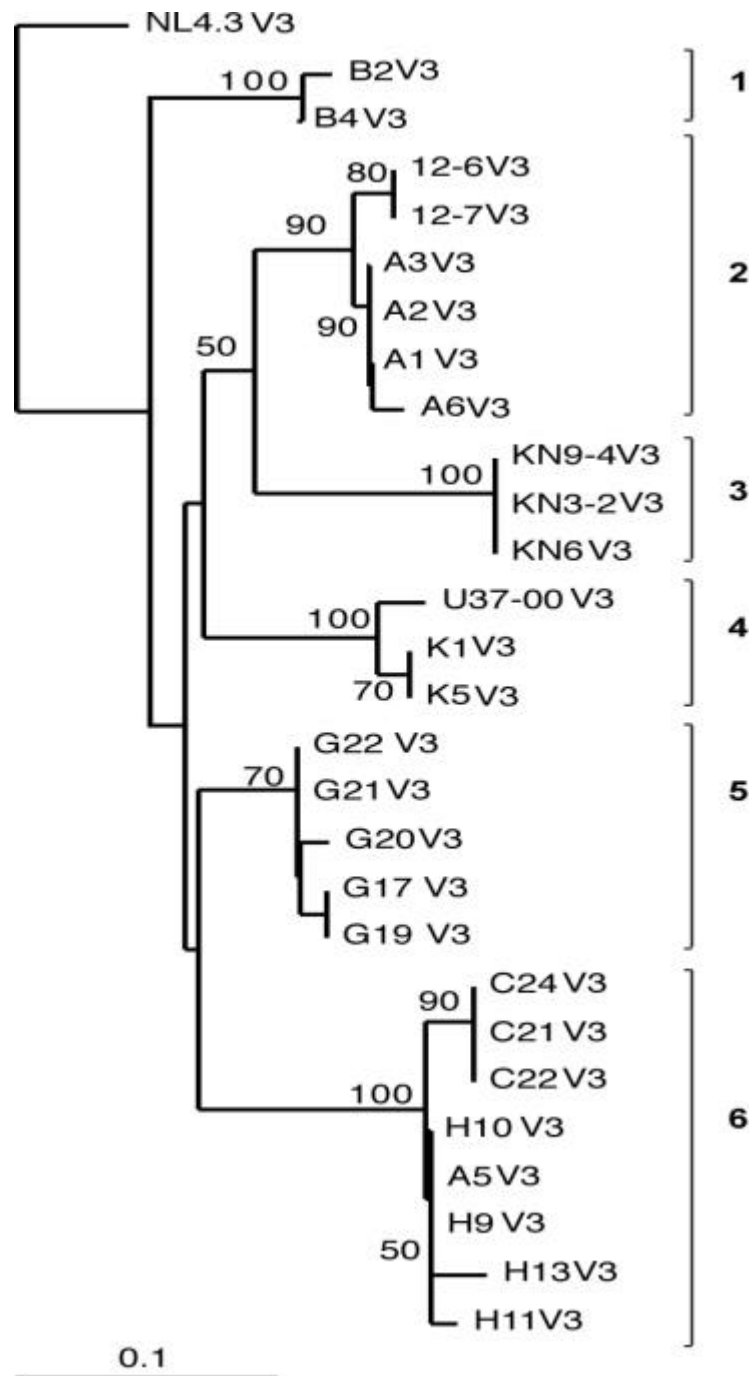
die Abbildung zeigt die Nukleotidsequenzen der V3-Schleife für die rekombinanten HIV-1-Klone.

---

Tab. 3.4 Aminosäuresequenzen der V3-Region

Patient	Datum	Klon	AS-Sequenz
		Konsensus	CTRPNNNTRKGIHI..GPGRAFYTTGAIIGDIRKAHC
K1	05-98	KN3-2	----S-----S-T-..---QV--K--D-----Y-
		KN6	----S-----S-T-..---QV--K--D-----Y-
		KN9-4	----S-----S-T-..---QV--K--D-----Y-
H6	12-93	12-6	----G-----S-P-..---K--A-----
		12-7	----G-----S-P-..---K--A-----
	01-95	A1	----G-----S---..---K--A-----
		A2	----G-----S---..---K--A-----
		A3	----G-----S---..---K--A-----
		A6	----G-----S---..---K--A-----
A5	-----R-----..A--RW--E.-----		
U7	05-98	K1	----G-----S--F..---S-----E.-----Q---
		K5-4	----G-----S--F..---S-----E.-----Q---
	U7-2000	----G-----..---S-L--D.-----Q---	
J5	01-98	G17	-----I-----..---S-----Q-V---Q---
		G19	-----I-----..---S-----Q-V---Q---
		G20	-----I-----..---S-----Q-V---Q---
		G21	-----I-----..---S-----Q-V---Q---
		G22	-----I-----..---S-----Q-V---Q---
H4	12-93	B2	-----R-SL..---V-----E-----R---
		B4	-----R-SL..---V-----E-----R---
D5	01-94	C21	-----R-----..A--RW--E.-----R-Y-
		C22	-----R-----..A--RW--E.-----R-Y-
		C24	-----R-----..A--RW--E.-----R-Y-
	01-98	H9	-----R-----..A--RW--E.-----K---
		H10	-----R-----..A--RW--E.-----K---
		H11	-----R-----..A--RW-S-E.-----K---
		H13	-----R-----..A--RW--E.-----K---
	NL4.3	-----S-R-QR-----V-I-K-GNM.-----	

Aus den Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe des Programmes ClustalX Stammbäume für die rekombinanten HIV-1-Klone berechnet, um so die Ähnlichkeiten besser darstellen zu können (Abb. 3.3). Das Programm berechnet aus den eingegebenen Daten zehn verschiedene Stammbäume, um so den wahrscheinlichsten Baum darzustellen. Die Auftrennung in einzelne Virusgruppen konnte deswegen als signifikant gewertet werden. An der geringen horizontalen Ausdehnung des Stammbaumes ist erkennbar, dass die



**Abb. 3.3: Ähnlichkeitsanalyse für den V3-Bereich**

Abbildung 3.3 zeigt den Stammbaum, der sich aus der computerunterstützten Ähnlichkeitsanalyse für den V3-Bereich der rekombinanten Virusklone ergab. Das Programm (Clustal X) berechnete insgesamt 10 Stammbäume, um so den wahrscheinlichsten Baum darzustellen. Die horizontale Längeneinheit gibt das Maß für 10% Variation an. Die Zahlen an den Gabelungen stellen den prozentualen Anteil der analysierten Stammbäume dar, die der abgebildeten Auftrennung entsprechen, um so die Signifikanz aufzuzeigen. Auf der Basis dieser Analyse konnten die Virusklone in sechs Gruppen eingeteilt werden.

analysierten Virusklone prinzipiell nahe miteinander verwandt sind. Trotzdem war eine Auftrennung in sechs Gruppen zu erkennen: Dabei stellten jeweils Klone, die aus der selben Blutprobe hergestellt wurden eine Gruppe dar (B2 und B4; KN2-3, KN6 und KN9-4 und G17-G22). Außerdem bildeten die Virusklone, die aus sequentiellen Blutproben eines Patienten hergestellt wurden in der Regel eine gemeinsame Gruppe (12-6, 12-7 und A1, 2, 3,6; K1, K5-4 und PCR-Produkt US37-00). Eine weitere Gruppe setzt sich aus den sequentiellen Klonen C21-C24 und H9-H11 des Patienten D5 zusammen. In diese Gruppe fällt außerdem Klon A5, dessen Sequenz sehr stark von den anderen Klonen aus Patient H6 abweicht

### **3.3.2 Untersuchung der Variabilität in der V1-V2-Region**

Die Sequenzen der V1-V2-Region (Abb. 3.4 und 3.5) der Viruspopulation zeigten mit 66,4% eine deutlich höhere Variabilität, als sie für die V3-Schleife gefunden wurde. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass in der V1-Region eine außerordentlich hohe Varianz von 90,7% gefunden wurde. Der V2-Bereich variierte hingegen nur um 53,5%. Auch die intraindividuellen Abweichungen waren mit maximal 7% höher als die des V3-Bereichs. Hier zeigte sich ebenfalls, dass die Varianz in der variablen Region V1 größer war als in V2. Die maximale Abweichung bei Klonen, die aus derselben Blutprobe hergestellt wurden, war für die V2-Region 4%, während im V1-Bereich bis zu 27,6% Varianz gefunden wurden. Die größten intraindividuellen Unterschiede (10,3%) wurden bei den Klonen 12-6 und 12-7 gefunden. Dabei ist interessant, dass sich die Variationen ausschließlich auf den V1-Bereich beschränken (ein Basenaustausch und Deletion von 19 Nukleotiden; 27,6% Abweichung), während die Sequenzen für die V2-Schleife identisch sind. Ein weiteres Beispiel für diese Beobachtung sind die Sequenzvergleiche der Klone G17-G22 (Patient J5) bei denen Basenpaarsubstitutionen allein in der V1-Region (4,2% Variabilität) detektiert wurden. Die Sequenzanalyse der Klone C22-24 (Patient D5) führte zu einem weiteren interessanten Ergebnis: C22 weist eine Deletion von drei Basenpaaren und einen Nukleotidaustausch im V2-Bereich auf, während bei C24 eine Insertion von drei Nukleotiden und vier Substitutionen in



der V1-Region stattgefunden hatten. Mutationsereignisse finden demnach unabhängig voneinander in beiden Regionen statt.

**Tab. 3.5 Variabilität der V1-V2-Region**

Patient	Datum	Virusklon	Variabilität		
			V1-V2	V1	V2
K1	05-98	KN3-2 KN6 KN9-4	0%	0%	0%
H6	12-93	P1: 12-6 12-7	P1: 10,3%	P1: 27,6%	0%
	01-95	P2: A5	P1/P2: 37,3%	P1/P2: 35%	23,7%
U7	05-98	K1 K5-4	0%	0%	0%
J5	01-98	G17 G19 G20 G21 G22	1,4%	4,2%	0%
H4	12-93	B2 B4	0%	0%	0%
D5	01-94	P1: C21 C22 C24	P1: 7%	P1: 7,8%	P1: 4%
	01-98	P2: H9 H10 H11 H13	P2: 0,9%	P2: 2,2%	P2: 0%
			P1/P2: 13,4%	P1/P2: 21,5%	7,8%
Gesamtpopulation			66,4%	90,7%	53,5%

Rekombinante Viren, die aus sequenziellen Blutproben eines Patienten entstanden waren, wurden als zwei verschiedene Populationen P1 und P2 bezeichnet.

Patient K1

KN3-2 V1 TGTGCCAATTTGACCAAAGTCAATAACATAACCAAAATAGGAAATATAACAATAGGAAATATAACAGATGGAGTAAGAACTGT  
KN6 V1 -----  
KN9-4 V1 -----

Patient H6

12-6 V1 TGCA.....CTAATTATACT...AATACCAATGCTACTAATATCAATAGTAGCTTGAAGATGGGGGAAGGAGAAAATACAAAAC.TGC  
12-7 V1 -----A-----  
A5 V1 ----CTGATGTGAATGTGACTG-----C---GTT-----A--GG....C-TGG-AA--A-A--.---A-A-A-----C--A-----C---

Patient U7

K1 V1 TGCAGTGATGGTAATACCACTAATACTAATAACCAATAGTAGTAATACCAATAGTAGTAAGTGGGGATTTGTGGAAAAAGGAGAAAATAAAAAACTGC  
K5-4 V1 -----

Patient J5

G17 V1 TGCAGTGATGGTAATACCACTAATACTAATAACCAATAGTAGTAATACCAATAGTAGTAAGTGGGGATTTGTGGAAAAAGGAGAAAATAAAAAACTGC  
G19 V1 -----  
G20 V1 -----A-----  
G21 V1 -----A--A-----  
G22 V1 -----

Patient H4

B2 V1 TGCAGTGATGGTAATACCACTAATACTAATAACCAATAGTAGTAATACCAATAGTAGTAAGTGGGGATTTGTGGAAAAAGGAGAAAATAAAAAACTGC  
B4 V1 -----

Abb.3.4: Legende nächste Seite

Patient D5

```
C21 V1      TGCACTGATGTGAATGTGACTGCTAATTACACTGTTAAT . . . ACCACTAC . . . TAGCC . . . TGGAAAAGATAGGGAATGGAGAAATAAAAACTG
C22 V1      -----
C24 V1      -----GGATG--TT-----

H9 V1      -----ACC-AT---GGCCT . . . GGAAAA . G-T . -----A-----C-----
H10 V1     -----ACC-AT---GGCCT . . . GGAAAA . G-T . -----A-----C-----
H11 V1     -----ACC-AT---GGCCT . . . GGAAAA . G-T . -----A-----C-----
H13 V1     -----ACC-AT---GGCCT . . . GGAAAA . G-T . -----A-----C-----
```

---

**Abb. 3.4: Nucleotidsequenz der V1-Region**

Abb. 3.3 zeigt die Nucleotidsequenz der V1-Region für die hergestellten rekombinanten HIV-1-Klone. Dargestellt ist die gesamte Sequenz mit dem Basentriplett, das für den Cysteinrest zwischen den beiden Variablen Bereichen V1 und V2 codiert.

---

Patient K1

```
KN3-2 V2   TCTTTTAAATATCACTACAAGCATGAGAGATAAGCCGCAGAAAGAGTATGCACTTTTTTTATAGGCTTGATATAGTACCAATTAAGACAATAACAGCAGTAGTGATGAG
KN6 V2     -----
KN9-4 V2   -----

KN3-2 V2   TATAGGTTAATAAATTGT
KN6 V2     -----
KN9-4 V2   -----
```

**Abb.3.5: Legende siehe übernächste Seite**

Patient H6

12-6 V2 TCTTTCAACATCACCACACGCATAAGAGATAAGGTGCAGAAAGAATATGCACTTTTTTATAAACTTGATGTAGTACCAATAGATAATAAAAAGTAATAAAAATGATAGC  
12-7 V2 -----  
A5 V2 --C-----T-----C-----GAG-AAG-----A-C-----C-GC-----G-----C-----T-AAGAC...TCCACC-A-  
12-6 V2 TATAGGTTGATAAGTTGT  
12-7 V2 -----  
A5 V2 ----T-----

Patient U7

K1 V2 TCTTTTAATATCACTACAAGCATGAGAGATAAGCCGCAGAAAGAGTATGCACTGTTTTATAAACTTGATGTCATACCAATGGGTGAGGAGAATGATACCAGCTATAGG  
K5-4 V2 -----  
K1 V2 TTGATAAGTTGT  
K5-4 V2 -----

Patient J5

G17 V2 TCTTTCAATATCACCACACCCATGAAAGATAAAGATGAAGACAGAATCTGCATATTTTTATAGACCTGATATAGAACCAATAGATAAGGATAATGAGAATAGTACTAGC  
G19 V2 -----  
G20 V2 -----  
G21 V2 -----  
G22 V2 -----  
G17 V2 TATAGGTTGATAAAGTTGT  
G19 V2 -----  
G20 V2 -----  
G21 V2 -----  
G22 V2 -----

Abb.3.5: Legende siehe nächste Seite

Patient H4

B2 V2 TCTTTC AATATC ACCACA AGCATA AGAGATA AAGGTGC AGAAAGA ATATGC ACTTTTT TATAAA CTTGAT ATAGT ACCAAT AGATA AATACT AGCTAT AGGTTG ATAAGTTGT  
B4 V2 -----

Patient D5

C21 V2 TCTTTC AATATC ACCACAC CCCATA AGAGA AGAAAG GCGGAAAA AACTAT GCAC TTTTT CTAGC CTTGAT GTAGT GCCAAT AGATA AATAATA AATTCC ACCCAACT ATAT  
C22 V2 ----- . . . -T-----  
C24 V2 ----- T-----

H9 V2 --C-----G-----A-----C-----AG-C-----  
H10 V2 --C-----G-----A-----C-----AG-C-----  
H11 V2 --C-----G-----A-----C-----AG-C-----  
H13 V2 --C-----G-----A-----C-----AG-C-----  
GTTGATAAGTTGT  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

---

**Abb.3.5: V2-Nukleotidsequenzen der rekombinanten HIV-1-Klone**  
Dargestellt ist die Sequenz für die variable Region V2 im Anschluss an das Basentriplett, das für den Cysteinrest zwischen V1- und V2-Bereich kodiert

---

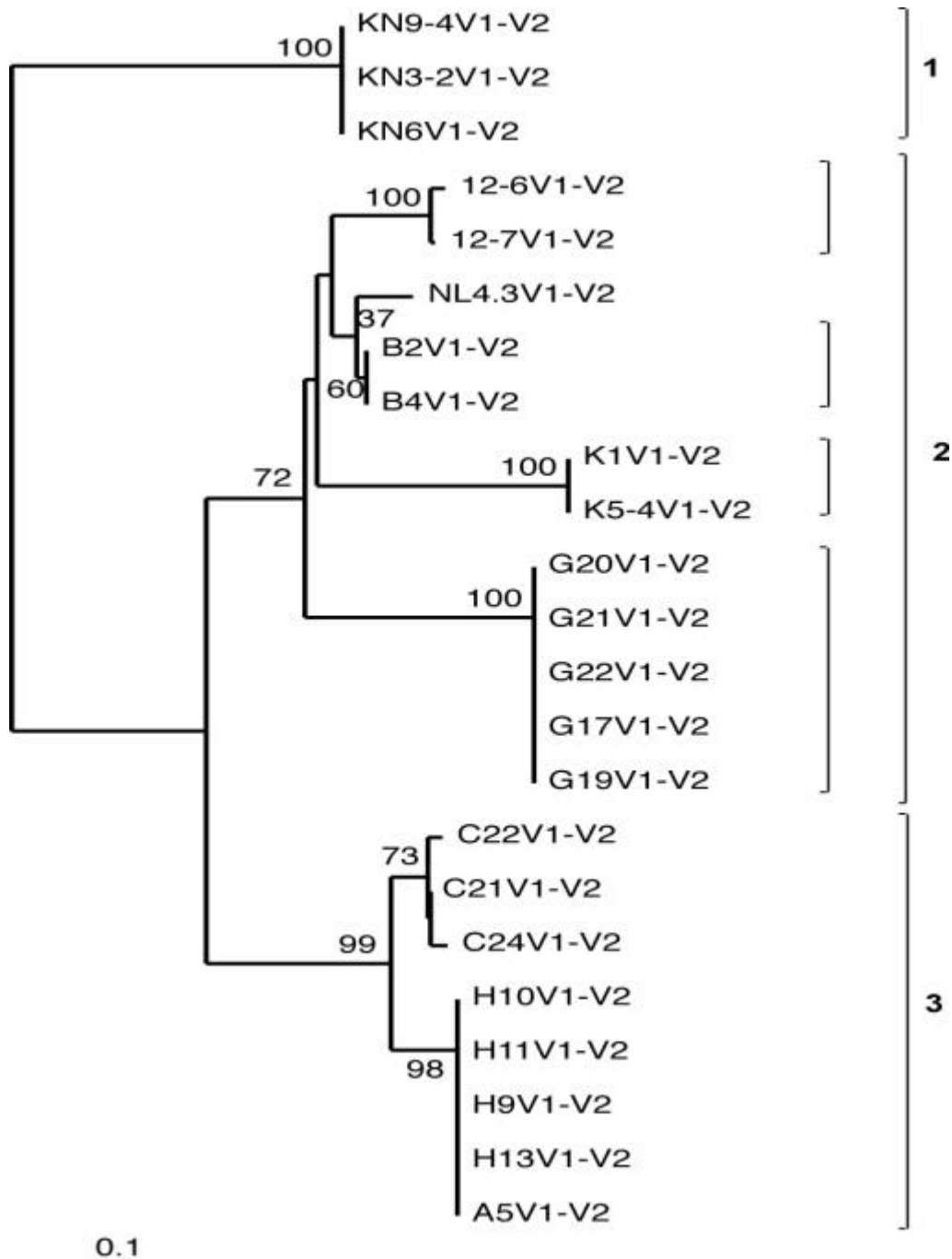
**Tab. 3.6 Aminosäuresequenz der V1-V2-Region der HIV-1-Klone**

Patient	Datum	Klon	AS-Sequenz V1-V2-Region		Länge (AS)			
			V1	V2	V1	V2	S	
K1	05-98	KN3-2	CTDVNNTNNTN...T.....IEKGEIKN C	SFNITTIIRDKRQKEYALFYKLDIVPID.NNENSTSYRLISC				
		KN6	-ANLTKV--.....TKIGNITIGN----V--	-M--EL---K--VH-----KD--SS-DE----N-	26	43	70	
		KN9-4	-ANLTKV--.....TKIGNITIGN----V--	-M--EL---K--VH-----KD--SS-DE----N-	26	43	70	
H6	12-93	12-6	--NYT---A--INSSLK.....M-E---Q-	-----R---V-----V---NKSNDKND-----	25	42	68	
		12-7	--NYT--.....SLK.....M-E---Q-	-----R---V-----V---NKSNDKND-----	18	42	61	
	01-95	A5	---A-V-A-YTVNTN-GLE.DR.....-E--L--	-----GE-----.-KD-N-M--S-	29	41	71	
U7	05-98	K1	--C--T--TNTNSSN-N...SSNWGF..V-----	-----SM---P-----V--M-.E--D-----	31	40	72	
		K5-4	--C--T--TNTNSSN-N...SSNWGF..V-----	-----SM---P-----V--M-.E--D-----	31	40	72	
J5	01-98	G17	-----T--NASS-N...SSTSGG..R-----	-----MK--MKT-S-Y--R---E---KD-----	31	42	74	
		G19	-----T--NASS-N...SSTSGG..R-----	-----MK--MKT-S-Y--R---E---KD-----	31	42	74	
		G20	-----T--NASS-N...SSTNGG..R-----	-----MK--MKT-S-Y--R---E---KD-----	31	42	74	
		G21	---E---T-----					
		G22	-----T--NASS-N...SSTSGG..R-----	-----MK--MKT-S-Y--R---E---KD-----	31	42	74	
H4	12-93	B2	----R---T--.....TTRHSGKL.M-----	-----S---V-----.....	27	36	64	
		B4	----R---TT-.....TTRHSGKL.M-----	-----S---V-----.....	27	36	64	
D5	01-94	C21	---					
		C22 C24	----V-A-YTVNTT-SLE.....	-----EE-R-----SS--V---.-N.-N-M--S-	27	40	68	
	01-98	H9	---A-V-A-YTVNTN-GLE.DR.....-L--	-----GE---N---SS--V---.-KD--N-M--S-	29	41	71	
H10		---A-V-A-YTVNTN-GLE.DR.....-L--	-----GE---N---SS--V---.-KD--N-M--S-	29	41	71		
H11		---A-V-A-TTVNTN-GLE.DR.....-L--	-----GE---N---SS--V---.-KD--N-M--S-	29	41	71		
H13								
		NL4.3	---LK-DT-.....TNSSGRMIM-----	-----S-S---V-----F-----N-----				

Die hohe Variabilität der V1-V2-Region spiegelt sich in der Aminosäuresequenz besonders deutlich wider (Tab.3.6). Auffällig war die hohe Anzahl an Deletionen, die neben einer Vielzahl von Aminosäureaustauschen detektiert wurde. Dadurch kam es zu starken Variationen in der Sequenzlänge. Die V1-V2-Region schwankte in ihrer Länge zwischen 61 und 74 Aminosäuren. Dabei zeigte sich erneut eine höhere Variabilität in der V1- (18-31 AS) als in der V2-Region (36-43 AS).

In der Aminosäuresequenz wird besonders deutlich, dass der Klon A5, wie bereits für die V3-Sequenzen festgestellt wurde, sehr stark von den Klonen 12-6 und 12-7 aus der ersten Blutprobe des Patienten H6 abweicht und eine große Ähnlichkeit zu den Klone aus Patient D5 (C21-C24 und H9-H13) zeigt. Die Sequenzierung des V1-2 Bereiches war für die Klone A1, A2, A3 und A6 nicht erfolgreich, weshalb nicht untersucht werden konnte, ob auch hier zwei deutlich verschiedene Populationen zu definieren sind.

Der aus der computerunterstützten Ähnlichkeitsanalyse entstandene Stammbaum (Abb.3.6) spiegelte mit seiner, gegenüber dem V3-Stammbaum (Abb.3.3), starken horizontalen Ausbreitung die höhere Variabilität des V1-V2-Bereichs wider. Auch für die V1-V2-Region konnten Klone, die aus der selben Blutprobe bzw. aus dem selben Patienten hergestellt worden waren, als einzelne Subpopulationen dargestellt werden. Erneut zeigte sich, dass der Klon A5 aus Patient H6 aufgrund seiner ähnlichen Sequenz eine gemeinsame Population mit den Klonen aus Patient D5 (Klone C21-C24 und H9-H13) bildete. Da die Sequenz der V1-V2-Region länger ist, als die V3-Sequenz, konnte die Stammbaumanalyse hier genauer erfolgen. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Subpopulationen der Klone 12-6/12-7, B2/B4, K1/K5, G17-G22 gemeinsam mit der V1-2-Sequenz von NL4.3 zu einer übergeordneten Population zusammenfassen ließen. Insgesamt konnten also drei Populationen unterschieden werden: Population 1 mit den Klonen KN3-2, KN6 und KN9-4, Population 3 zu der die Klone aus Patient D5 und der Klon A5 gehörten und Population 2, in der alle anderen Klone zusammengefasst werden konnten.



### Abb. 3.6: Ähnlichkeitsanalyse für die V1-V2-Region

Abbildung 3.6 zeigt den Stammbaum, der sich aus der computerunterstützten Ähnlichkeitsanalyse für den V3-Bereich der rekombinanten Virusklone ergab. Das Programm (Clustal X) berechnete insgesamt 100 Stammbäume, um so den wahrscheinlichsten Baum darzustellen. Die horizontale Längeneinheit entspricht 10% Variation. Die Zahlen an den Gabelungen stellen den prozentualen Anteil analysierten Stammbäume dar, die der abgebildeten Auftrennung entsprechen, um so die Signifikanz aufzuzeigen. Auf der Basis dieser Analyse konnten die Virusklone in sechs Gruppen eingeteilt werden



### 3.4 Phänotypische Charakterisierung der rekombinanten HIV-1-Klone

Nach der genotypischen Analyse sollten die rekombinanten HIV-1-Klone im Bezug auf Wirtszelltropismus und Korezeptornutzung phänotypisch charakterisiert werden. Dazu wurden die rekombinanten proviralen Plasmide transfiziert und die Infektiosität und Replikationsfähigkeit der Virusüberstände auf verschiedenen Primärzellen und Indikator-Zelllinien untersucht.

#### 3.4.1 Transfektion der rekombinanten HIV-1-Klone

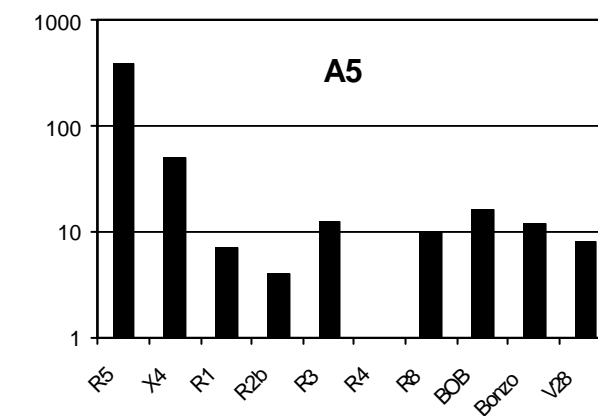
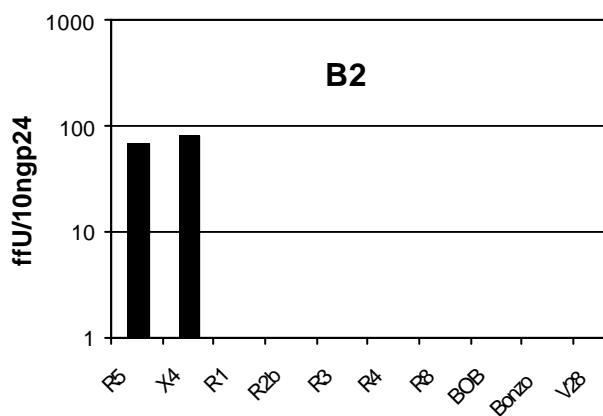
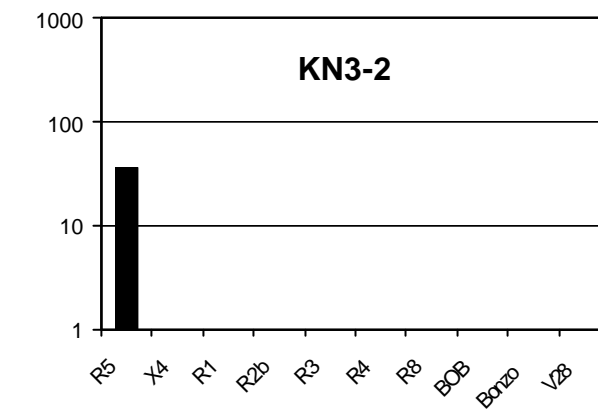
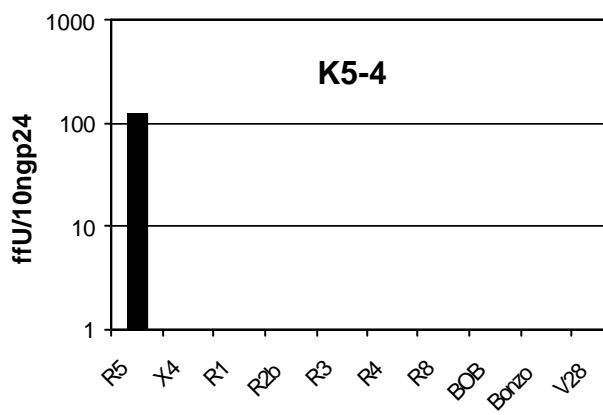
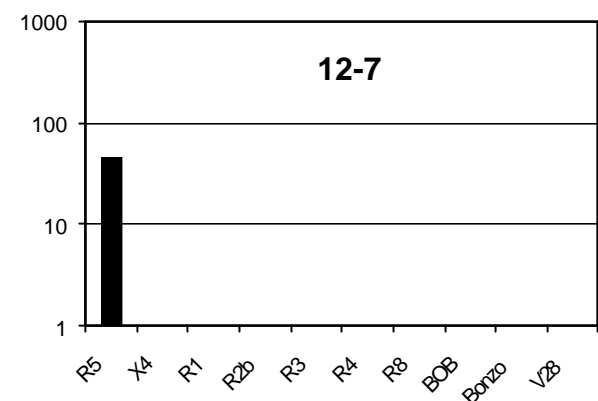
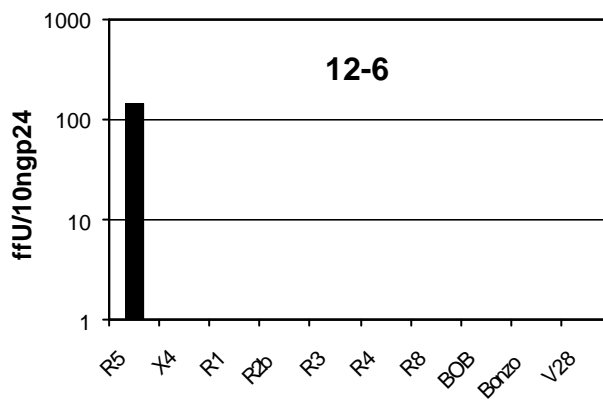
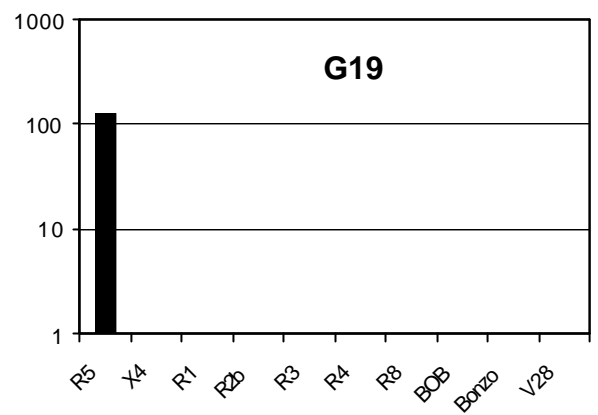
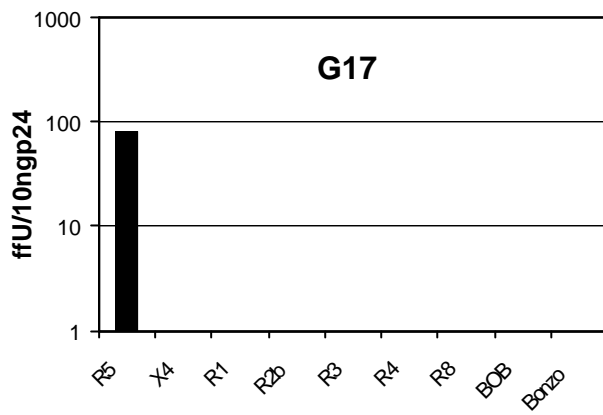
Um die Infektiosität der rekombinanten HIV-1-Klone untersuchen zu können, mußten zunächst Virusüberstände hergestellt werden. Dafür wurden, wenn möglich, drei Klone pro Patient und Blutentnahmezeitpunkt, unter Verwendung der Kalzium-Phosphat-Methode, in HelaP4/CCR5-Zellen transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Virusüberstände geerntet und zur Überprüfung der Infektiosität erneut auf HelaP4/CCR5 gegeben. Der Nachweis infizierter Zellen erfolgte durch Immunfärbung. Die genotypische Analyse der Virusklone (3.3) ergab, dass aus der zweiten Blutprobe der Patienten H6 zwei verschiedene Virustypen kloniert worden waren. Von diesen Viren konnte jedoch nur A5 als eindeutig infektiös getestet werden, weshalb bei der phänotypischen Charakterisierung nur eine Variante berücksichtigt werden konnte. In Tabelle 3.7 sind die als infektiös getesteten Klone aufgelistet.

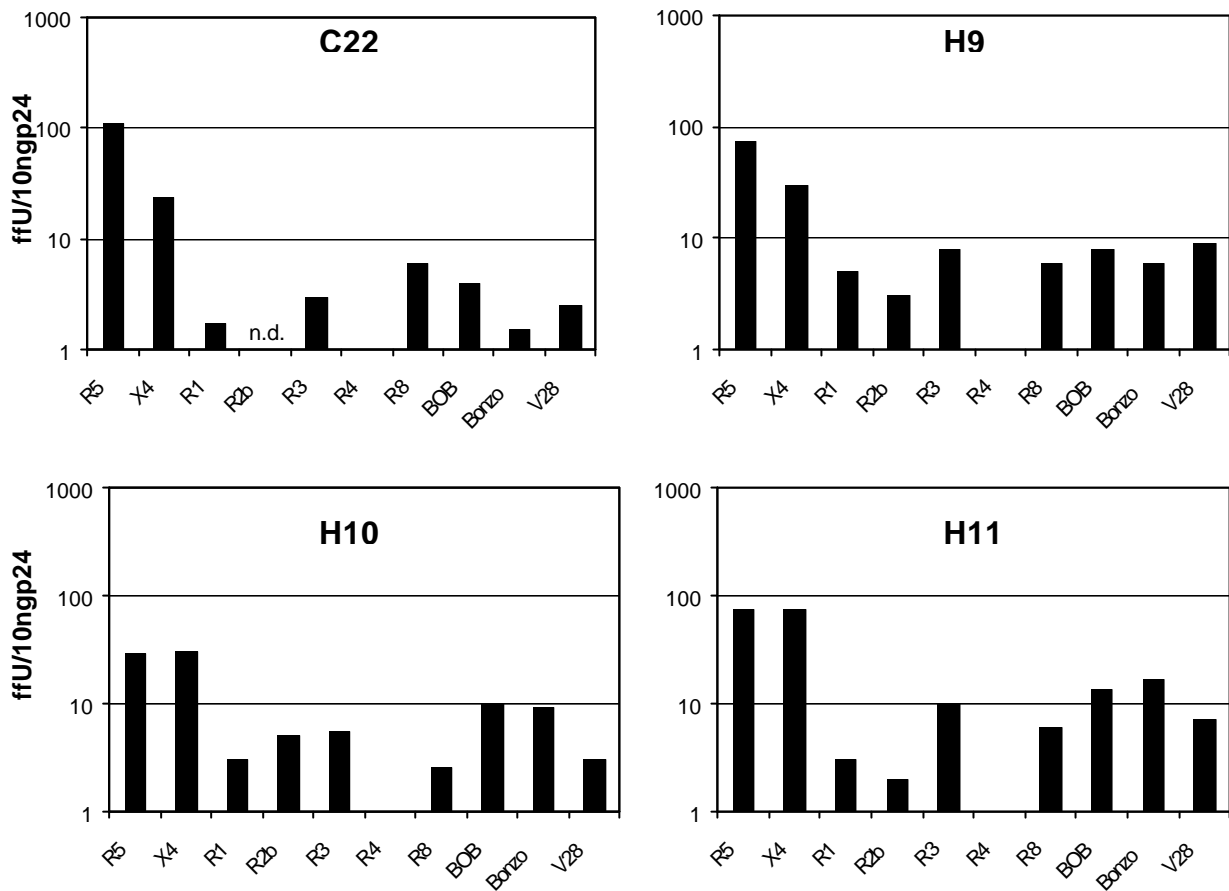
**Tab. 3.7 Infektiöse Klone**

Patient	Datum	infektiöse Klone
K1	05-98	KN3-2
H6	12-93	12-6 12-7
	01-95	A5
	05-98	K5-4
J5	01-98	G17 G19
	12-93	B2
D5	01-94	C22
	01-98	H9 H10 H11

### 3.4.2 Ermittlung der *in vitro* genutzten Korezeptoren durch Infektion von Indikatorzelllinien

Um in die Wirtszelle zu gelangen, benötigt HIV-1 zwei Rezeptoren: CD4 und einen Chemokinrezeptor. Verschiedene HIV-Isolate lassen sich durch die Nutzung unterschiedlicher Chemokinrezeptoren charakterisieren. *In vivo* spielen dabei hauptsächlich CCR5 und CXCR4 eine Rolle, während bei *in vitro* Infektionsversuchen weitere mögliche Korezeptoren entdeckt wurden. Eine gute Möglichkeit, die *in vitro* genutzten Korezeptoren zu ermitteln, bietet die Infektion von Indikatorzelllinien. In der vorliegenden Arbeit wurden GHOST-Zellen benutzt, humane Osteosarkom-Zelllinien, die neben CD4 jeweils einen von zehn Korezeptoren (CCR5, CXCR4, CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR8, BOB, Bonzo, V28) exprimieren. Infizierte Zellen wurden durch Immunfärbung nachgewiesen. Die Ergebnisse aus den Korezeptorstudien (Mittelwert aus Doppelbestimmungen) sind in Abb.3.7 dargestellt. Alle Klone, die aus derselben Blutprobe eines Patienten hergestellt wurden, zeigten einen einheitlichen Phänotyp. Innerhalb der Patientengruppe ergaben die Korezeptorstudien für die rekombinanten Viren jedoch ein sehr variables Muster der Korezeptornutzung, was nach der in 3.3 ermittelten hohen Sequenzvariabilität der Virusklone zu erwarten war. Neben sechs Klonen, die ausschließlich CCR5-positive Zellen infizieren konnten (G17, G19, 12-6, 12-7, K5-4, KN3-2, KN9-4), wurde ein dualtropes Virus gefunden, das sowohl CCR5 als auch CXCR4 zur Infektion von GHOST-Zellen nutzen konnte (B2). Die HIV-1-Klone A5, C22, H9, H10 und H11 erwiesen sich als multitrop und konnten bis zu neun verschiedene Korezeptoren benutzen, um in die Indikatorzelllinie zu gelangen. Für A5, H9, H10 und H11 wurden neben CCR5 und CXCR4 auch CCR1, CCR2b, CCR3, CCR8, BOB, Bonzo und V28 als *in vitro* genutzte Korezeptoren identifiziert. Für Klon C22 konnte bei den CCR3- und Bonzo-exprimierenden Zelllinien nur eine sehr geringe Anzahl p24-positiver Zellen nachgewiesen werden (weniger als 3 ffu/10ng p24), so dass diese nicht als eindeutig infizierbar gewertet wurden. Die Zelllinie GHOST-CCR2b wurde für diesen Klon nicht getestet. Überraschend war bei diesen fünf Virusklonen, dass der Chemokinrezeptor CCR1 zur Infektion von GHOST-Zellen genutzt werden konnte, da CCR1 bislang vor allem als möglicher Korezeptor für HIV-2 beschrieben wurde.





**Abb. 3.7: *in vitro* Korezeptornutzung der rekombinanten HIV-1-Klone**

Zur Ermittlung der *in vitro* genutzten Korezeptoren wurden GHOST-Zellen infiziert, die neben CD4 jeweils einen von 10 Korezeptoren exprimieren. Infizierte Zellen wurden durch Immunfärbung bestimmt und ausgezählt. Dargestellt ist die Anzahl der blau gefärbten Syncytien („focus forming units“; ffU; Mittelwert aus Doppelbestimmungen) pro 10 ng p24. Die Zelllinie GHOST-CCR2b wurde für das rekombinante Virus C22 nicht getestet (n.d.).

Frühere Untersuchungen zeigten, dass es im Verlauf einer HIV1-Infektion zur Veränderung des Phänotyps der vorherrschenden Virusvariante kommen kann. Dabei konnte sowohl ein vollständiger Wechsel im Tropismus (CCR5 zu CXCR4) beobachtet werden, als auch eine Verbreiterung des Spektrums der genutzten Korezeptoren (Connor *et al.*, 1997) Anhand der Virusklone aus den sequentiellen Blutproben der Patienten H6 und D5 konnte untersucht werden, ob diese Beobachtung auch bei den Hamburger Patienten bestätigt werden kann. Bei Patient H6 war eine deutliche Veränderung des Phänotyps zu beobachten: während die vorherrschende Virusvariante zum Zeitpunkt der

ersten Blutentnahme im Dezember 1993 nur CCR5 (Klone 12-6, 12-7) zu Infektion von GHOST-Zellen nutzte, wurde Klon A5, der aus der zweiten Blutprobe (Januar 1995) generiert wurde, als multitrop charakterisiert (CCR5, CXCR4, CCR1, CCR2b, CCR3, CCR8, BOB, Bonzo, V28). Auch bei den Klonen, die aus Patient D5 zu den unterschiedlichen Blutentnahmezeitpunkten erhalten wurden, konnte eine leichte Veränderung in der Korezeptornutzung festgestellt werden: der Virusklon C22 von Januar 1994 konnte im Gegensatz zu der im Januar 1998 klonierten Virusvariante (H9, H10, H11) die Chemokinrezeptoren CCR1 und Bonzo nicht eindeutig nutzen. Es war also in der Zeit zwischen den beiden Blutentnahmen zu einer Verbreiterung der Phänotyps gekommen.

Zur deutlicheren Darstellung der Veränderung der Korezeptornutzung in den Patienten H6 und D5 sind wurden die entsprechenden Klone zusätzlich in Tabelle 3.8 aufgelistet.

**Tabelle 3.8 Veränderung der Korezeptornutzung im Verlauf der Infektion**

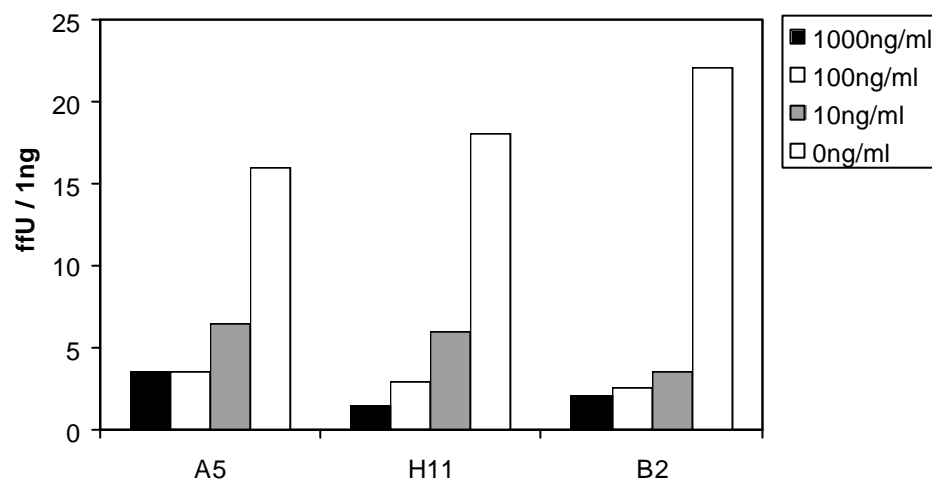
Patient	Datum	Klon	Korezeptoren
H6	12-93	12-6, 12-7	R5
	01-95	A5	R5, X4, R1, R3, R8, BOB, Bonzo, V28, (R2b)
D5	01-94	C22	R5, X4, R3, R8, BOB, V28
	01-98	H9, H10, H11	R5, X4, R1, R3, R8, BOB, Bonzo, V28, (R2b)

Die Zelllinie GHOST-CCR2b wurde für den Klon C22 nicht getestet und deshalb in Klammern dargestellt

### 3.4.3 Inhibition der Infektion durch AMD3100

Zum Nachweis der Spezifität der *in vitro*-Korezeptornutzung sollte auf der GHOST-CXCR4-Zelllinie exemplarisch ein Inhibitionsversuch durchgeführt werden. Dabei wird der Chemokinrezeptor durch den Antagonisten AMD3100 blockiert um so die Infektion durch CXCR4-nutzende Viren zu verhindern. Die Zellen wurden zunächst mit unterschiedlichen AMD3100-Konzentrationen vorbehandelt und dann mit dem dualtropen Virus B2 bzw. den multitropen Viren A5 und H11 (Viruskonzentration: 1ng p24/ml) infiziert. Die infizierten Zellen

wurden nach drei Stunden gewaschen und für weitere drei Tage mit den entsprechenden Konzentrationen des Antagonisten inkubiert. Der Nachweis der infizierten Zellen erfolgte durch Immunfärbung. In Abb. 3.8 ist die Anzahl der p24-positiven Zellen für die jeweilige Chemokinkonzentration dargestellt (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen). Für alle drei getesteten Virusklone konnte eine dosisabhängige Inhibition der CXCR4-anhängigen Infektion nachgewiesen werden. Aus der gemessenen Inhibition für unterschiedliche AMD3100-Konzentrationen wurde die Dosis berechnet, bei der die Infektion durch HIV-1 zu 50% inhibiert werden kann ( $IC_{50}$ ): die  $IC_{50}$  lag für die untersuchten Virusklone bei 6-8 ng/ml (A5: 6ng/ml; H11: 7ng/ml; B2: 8ng/ml). Diese Werte entsprachen der von Schols *et al.* (1997) publizierte  $IC_{50}$  von 2-7ng/ml. Aufgrund der Inhibition durch AMD3100 wurde die unter 3.4.2 gezeigte Infektion von GHOST-CXCR4 als spezifisch beurteilt.



**Abb. 3.8: Inhibition der Infektion von GHOST-CXCR4 durch AMD 3100**

Abb. 3.8 zeigt die Inhibition der Infektion von GHOST-CXCR4-Zellen durch das dualtrope Virus B2 und die multitropen Klone A5 und H11. Die Inhibition wurde mit 10, 100 und 1000 ng AMD durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine Infektion ohne Zugabe von AMD durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus der Doppelbestimmung.

### 3.4.4 Infektion von peripheren Blutlymphozyten

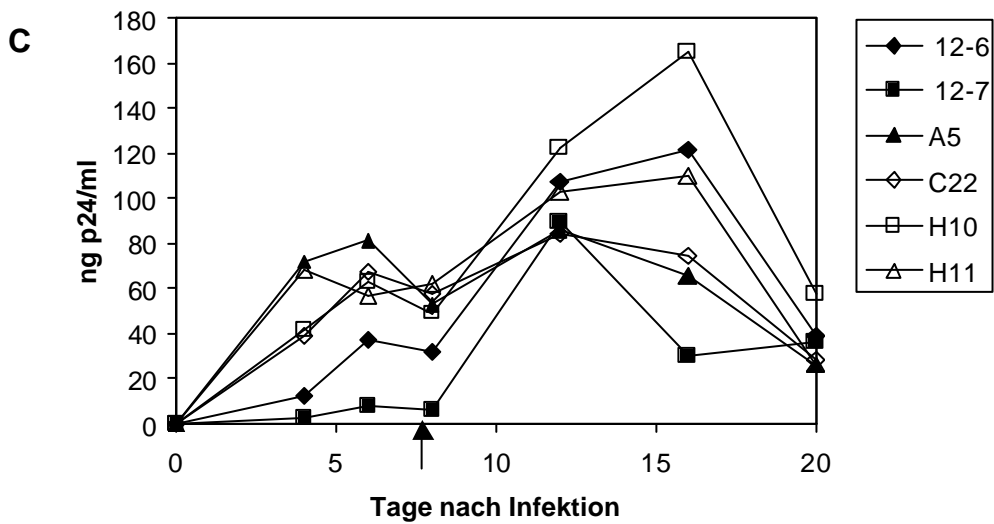
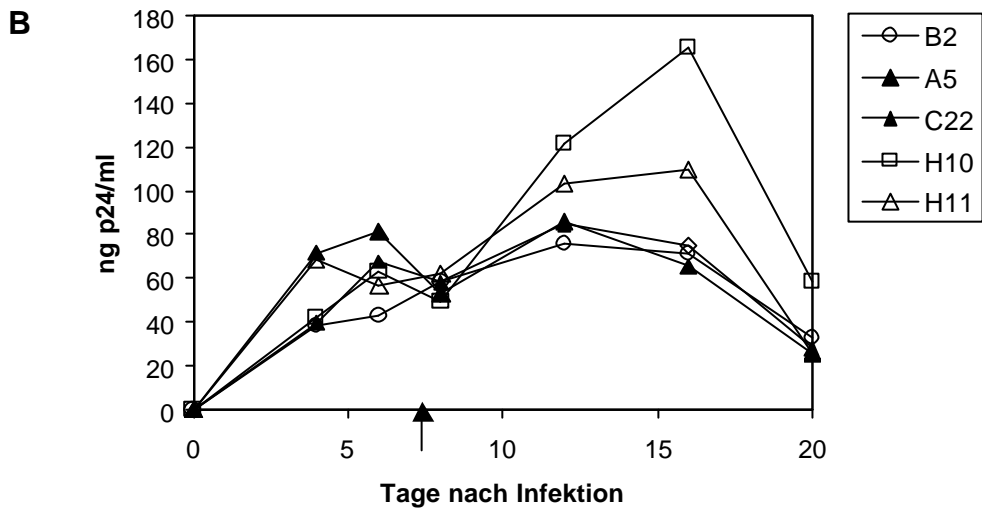
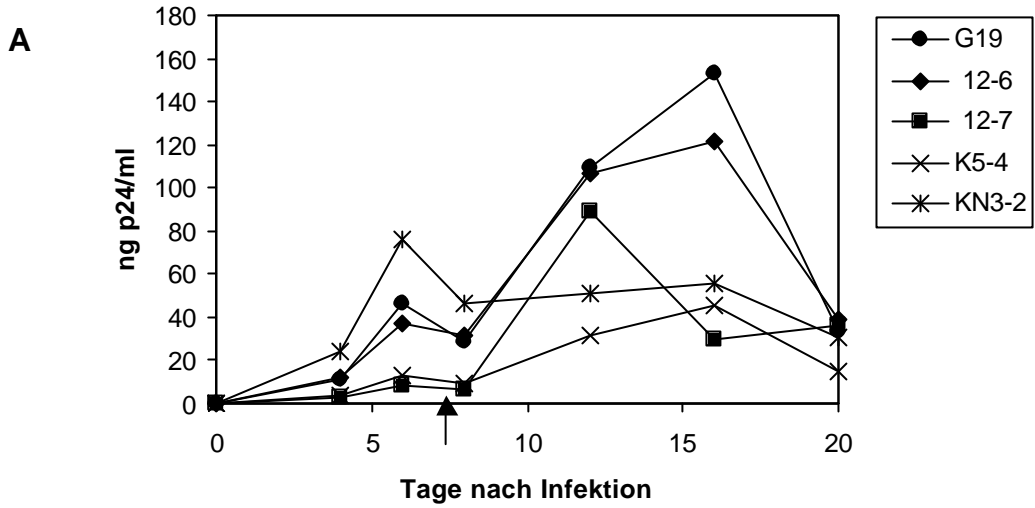
Die Hauptzielzellen von HIV sind CD4-positive Lymphozyten. Aus diesem Grund ist es wichtig, zur Charakterisierung der rekombinanten HIV-1-Klone, ihre Replikationsfähigkeit auf peripheren Blutlymphozyten (engl.: peripheral blood monocytes = PBMC) zu untersuchen. Dazu wurden PBMC von gesunden Blutspendern isoliert und stimuliert. Um donorspezifische Effekte auszuschließen, wurden die Blutzellen von zwei Spendern gemischt. Die Infektion mit den unterschiedlichen HIV-1-Klonen (10ng p24/Napf) erfolgte in 48-Napf-Platten ( $1 \times 10^6$  Zellen/Napf). Die infizierten Zellen wurden nach 24 Stunden gewaschen und für drei Wochen in Kultur gehalten. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen Virusüberstand genommen und der p24-Wert mit Hilfe eines p24-ELISA bestimmt. Die Infektionsversuche erfolgten als Vierfachansätze. Wie in Abb. 3.9 gezeigt ist, waren alle getesteten Klone in der Lage, PBMC zu infizieren. Bei den dual- und multitropen Viren (B2, A5, C22, H10, H11; Abb. 3.9B) ist tendenziell in den ersten sechs Tagen ein schnellerer Anstieg der p24-Konzentration zu beobachten als bei den R5-Viren (G19, 12-6, 12-7, K5-4, KN3-2; Abb. 3.9A). Im weiteren Verlauf konnte jedoch kein genereller Unterschied zwischen diesen Gruppen beobachtet werden. Auch zwischen den Klonen, die aus sequenziellen Blutproben eines Patienten gewonnen wurden, ist keine generelle Veränderung der Infektiosität auf PBMC zu erkennen (Abb. 3.9C). Der dramatische Verlust an p24 im Überstand ab Tag 16 ist auf den durch die Viren verursachten cytopathischen Effekt zurückzuführen. Der Rückgang der p24-Konzentration an Tag 8 lässt sich durch den zuvor erfolgten Mediumwechsel begründen.

---

**Abb. 3.9: Infektion von PBMC** (folgende Seite)

PBMC wurden mit verschiedenen Virusklonen infiziert (10ng p24), gewaschen und für drei Wochen kultiviert. Nach 0, 4, 6, 8, 12, 16 und 20 Tagen wurde Überstand genommen und die p-24-Konzentration bestimmt. Die Graphik zeigt die im ELISA gemessenen p24-Konzentrationen (Mittelwert aus Vierfachansätzen) für die CCR5-nutzenden Klone (A) und die dual-bzw. multitropen Klone (B). (C) zeigt die p24-Werte für die sequentiellen Klone aus den Patienten H6 (gefüllte Zeichen) und D5 (leere Zeichen). Der Pfeil kennzeichnet den Mediumwechsel an Tag 7, durch den sich der Rückgang der p24-Konzentration an Tag 8 erklären lässt.

---





### 3.4.5 Infektion von Makrophagen

HIV-1-Isolate variieren stark in ihrer Fähigkeit, Makrophagen zu infizieren. Während CCR5-nutzende Viren (NSI-Viren) meistens einen Makrophagentropismus zeigten, wurden bei SI-Viren (Viren, die CXCR4 und möglicherweise zusätzliche Korezeptoren nutzen) große Unterschiede in der Infektiosität auf diesem Zelltyp publiziert (Collin *et al.* 1994; Simmons *et al.*, 1996). Aus diesem Grund ist die Fähigkeit Makrophagen zu infizieren ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung von Virus-Klonen. Makrophagen wurden aus Buffycoats isoliert und in 24-Napf-Platten ( $1 \times 10^5$  Zellen/Napf) ausgesät. Die Infektion (50ng p24) mit exemplarisch ausgewählten Klonen erfolgte in Doppelansätzen. Die infizierten Zellen wurden nach 24 Stunden gewaschen und für drei Wochen in Kultur gehalten. Der Nachweis der p24-infizierten Zellen erfolgte durch Immunfärbung. Wie erwartet, waren alle CCR5-nutzenden Viren in der Lage, Makrophagen zu infizieren (Abb.3.10). Darüber hinaus konnte der Makrophagentropismus auch für die dual- (B2) und multitropen (A5, H9, H10) Virusklone gezeigt werden. Auffällig waren die quantitativen Unterschiede bei der Infektion von Makrophagen mit multitropen Viren. Während mit den Klonen H9, H10 und H11 nur wenige Zellen infiziert werden konnten (1-6 ffU/50ng p24), zeigte die Infektion mit A5 die höchste Anzahl an positiven Makrophagen.

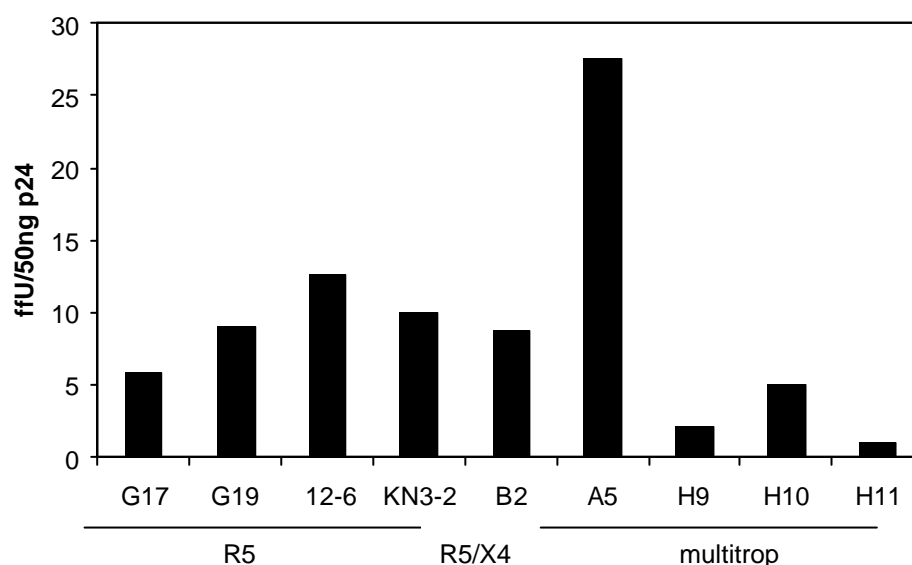


Abb. 3.10: Erklärung folgende Seite

---

**Abb. 3.10: Infektion von Makrophagen** (vorherige Seite)

Makrophagen wurden aus Buffycoats isoliert, in 24-Napf-Platten ausgesät und mit exemplarisch ausgewählten Virusklonen infiziert (50ng p24). Infizierte Zellen wurden durch Immunfärbung nachgewiesen. Dargestellt ist die Anzahl der blaugefärbten infizierten Zellen (focus forming units; ffU; Mittelwert aus Doppelansätzen) pro 50ng p24.

---

### 3.5 Die rekombinanten Virusklone weisen eine deutliche Variabilität auf

Zusammenfassend kann man sagen, dass die rekombinanten Virusklone, die aus den Blutproben der Hamburger Patientengruppe hergestellt wurden, eine deutliche Variabilität aufwiesen. Sequenzanalysen zeigten, obwohl die V3-Schleife im Vergleich zur V1-V2-Region weniger variabel war, dass deutliche Sequenzunterschiede zwischen den Klonen der einzelnen Patienten bestehen. Neben Abweichungen in der Aminosäuresequenz zwischen unterschiedlichen Patienten konnten auch Substitutionen in den *env*-Genen beobachtet werden, die aus sequentiellen Blutproben amplifiziert wurden (Patient H6, U7 und D5). Diese Variabilität spiegelt sich im Phänotyp der Virusklone wider. Korezeptorstudien mit GHOST-Zellen ergaben, dass ein breites Spektrum an unterschiedlichen Korezeptoren zur Infektion genutzt werden konnte: neben CCR5 nutzenden Viren (G17, G19, 12-6, 12-7, K5-4, KN3-2) konnte ein dualtroper (CCR5/CXCR4) Virusklon (B2) gefunden werden und außerdem Viren (A5, C22, H9, H10, H11), die bis zu neun verschiedene Korezeptoren nutzen konnten. Auffällig war dabei die Tatsache, dass die Klone A5, H9, H10 und H11 in der Lage waren, GHOST-Zellen über CCR1 zu infizieren, einem Korezeptor, der bislang nur für HIV-2 beschrieben wurde. Abgesehen von der hohen Variabilität innerhalb der Patientengruppe, konnte auch eine Veränderung der genutzten Korezeptoren bei Klonen festgestellt werden, die aus sequenziellen Blutproben eines Patienten hergestellt wurden (Patienten H6 und D5). Trotz großer Unterschiede bei den *in vitro* genutzten Korezeptoren, zeigten Infektionsstudien auf primären Zellen keine entsprechenden Differenzen zwischen den Virusklonen.

### 3.6 Korrelation von Phänotyp und Krankheitsstatus

Wie bereits in Abschnitt 3.4.1. erwähnt wurde, kann es im Verlauf einer HIV-Infektion zu einer Veränderung im Phänotyp der vorherrschenden Virusvariante kommen. Es wurde außerdem festgestellt, dass verschiedene Virusvarianten unterschiedlich starke cytopathische Effekte zeigen. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass SI-Viren (dual-, multitrope und reine CXCR4-Viren) die, im Vergleich zu NSI-Isolaten (CCR5-Viren), eine erhöhte Pathogenität zeigen, erst in einem späteren Stadium der Erkrankung auftreten, während NSI-Viren zum Zeitpunkt der Serokonversion vorherrschen (Schuitemaker *et al.*,1992). Diese Behauptung soll anhand der in der vorliegenden Arbeit hergestellten und charakterisierten Virusklone überprüft werden. Dazu wurden die phänotypisierten rekombinanten Viren, dem Krankheitsstatus der Patienten zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt zugeordnet (siehe Tab. 3.1) und mit dem in 3.4.2 bestimmten Phänotyp verglichen. Die Ergebnisse der Einteilung sind in Tab.3.9 dargestellt. Die Zuordnung ergab, dass CCR5-nutzende NSI-Viren ebenso wie dual- und multitrope SI-Viren sowohl in asymptomatischen Patienten gefunden wurden, als auch in Patienten bei denen AIDS diagnostiziert wurde. So wurden aus den Blutproben der Patienten D5 und H4, die sich beide in dem späten Krankheitsstadium C3 befanden, multitrope (C22, H9, H10, H11) bzw. dualtrope Viren (B2) kloniert, die aufgrund der genutzten Korezeptoren als SI-Viren bezeichnet werden können. Aus den Blutproben von zwei weiteren Patienten (U7 und J5), die gemäß ihrer klinischen Daten einem sehr fortgeschrittenen Krankheitsstadium zugeordnet (B3) wurden, wurden jedoch CCR5-Viren (NSI) kloniert. Ähnliches konnte auch für die als asymptomatisch beschriebenen Patienten K1 und H6 festgestellt werden. Aus den Blutproben beider Patienten wurden zunächst rekombinante Viren hergestellt, die als CCR5-nutzende NSI-Viren charakterisiert wurden (K1: KN3-2; H6: 12-6, 12-7). Andererseits wurde aus der zweiten Blutprobe des asymptomatischen Patienten H6 der Klon A5 hergestellt, der in der Lage war neun verschiedene Korezeptoren zu nutzen und demnach zum SI-Phänotyp gehört. Eine Korrelation von Virusvariante und Krankheitsstadium des Patienten konnte also nicht festgestellt werden.

**Tab.3.9 Zuordnung der HIV-1-Klone zu den Krankheitsstadien der Patienten**

Status	Viruslast	Patient	Datum	Klone	Phänotyp
<b>A1</b> Symptom-frei	<50	K1	05-98	KN3-2,	R5 NSI
	n.a.	H6	12-93	12-6,7	R5 NSI
			01-95	A5	R5, X4, R1, R2b, R3, SI R8, BOB, Bonzo, V28
<b>B3</b> AIDS	<50	U7	05-98	K5-4	R5 NSI
	~2000-5000	J5	01-98	G17, 19	R5 NSI
<b>C3</b> AIDS	<50	H4	12-93	B2	R5, X4 SI
	~2000	D5	01-94	C22	R5, X4, R3, R8, BOB, SI V28
			01-98	H9,10, 11	R5, X4,R1, R2b, R8, SI BOB, Bonzo, V28

Der Phänotyp wurde zusätzlich in NSI (non-syncycium-inducing) und SI (syncycium-inducing) eingeteilt. Dabei galten R5-Viren als NSI und dual- bzw. multitrope Klone als SI.

### 3.7 Untersuchungen zur Vorhersage des Phänotyps

Bei der Entwicklung neuer Therapeutika, werden vermehrt Chemokine bzw. Chemokinantagonisten eingesetzt, die durch Blockieren oder Internalisieren des Korezeptors den Viruseintritt in die Wirtszelle hemmen. Der Einsatz solcher Inhibitoren macht es notwendig, dass der behandelnde Arzt den Phänotyp der vorherrschenden Virusvariante in einem Patienten kennt. Die Anzucht und Charakterisierung von Virusisolaten aus dem jeweiligen Patienten ist zeitaufwendig und in der Praxis nicht durchführbar. Aus diesem Grund wird nach Möglichkeiten für eine schnelle Bestimmung des Phänotyps gesucht. Anhand der in der vorliegenden Arbeit hergestellten und charakterisierten Virusklone, sollte untersucht werden, ob es möglich ist, den Phänotyp eines Virus anhand seiner Aminosäuresequenz vorherzusagen. Grundlage für diese Untersuchungen stellte eine 1994 von Donaldson *et al.* publizierte Methode dar.

Dabei werden Viren in zwei Gruppen eingeteilt: Syncyzium-induzierende (SI) und nicht Syncyzium-induzierende (NSI) Viren. Für beide Gruppen wurde anhand der Los Alamos Datenbank (HIV-Sequenz-Datenbank des Los Alamos National Laboratory, USA) eine Konsensussequenz der V3-Region ermittelt. Die zu untersuchenden Virusisolate wurden sequenziert und die Anzahl der gegenüber der Konsensussequenz veränderten Aminosäuren ermittelt. Außerdem wurde die Nettoladung für die V3-Sequenzen berechnet.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Virusklone wurde in gleicher Weise analysiert, wobei CCR5-nutzende Viren als NSI- und dual- bzw. multitrope als SI-Viren eingeteilt wurden. Die Anzahl der Abweichungen von der jeweiligen Konsensussequenz und die Nettoladungen der V3-Region, die für die einzelnen Virusklone bestimmt wurden, sind in Tab.3.10 aufgeführt.

**Tab.3.10 Analyse der Aminosäuresequenzen der V3-Region der HIV-1-Klone**

	AS-Sequenz V3-loop	Anz. Variationen	Nettoladung
Konsensus NSI	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEEIIDIRQAHC		
G17	-----I-G-----S-----Q-V-----	4	2
G19	-----I-G-----S-----Q-V-----	4	2
KN3-2	----S-----T----QV-K---D-----K-Y-	8	4
12-6	----G-----P----K---A-A-----K---	6	4
12-7	----G-----P----K---A-A-----K---	6	4
K5	----G-----F---S-L-----	4	2
Konsensus SI	CTRPNNNTRKRIHIGPGRAFYTTGQIIIGDIRQAHC		
A5	-----RG---A---RW---.E-----K---	8	5
B2	-----SL----V-----E-----R---	5	5
C22	-----RG---A---RW---.E-----R-Y-	9	5
H9	-----RG---A---RW---.E-----K---	8	5
H10	-----RG---A---RW---.E-----K---	8	5
H11	-----RG---A---RW-S-.E-----K---	9	5

Die ermittelten Werte wurden in einem Plot (Nettoladung/Anzahl an AS-Variationen) dargestellt (Abb. 3.11A). Um eine größere Viruspopulation untersuchen zu können, wurden außerdem Daten von publizierten Virusisolaten (Los Alamos Datenbank) hinzugefügt (Abb. 3.11B). Wie von Donaldson *et al.* publiziert, ergab sich eine klare Trennung zwischen den beiden Virus-

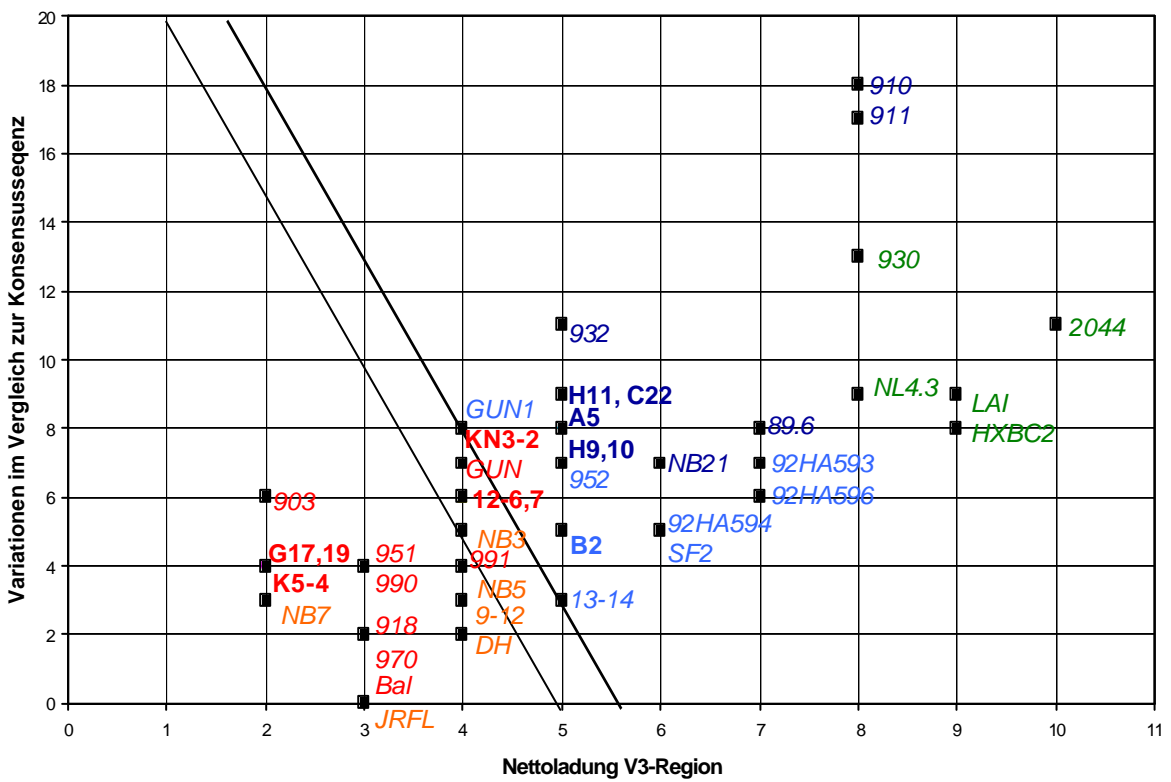
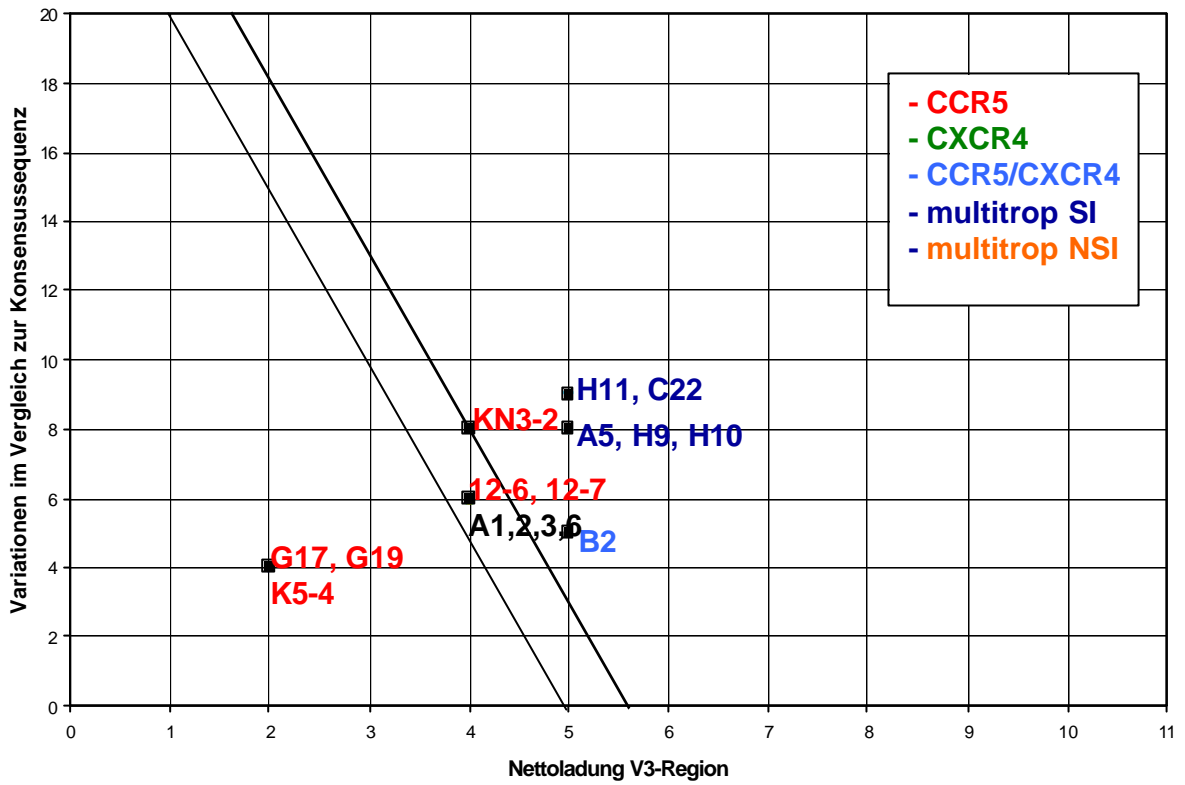
Gruppen: Die V3-Sequenzen der NSI-Viren wiesen durchweg eine niedrigere Nettoladung und weniger Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zur Konsensussequenz auf als die V3-Sequenzen der SI-Viren. Darüber hinaus ließen sich die SI-Viren in zwei Untergruppen unterteilen: in einem mittleren Bereich von Aminosäuresubstitutionen und V3-Nettoladungen wurden distinkte Ansammlungen von dual- bzw. multitropen Viren gefunden. Die reinen X4-Viren bildeten hingegen eine Gruppe, die die höchsten Nettoladungen und die meisten Aminosäuresubstitutionen aufwies. Diese Einteilung in drei Gruppen macht es möglich, dass anhand der V3-Sequenz nicht nur zwischen NSI- und SI-Viren unterschieden, sondern auch eine Voraussage gemacht werden kann, ob es sich um dual- bzw. multitrope SI-Viren handelt.

---

**Abb. 3.11: Vorhersage des *in vitro* Phänotyp (Abbildung nächste Seite)**

Die V3-loop-Sequenzen der analysierten Virusklone wurden nach Nettoladung und Anzahl der Variationen im Vergleich zur Konsensussequenz eingeteilt und in ein Diagramm eingetragen (A). Die dünne schwarze Linie entspricht der Grenze, zwischen NSI- und SI-Isolaten, die von Donaldson *et al.* (1994) publiziert wurde, die dicke schwarze Linie entspricht der Grenze, wie sie nach den Analysen in der vorliegenden Arbeit gezogen wurde. Die entsprechenden Daten für die Klone A1, A2, A3 und A6 (schwarz) wurden hinzugefügt, um eine Vorhersage über den Phänotyp machen zu können. Um eine größere Virusgruppe untersuchen zu können, wurden die V3-loop-Sequenzen von publizierten Klonen auf die gleiche Weise analysiert und in Diagramm (B) eingetragen.

---



## **Teil II – Etablierung eines Zellkultursystems zur *in-vitro* Differenzierung von T-Zellen**

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante HIV-1-Klone aus Patientenmaterial hergestellt und charakterisiert. Für eine derartige Viruspopulation gibt es verschiedene Anwendungsmöglichkeiten. Eine davon, ist die gezielte Infektion bestimmter Zelltypen, um auf diese Weise mehr über die Pathogenese einer HIV-1-Infektion zu lernen. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil versucht, ein *in vitro* System zur T-Zell-Differenzierung zu etablieren. Das Differenzierungssystem soll später dazu benutzt werden, die Infektiosität von HIV-1-Isolaten bzw. -Klonen auf verschiedenen T-Zell-Differenzierungsstadien zu untersuchen.

Bevor mit der Etablierung des Differenzierungssystems begonnen werden konnte, musste die Qualität des Ausgangsmaterials, der haematopoetischen Stammzellen untersucht werden. Neben Reinheit der Präparation, war außerdem erforderlich, dass sich die CD34-positiven Zellen zur Proliferation und Differenzierung anregen lassen. Ob diese Voraussetzungen erfüllt werden, sollte in entsprechenden Vorversuchen überprüft werden.

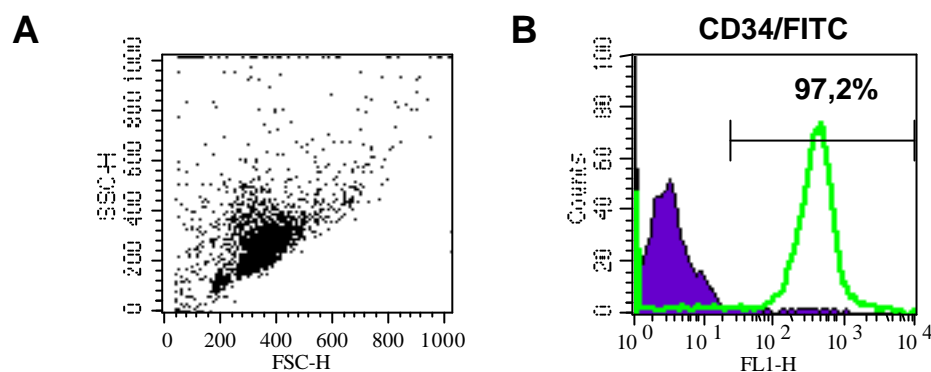
### **3.8 Präparation von CD34<sup>+</sup>-Stammzellen**

Als Ausgangsmaterial für die T-Zell-Differenzierung sollten CD34-positive haematopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut isoliert werden. Dazu wurden zunächst die Lymphozyten aus dem Blut gewonnen und daraus mit Hilfe von immunomagnetischen Kügelchen die CD34-positiven Stammzellen aufgereinigt. Um die Reinheit der Separation zu untersuchen, wurden die Zellen mit Antikörper gegen CD34 markiert und im Durchflußzytometer gemessen. Die CD34-Präparation war zwischen 94,5 und 97,2 % rein (Tab 3.11). Abb. 3.12 zeigt das Histogramm aus einer FACS-Analyse nach CD34-Separation.



**Tab. 3.11 Reinheit der CD34-Präparation**

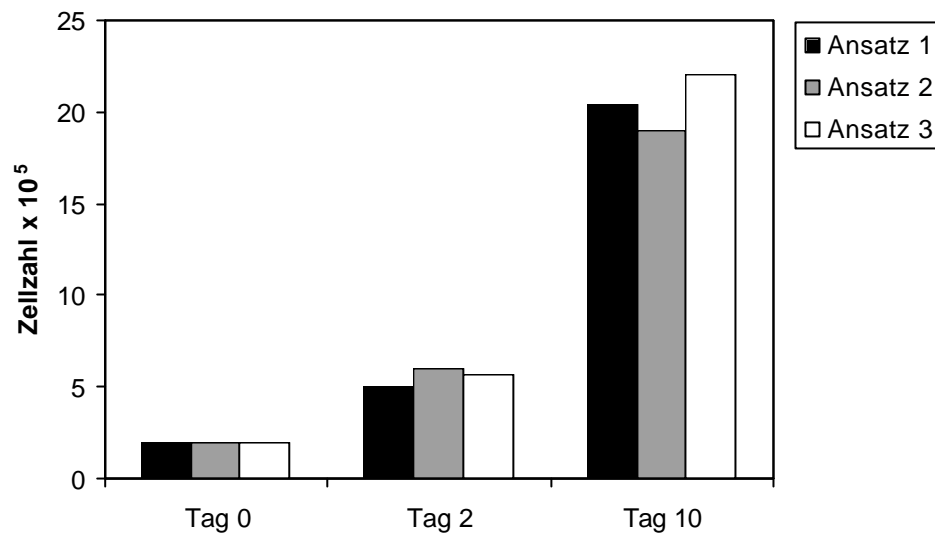
Präparation	Reinheit CD34
1	97,2 %
2	94,5 %
3	96,1%

**Abb. 3.12: Reinheit der CD34-Präparation nach Isolierung mit immunomagnetischen Kügelchen**

CD34-positive Zellen wurden mit Hilfe von immunomagnetischen Kügelchen (MACS-Separation) aus Nabelschnurblut isoliert. Die Reinheit der Präparation wurde nach Markierung mit einem  $\alpha$ -CD34-FITC-Antikörper durchflußzytometrisch analysiert. A zeigt die Auftrennung der Gesamtzellpopulation nach Größe und Granularität (FSC/SSC). In B ist die Grünfluoreszenz der FITC-markierten CD34-positiven Zellen (mit Prozentzahl) dargestellt.

### 3.9 Die isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen können zur Proliferation angeregt werden

Um die Proliferationsfähigkeit der aufgereinigten CD34-positiven Zellen zu überprüfen, wurde eine von von Laer *et al.* (2000) publizierte Methode zur Expansion von haematopoetischen Stammzellen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in BIT-Medium kultiviert, dem die Zytokine Flt3, IL3 und SCF zugesetzt wurden. Wie in Abb. 3.13 dargestellt ist wurden die Stammzellen unter diesen Kulturbedingungen zur Proliferation angeregt. Nach zwei Tagen hatten sich die Zellen um das zwei- bis dreifache vermehrt, während nach zehn Tagen Expansionskultur etwa zehn mal so viele Zellen gezählt wurden wie an Tag Null.



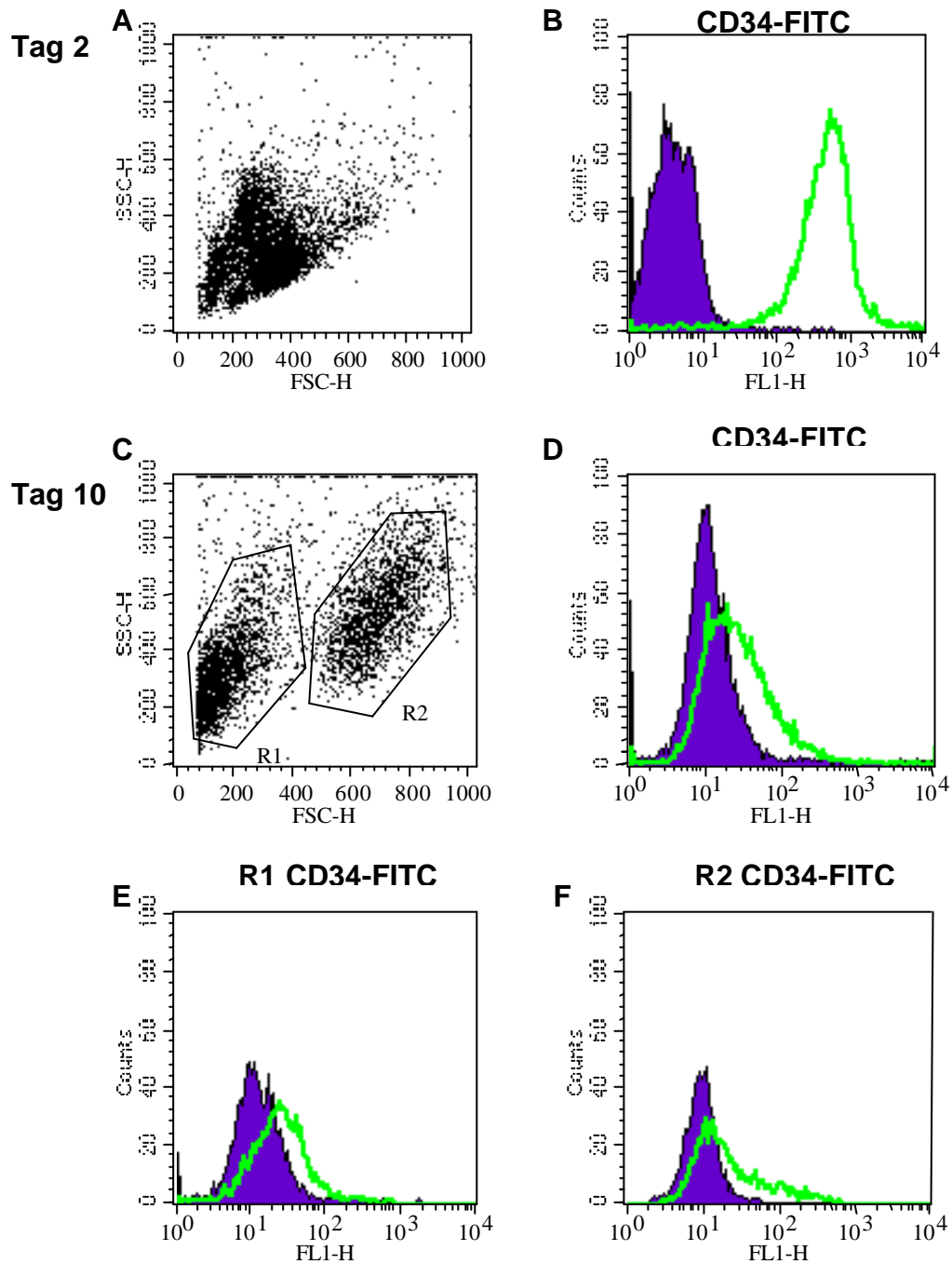
---

**Abb. 3.13: Proliferationsfähigkeit der haematopoetischen Zellen**

CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden mit Flt3, IL3 und SCF supplementiertem BIT-Medium in Kultur genommen. Diese Kulturbedingungen führten zur Expansion der Zellen. In Abb.3.13 ist die Zunahme der Zellzahl von drei Kulturansätzen über einen Zeitraum von zehn Tagen dargestellt.

---

Neben einer deutlichen Zunahme der Zellzahl konnte auch eine phänotypische Veränderung der Zellen beobachtet werden. FACS-Analysen zeigten, dass alle Zellen zu Beginn der Expansionskultur CD34-positiv waren. Auch am zweiten Tag unter diesen Kulturbedingungen exprimierten alle Zellen CD34 an ihrer Oberfläche. Die durchflußzytometrische Untersuchung der Zellen an Tag Zehn zeigte jedoch ein stark verändertes Bild: es konnten kaum noch CD34-positive Zellen nachgewiesen werden. Außerdem war die Zellpopulation in sich heterogen geworden. Stellt man die Zellpopulation aufgetrennt nach Größe und Granularität dar, lassen sich zwei Subpopulationen erkennen. Die Zellen aus beiden Populationen erwiesen sich als größtenteils CD34-negativ. Dieser Verlust von CD34 auf der Zellmembran, kann als Hinweis auf Differenzierung der Stammzellen unter Einfluss von Zytokinen interpretiert werden. Die durchflußzytometrische Analyse der Expansionskultur ist in Abb. 3.14 dargestellt.



**Abb. 3.14: Veränderung der Phänotyps nach 10 Tagen Expansionskultur**

Abb.3.14 zeigt Ergebnisse der FACS-Analysen von Tag 2 und 10 der Expansionskultur. Dargestellt ist die Gesamt-Population aufgetrennt nach Größe und Granularität (A und C) und die Expression von CD34 ( $\alpha$ -CD34-FITC) an der Oberfläche (B, D, E, F). An Tag 10 können zwei Subpopulationen erkannt werden (C), die als R1 und R2 bezeichnet, und separat analysiert wurden (E und F).

### 3.10 Überprüfung des Differenzierungspotentials der CD34<sup>+</sup>-Zellen

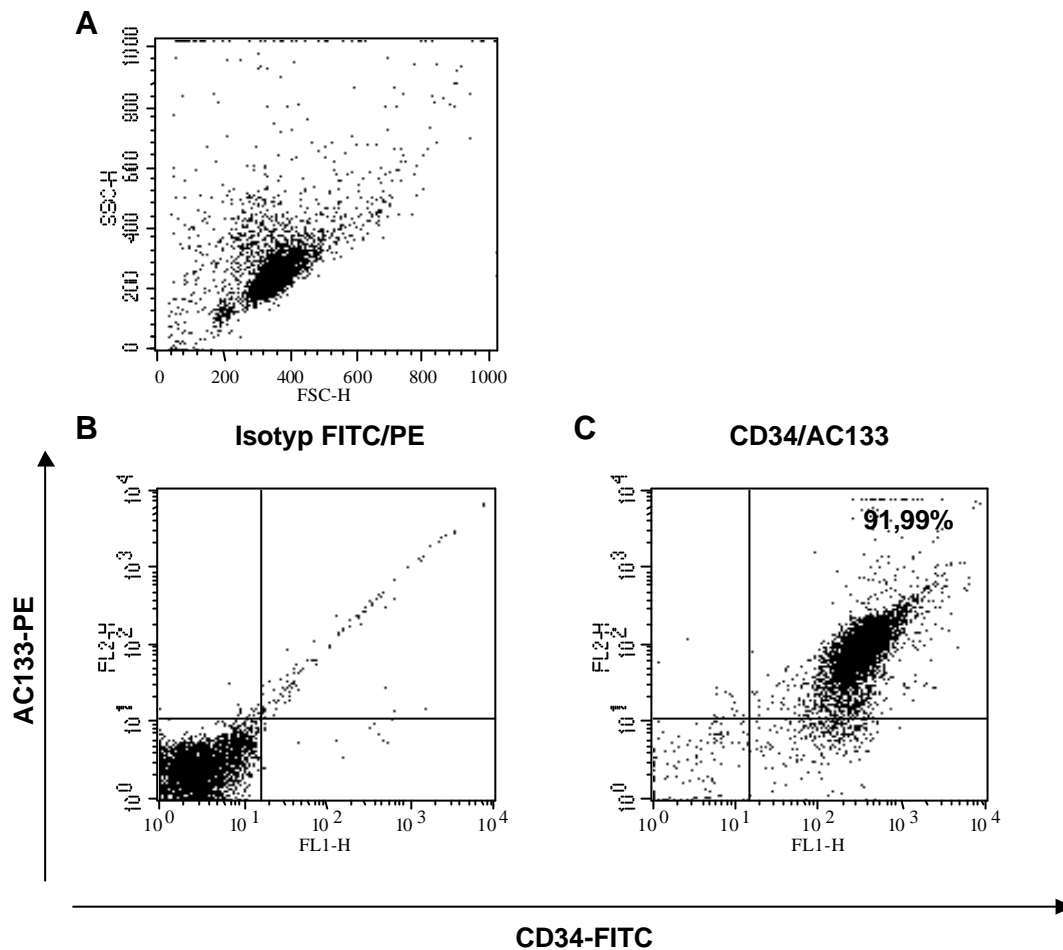
In 3.9. wurde gezeigt, dass die aufgereinigten Stammzellen in der Lage sind zu proliferieren, und dass sie nach längerer Expansionskultur ihren Phänotyp verändern, was als Hinweis auf das vorhandene Differenzierungspotential der Zellen interpretiert wurde. Anhand weiterer Vorversuche, sollte gezeigt werden, ob das notwendige Differenzierungspotential tatsächlich vorhanden war.

#### 3.10.1 Die aufgereinigten Stammzellen sind CD34/AC133-doppelpositiv

Pluripotente Stammzellen, d.h. CD34-positive Stammzellen mit vollständigem Differenzierungspotential exprimieren neben CD34 einen weiteren Oberflächenrezeptor: AC133. Um das vollständige Differenzierungspotential der isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen mit anti-AC133-Antikörpern markiert und durchflußzytometrisch analysiert. In Abb. 3.15 sind die Histogramme der FACS-Analyse der CD34/AC133-markierten Zellen dargestellt. Die Untersuchung von drei Aufarbeitungen ergab, dass 92-94,2% der Zellen AC133-positiv waren (Tab.3.12) und demnach über vollständiges Differenzierungspotential verfügen sollten.

**Tab. 3.12 Anzahl der CD34/AC133-doppelpositiven Zellen**

Präparation	CD34	AC133
1	97,1%	94,2%
2	94,52%	92%
3	96,1%	93,5%




---

**Abb. 3.15: Expression von AC133 auf den aufgereinigten CD34-positiven Stammzellen**

Abb.3.15 zeigt die FACS-Analyse der haematopoetischen Stammzellen die mit Antikörpern gegen CD34 und gegen AC133 markiert wurden: A zeigt die Gesamtpopulation der Zellen; C zeigt die CD34/AC133-positiven Zellen mit Prozentangabe; in B ist die Isotypkontrolle dargestellt.

---

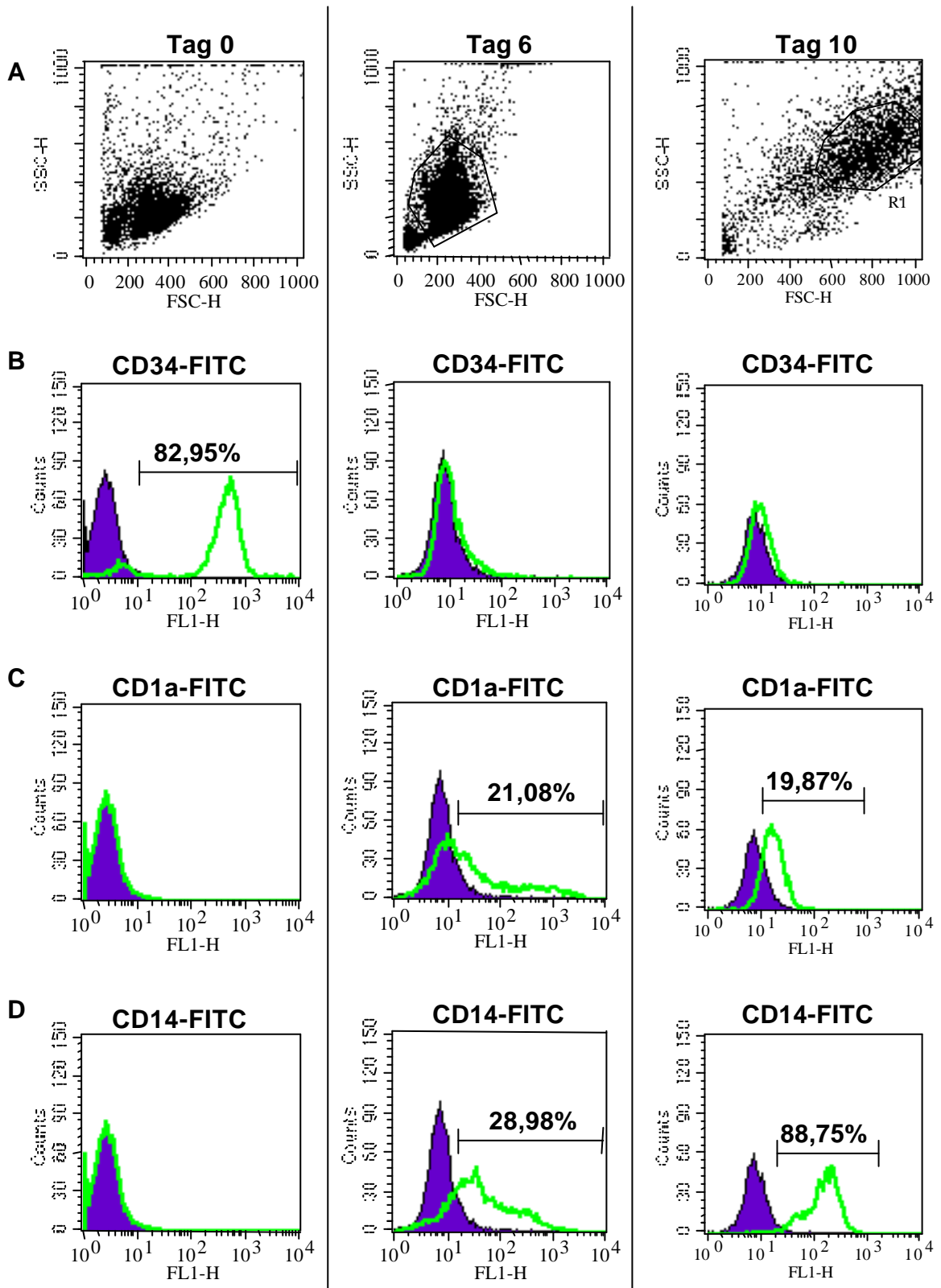
### 3.10.2 Die CD34-positiven Zellen lassen sich *in vitro* zu Makrophagen ausdifferenzieren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die aufgereinigten Stammzellen AC133-positiv sind, sollte durch einen ersten gezielten Differenzierungsversuch das Differenzierungspotential der Zellen näher untersucht werden. Dazu wurde ein von Caux *et al.* (1996) publiziertes System zur Makrophagendifferenzierung gewählt, bei dem die *in vitro* Differenzierung durch Zugabe von bestimmten Zytokinen stimuliert wird. Die Überprüfung der Differenzierung erfolgte durch Markierung mit Antikörpern gegen CD1a und CD14. Die CD34-positiven Zellen

wurden zunächst in RPMI (10mMHepes), das mit GM-CSF, SCF und TNFa angereichert wurde, in Expansionskultur genommen. Wie erwartet, konnte nach sechs Tagen eine etwa 20-fache Expansion gemessen werden. FACS-Analysen zeigten, dass die Zellen CD34-negativ waren, während sich in allen Ansätzen die Oberflächenmarker CD14 (28,3-29,7%) und zu einem geringeren Anteil CD1a (19,34-21,08%) detektieren ließen. Die Zellen wurden gewaschen und mit M-CSF-supplementiertem Medium für weitere sechs Tage kultiviert. Durchflußzytometrische Untersuchungen ergaben, dass 87,2-88,8% der Zellen den Makrophagenmarker CD14 exprimierten, während CD1a nur auf 19-19,9% der Zellen detektiert wurde. Der Oberflächenmarker CD34 konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Auch in der lichtmikroskopischen Untersuchung der Zellen konnte ein makrophagenähnlicher Phänotyp festgestellt werden. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass wie von Caux *et al.* publiziert, eine Differenzierung zu Makrophagen stattgefunden hatte und die aufgereinigten CD34-positiven Stammzellen über Differenzierungspotential verfügten. Die Daten aus drei Ansätzen zur *in vitro* Makrophagen-Differenzierung sind in Tabelle 3.13 dargestellt. Abb. 3.16 zeigt die Histogramme der FACS-Analyse aus einem Differenzierungsansatz.

**Tab. 3.13 Veränderung der haematopoetischen Stammzellen während der *in vitro* Makrophagen-Differenzierung**

Tag 0				Tag 6 RPMI(10mM Hepes),GM-CSF, SCF, TNFa			Tag 12 RPMI (10mM Hepes), M-CSF		
CD34	CD1a	CD14	Expansion	CD34	CD1a	CD14	CD34	CD1a	CD14
83%	-	-	19x	-	21,1%	29%	-	19,9%	88,8%
85,8%	-	-	17x	-	19,3%	30%	-	18,9%	87,9%
89,4%	-	-	22,5x	-	20,2%	28,3%	-	19%	88,2%



**Abb. 3.16: CD34-positive Zellen lassen sich *in vitro* zu Makrophagen differenzieren**

CD34-positive Zellen wurden nach einem Protokoll von Caux et al. (1996) zu makrophagenähnlichen Zellen differenziert. Die Abbildung zeigt die Histogramme der Zellen vor der Behandlung (Tag 0), nach Expansionkultur mit SCF,  $TNF\alpha$  und GM-CSF (Tag 6) und nach Weiterkultur mit M-CSF (Tag 12). Reihe A zeigt die Gesamtpopulation der Zellen; in Reihe B sind die CD34-positiven, in Reihe C die 1a-positiven und in Reihe D die CD14-positiven Zellen dargestellt.

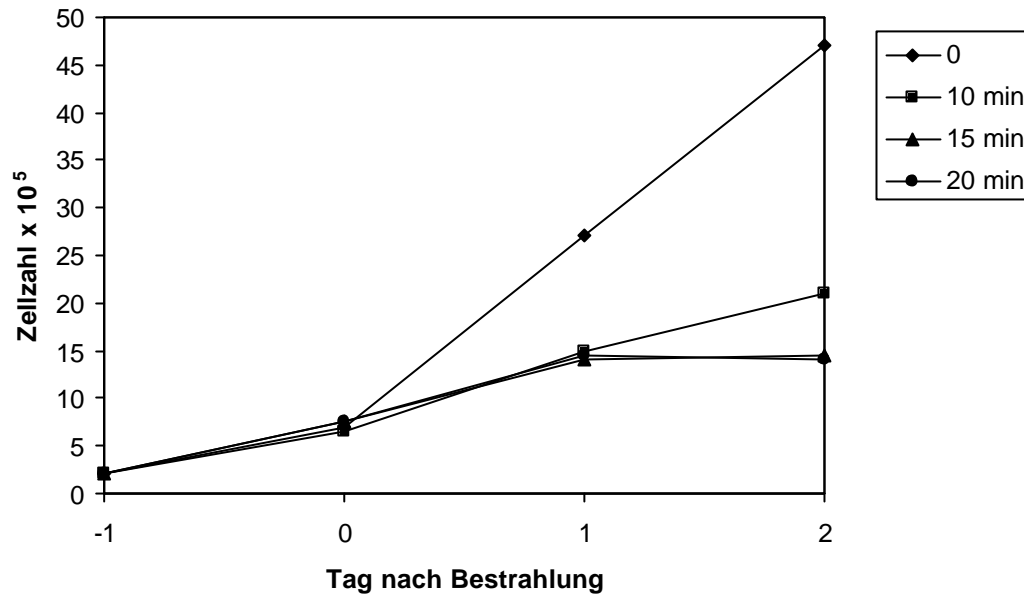
### 3.11 Erster Versuch der T-Zelldifferenzierung: Kokultur mit L88-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, daß die CD34-positiven Zellen, die als Ausgangsmaterial für die *in vitro* Differenzierung aufgereinigt wurden, über Proliferationsfähigkeit und Differenzierungspotential verfügten, konnte mit der Etablierung des Zellkultursystems begonnen werden. Für den ersten Versuch der *in-vitro* T-Zelldifferenzierung wurde ein Kokultursystem mit L88 Zellen, einer SV40-transformierten humanen Knochenmarkszelllinie, gewählt. Diese Zelllinie eignet sich gut als Feeder-Zelllinie für haemapoetische Stammzellen und könnte außerdem, aufgrund des exprimierten Zytokinprofils für ihre *in-vitro*-Differenzierung geeignet sein (Thalmeier *et al.* 1994).

#### 3.11.1 Bestrahlung der L88-Zellen

Um als Feeder-Zellen dienen zu können, müssen Zelllinien radioaktiv bestrahlt werden, um so ihre Proliferation zu verhindern. Bevor mit den Kokulturversuchen begonnen werden konnte, musste die geeignete Strahlendosis ermittelt werden. Dazu wurden L88-Zellen ausgesät, und am nächsten Tag in einer Cäsium<sub>137</sub>-Quelle 10, 15 oder 20 Minuten (entspricht ca. 13, 19 bzw. 26 Gy) der  $\gamma$ -Strahlung ausgesetzt. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung in Kultur genommen. Bereits nach drei Tagen Kultur waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Während die Zellen, die nur 10 Minuten der Strahlung ausgesetzt waren, weiter proliferieren konnten, hatten die Zellen, die länger (15 bzw. 20 Min) bestrahlt wurden ihre Proliferationsfähigkeit verloren. Die Proliferation der L88-Zellen nach der Bestrahlung ist in Abb 3.17 dargestellt. Bei lichtmikroskopischer Beurteilung der Zellen wurde festgestellt, dass die Zellen, die am längsten bestrahlt wurden (20min) stark granuliert waren und außerdem viele tote Zellen im Medium schwammen. Die Bestrahlungszeit von 15min (19Gy) erwies sich als ideal: Die Zellen proliferierten nicht mehr und zeigten im Lichtmikroskop einen normalen Phänotyp.



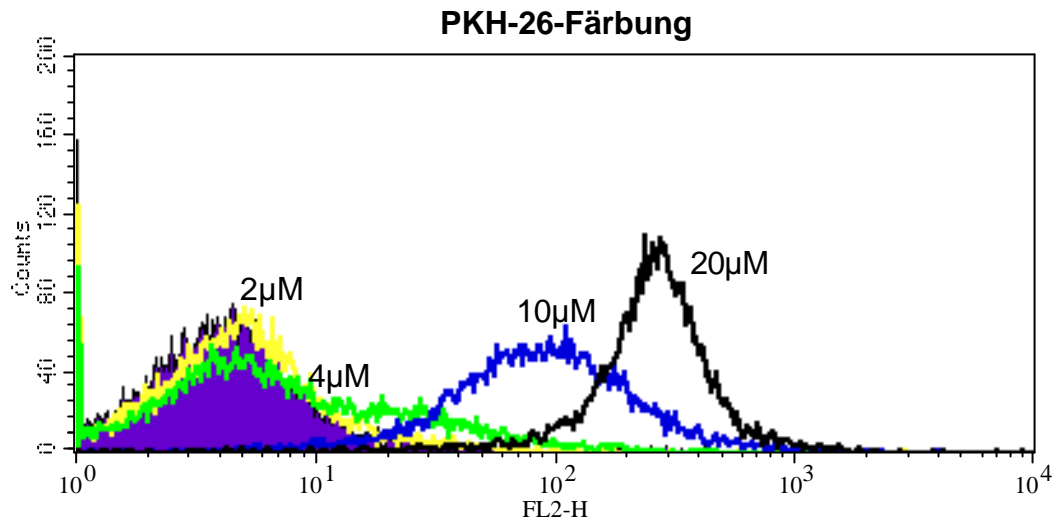


**Abb.3.17: Bestrahlung der L88-Zellen**

L88 Zellen wurden ausgesät und unterschiedlich lange mit  $\gamma$ -Strahlung bestrahlt. Dargestellt ist die Zellzahl vor und nach der Bestrahlung von 10min (13Gy), 15min (19Gy), 20min(26Gy) und einer unbestrahlten Kontrolle.

### 3.11.2 Markierung der CD34-positiven Zellen mit PKH-26

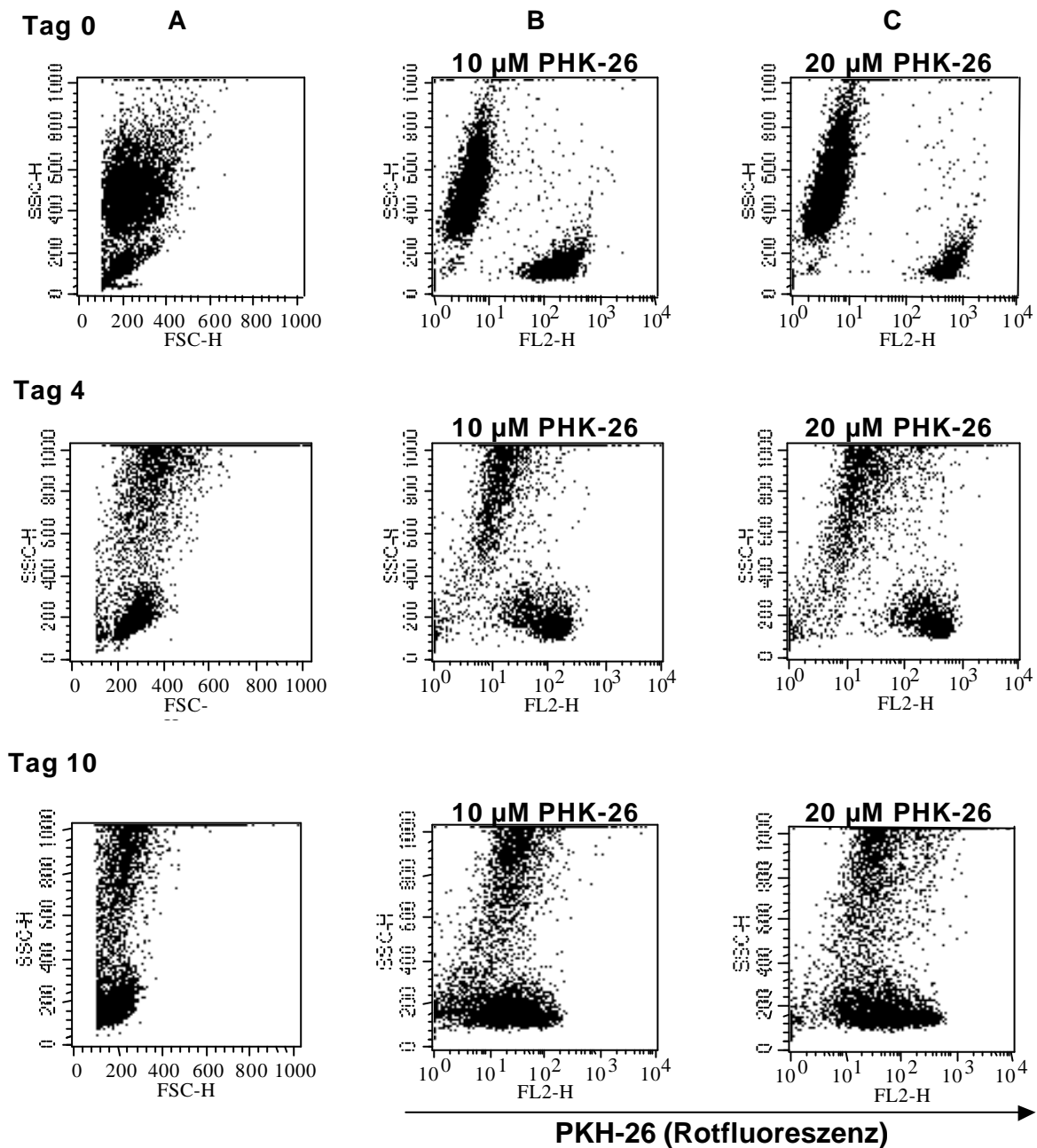
In der Kokultur einer humanen Zelllinie mit humanen Primärzellen entsteht das Problem der Unterscheidung der Zellen, da Antikörper die gegen humane Antigene gerichtet sind auf beiden Zelltypen binden könnten. Um die humanen Stammzellen bzw. daraus differenzierte Zellen von der L88-Zelllinie unterscheiden zu können, wurden die CD34-positiven Zellen vor der Kokultur mit PKH-26 einem rot-fluoreszierenden Membranfarbstoff markiert. Zunächst musste die geeignete Farbstoffkonzentration bestimmt werden. Dazu wurden die aufgereinigten Stammzellen für fünf Minuten mit 2 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, 10 $\mu$ M und 20 $\mu$ M PKH-26 inkubiert, gewaschen und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Wie in Abb. 3.18 dargestellt ist, waren die Konzentrationen 2 $\mu$ M und 4 $\mu$ M zu niedrig, da der Membranfarbstoff kaum bis gar nicht nachgewiesen werden konnte. Die mit 10 $\mu$ M und 20 $\mu$ M PKH-26 gefärbten Zellen zeigten hingegen eine deutliche Rotfluoreszenz.



**Abb. 3.18: PKH-26-Markierung der humanen Stammzellen**

CD34-positive Zellen wurden mit 2µM, 4µM, 10µM und 20µM PKH-26 markiert, über Nacht kultiviert und am nächsten Tag durchflußzytometrisch analysiert. Die Abbildung zeigt die Rotfluoreszenz der Zellen im Vergleich zu ungefärbten Kontrollzellen.

Nach diesem Vorversuch sollte außerdem untersucht werden, welche PKH-26-Konzentration in der Kokultur am besten geeignet ist, da nach längerer Kultur und vor allem durch Proliferation der Zellen mit einem Ausdünnen des rotfluoreszierenden Membranfarbstoffes zu rechnen ist. Dazu wurden PKH-26-gefärbte Stammzellen auf bestrahlte L88-Zellen gegeben und kultiviert. Nach null, vier und zehn Tagen Kokultur wurden Zellen geerntet und im Durchflußzytometer untersucht. Wie in Abb. 3.19 zu sehen ist, konnte zu allen Zeitpunkten eine deutliche Rotfluoreszenz der PKH-26-gefärbten Zellen gemessen werden. Im Histogramm waren die rotfluoreszierenden Zellen als distinkte Population zu erkennen, wodurch sie sich gut von den ungefärbten L88-Zellen unterscheiden ließen. Während des gesamten Untersuchungszeitraums war zu beobachten, daß die Rotfluoreszenz der mit 20µM PKH-26 gefärbten Zellen um etwa eine log-Stufe stärker war, so dass diese Farbstoffkonzentration als ideal beurteilt und für die weiteren Versuche eingesetzt wurde.

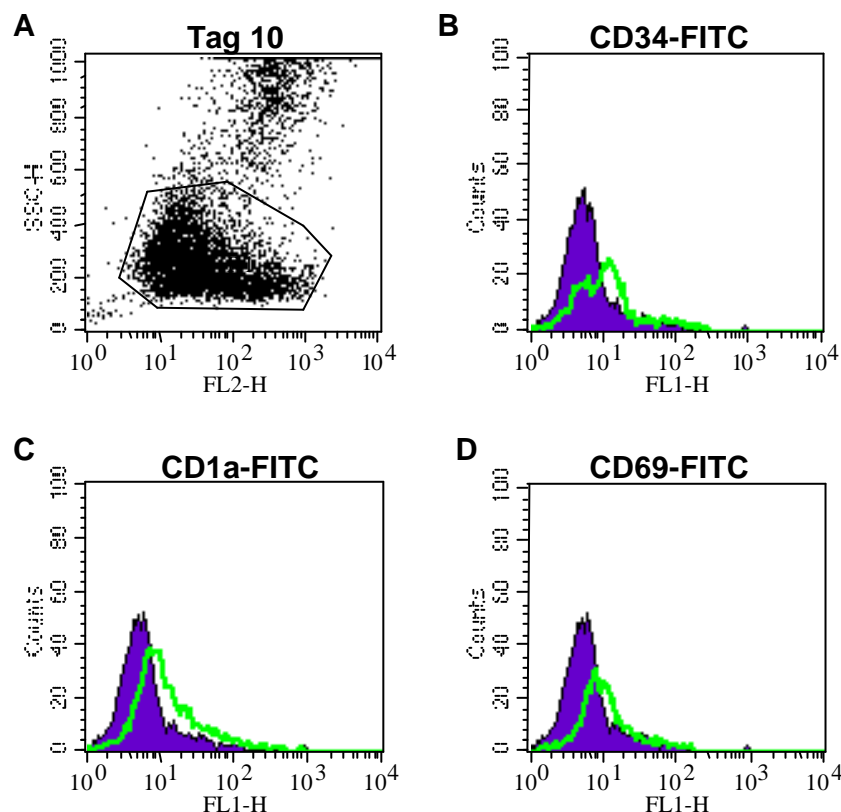


**Abb. 3.19: Unterscheidung der humanen Stammzellen von der L88-Zelllinie zur PKH-26-Färbung**

PKH-26-gefärbte Stammzellen (10 und 20 $\mu$ M PKH-26) wurden mit bestrahlten L88 kokultiviert. Die Kokultur wurde an Tag null, vier und zehn geerntet und die Rotfluoreszenz der markierten Zellen im Durchflußzytometer untersucht. Reihe A zeigt die Gesamtpopulation der Zellen. In Reihe B und C ist die Rotfluoreszenz (Aufgetragen gegen die Granularität) der mit 10 bzw. 20 $\mu$ M PKH-26 markierten CD34-Zellen in Kokultur mit L88-Zellen dargestellt.

### 3.11.3 CD34-positive Stammzellen differenzieren in Kokultur mit L88-Zellen nicht zu reifen T-Zellen

Nachdem die Bedingungen für die Kokultur etabliert waren, sollte untersucht werden, ob sich die haemopoetische Stammzellen in diesem System zu reifen T-Zellen differenzieren lassen. Während der T-Zelldifferenzierung exprimieren die Zellen verschiedene Oberflächenmarker, die für einzelne Differenzierungsstadien charakteristisch sind. Zum Nachweis einer möglichen Differenzierung sollten zu verschiedenen Zeitpunkten der Kokultur durchflußzytometrische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CD34, CD1a und CD69 durchgeführt werden. Zu keinem Zeitpunkt der Kokultur von L88 und humanen Stammzellen konnten CD1a oder CD69 als Hinweis für fortschreitende Differenzierung detektiert werden. Die einzige Veränderung, die während der Kokultur beobachtet wurde, war ein Verlust von CD34-positiven Zellen. In Abb.3.20 ist beispielhaft die FACS-Untersuchung einer Kokultur am zehnten Tag dargestellt.

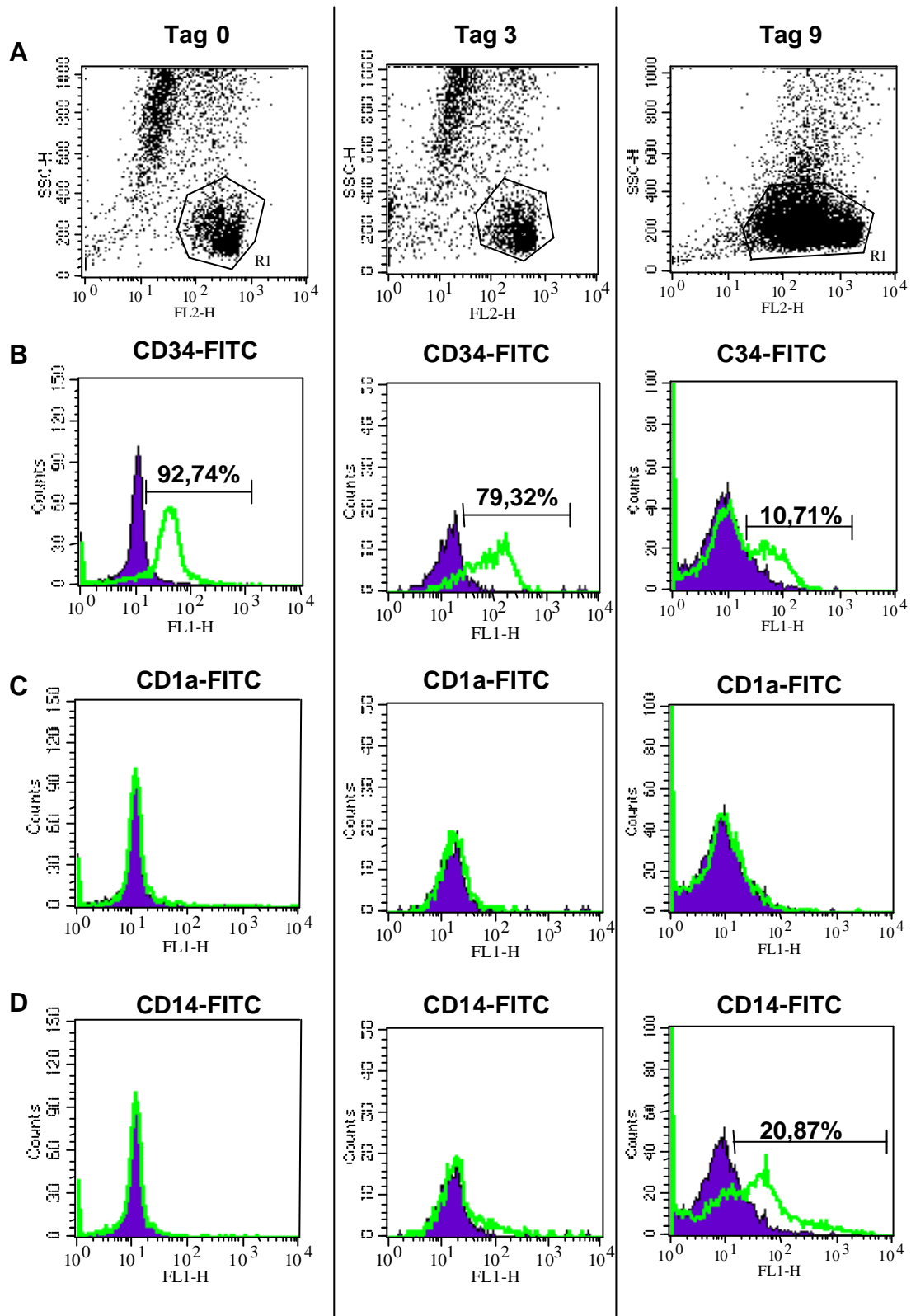


**Abb.3.20: Kokultur von Stammzellen mit L88-Zellen führt nicht zur T-Zell-Differenzierung**

Um Mögliche T-Zell-Differenzierungsstadien in der Kokultur zu detektieren, wurden die Zellen mit Antikörpern gegen charakteristische Oberflächenmarker (CD1a, CD69) markiert. Abb. 3.20 zeigt die Histogramme einer FACS-Analyse an Tag 10: Bild A zeigt die Gesamtpopulation der Zellen, in Bild B sind die CD34-positiven, in Bild C die CD1a-positiven und in Bild D die CD69-positiven Zellen dargestellt.

### **3.11.4 Kokultur von humanen Stammzellen mit L88-Zellen führt zur Entwicklung von CD14-positiven Zellen.**

In 3.11.3 wurde gezeigt, dass die Kokultur von CD34-positiven Zellen mit L88-Zellen nicht zur T-Zelldifferenzierung führt. Andererseits wurde beobachtet, dass die PKH-26-markierten Zellen zwar noch vorhanden waren, jedoch CD34 als Oberflächenmarker verloren hatten. Dies kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass zwar Differenzierung stattfindet, jedoch in eine andere Richtung. Um zu untersuchen, ob dies der Fall war, wurden erneut Kokulturen angesetzt und die daraus geernteten Zellen mit Antikörpern gegen CD14 markiert. Wie in Abb. 3.21 dargestellt ist, konnte nach drei Tagen Kultur bereits ein Verlust an CD34-positiven Zellen beobachtet werden (79,3% gegenüber 92,7% an Tag null). Nach weiteren sechs Tagen Kokultur hatte die Zahl an CD34-positiven Zellen weiter abgenommen (10,7%). Gleichzeitig wurde festgestellt, daß sich eine Population von CD14-positiven Zellen (20,9%) gebildet hatte. Die Färbung mit Antikörpern gegen CD1a war wie in vorherigen Experimenten negativ. Der fast vollständige Verlust an CD34-positiven Zellen, der schon in vorhergehenden Kokultorexperimenten beobachtet wurde, ging also mit der Entwicklung von CD14-positiven Zellen einher. CD14 ist ein charakteristischer Oberflächenmarker für Makrophagen. Aus diesem Befund konnte also geschlossen werden, daß in der Kokultur von CD34-positiven haematopoetischen Stammzellen mit der L88-Zelllinie eine Differenzierung zu makrophagenähnlichen Zellen stattgefunden hatte.



**Abb. 3.21: Entstehung CD14-positiver Zellen in der Kokultur**

Abb. 3.21 zeigt die Histogramme einer Kokultur an Tag 0, 3 und 9. Die rotfluoreszierende Zellpopulation (Reihe A) wurde mit entsprechenden FITC-Antikörpern auf das Vorhandensein von CD34 (Reihe B), CD1a (Reihe C) und CD14-positiven Zellen (Reihe D) untersucht.

### 3.12 Versuch der *in vitro* T-Zell-Differenzierung durch FTOC

Nachdem gezeigt wurde, dass im Kokultursystem mit der L88-Zelllinie keine T-Zelldifferenzierung aus haematopoetischen Stammzellen stattfindet, sollte mit der Etablierung eines weiteren Systems begonnen werden. Kultiviert man fötalen murinen Thymus unter für die Organkultur geeigneten Kulturbedingungen (engl.: fetal thymus organ culture = FTOC) kann man eine Differenzierung der murinen Thymozyten beobachten (Mandel *et al.*, 1978). In der Arbeitsgruppe von Merckenschlager und Fisher war es gelungen humane Stammzellen in murinen Thymus einzubringen und so die CD34-positiven Zellen *in vitro* zu reifen T-Zellen zu differenzieren (Fisher *et al.*, 1990; Merckenschlager und Fisher, 1992). In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, ein derartiges System in unserem Labor zu etablieren.

#### 3.12.1 Präparation von fötalem murinem Thymus und Etablierung der Bedingungen für die Organkultur

Für die Etablierung der FTOC wurde fötaler muriner Thymus aus trächtigen Mäusen präpariert. Dabei zeigte sich, dass 15 Tage alte Embryonen am besten geeignet waren. Bei jüngeren Embryonen waren die Organe so klein, dass sie nur schwer präpariert werden konnten. Ältere Embryonen sind ebenfalls ungeeignet, da bei diesen schon viele murine Thymozyten in den Thymus eingewandert sind, die bei der chimären Organkultur stören.

Die präparierten Organe wurden auf Filtern kultiviert. Die ersten Versuche der Organkultur wurden mit RPMI, das mit 10% humanem AB-Serum supplementiert war und Millipore-Filtern in Transwell-Platten durchgeführt. Diese von Clark *et al.* (1998) publizierten Kulturbedingungen erwiesen sich als ungeeignet, da alle präparierten Organe abstarben. Um geeignetere Kulturbedingungen zu finden, wurden verschiedene Medien und Filter getestet. Tab. 3.14 zeigt die Entwicklung der Thymi unter verschiedenen Kulturbedingungen. Das von Merckenschlager und Fischer (1992a, 1992b, 1993) publizierte Medium (Zugabe von 0,005% Mercaptoethanol) führte ebenfalls bereits nach vier Tagen zum Absterben der kultivierten murinen Thymi. Erst die Erhöhung des Gehalts an humanem Serum (20% humanes AB-Serum

gegenüber den von Clark *et al.* publizierten 10%) wirkte sich positiv auf die Organkultur aus: nach vier Tagen war eine Vermehrung der Thymozytenpopulation von  $1,5 \times 10^4$  auf  $2,6 \times 10^5$  Zellen zu beobachten. Ein weiterer positiver Effekt konnte durch die Verwendung eines alternativen Filtersystems erzielt werden. Statt der bisher verwendeten Millipore-Filter in Transwell-Platten wurden Nucleopore-Filter der Firma Whatman eingesetzt, die nach dem Autoklavieren auf der Oberfläche des Mediums schwimmen. Mit diesem Filtersystem konnte nach vier Tagen Kultur eine Erhöhung der Thymozytenzahl von  $1,5 \times 10^4$  auf  $4 \times 10^5$  Zellen beobachtet werden (gegenüber  $2,6 \times 10^5$ ). Das System mit 20% humanem AB-Serum supplementiertem RPMI und den Nucleopore-Filtern erwies sich demnach als das am besten für die Organkultur geeignete und wurde für die weiteren Versuche eingesetzt.

**Tab. 3.14 Etablierung der Kulturbedingungen für die Organkultur**

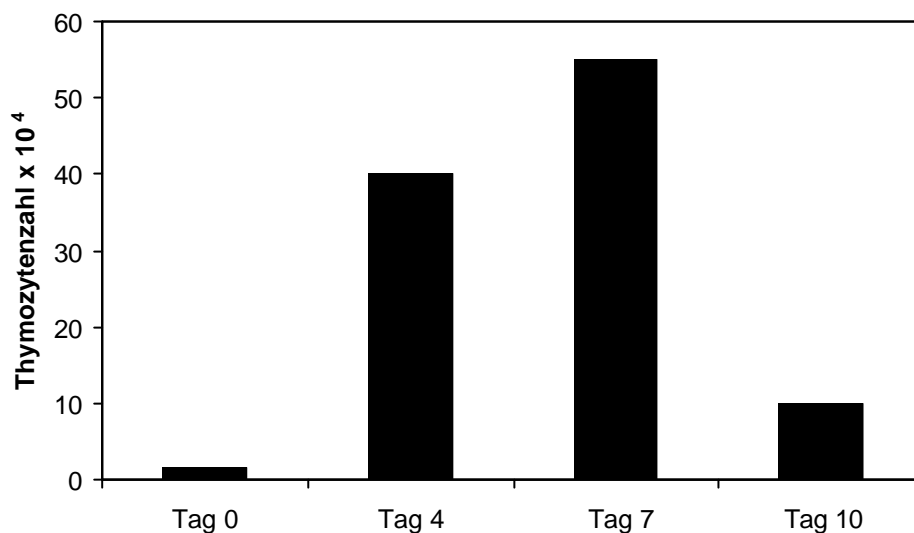
	<b>Zellzahl nach Kultur unter verschiedenen Bedingungen</b>			
	<b>RPMI + 10% FCS + 0,005% mercaptoETOH</b>		<b>RPMI +10% FCS + 20% hu AB-Serum</b>	
	<b>Millipore- Filter</b>	<b>Nucleopore- Filter</b>	<b>Millipore- Filter</b>	<b>Nucleopore- Filter</b>
<b>Tag 0</b>	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
<b>Tag 4</b>	†	†	$2,6 \times 10^5$	$4 \times 10^5$

### 3.12.2 Die Kulturbedingungen sind für die Differenzierung muriner Thymozyten geeignet

Nachdem Bedingungen etabliert waren, unter denen sich die murinen Organe in Kultur halten ließen, musste überprüft werden, ob diese Bedingungen auch zu Differenzierung der murinen Thymozyten geeignet waren. Dazu wurde Thymus präpariert und für zehn Tage in Kultur gehalten. Nach null, vier, sieben und zehn Tagen wurden jeweils zehn Thymi abgeerntet, in Suspension gebracht und die thymozytenähnlichen Zellen gezählt. Wie in Abb. 3.22 dargestellt ist, konnte bis



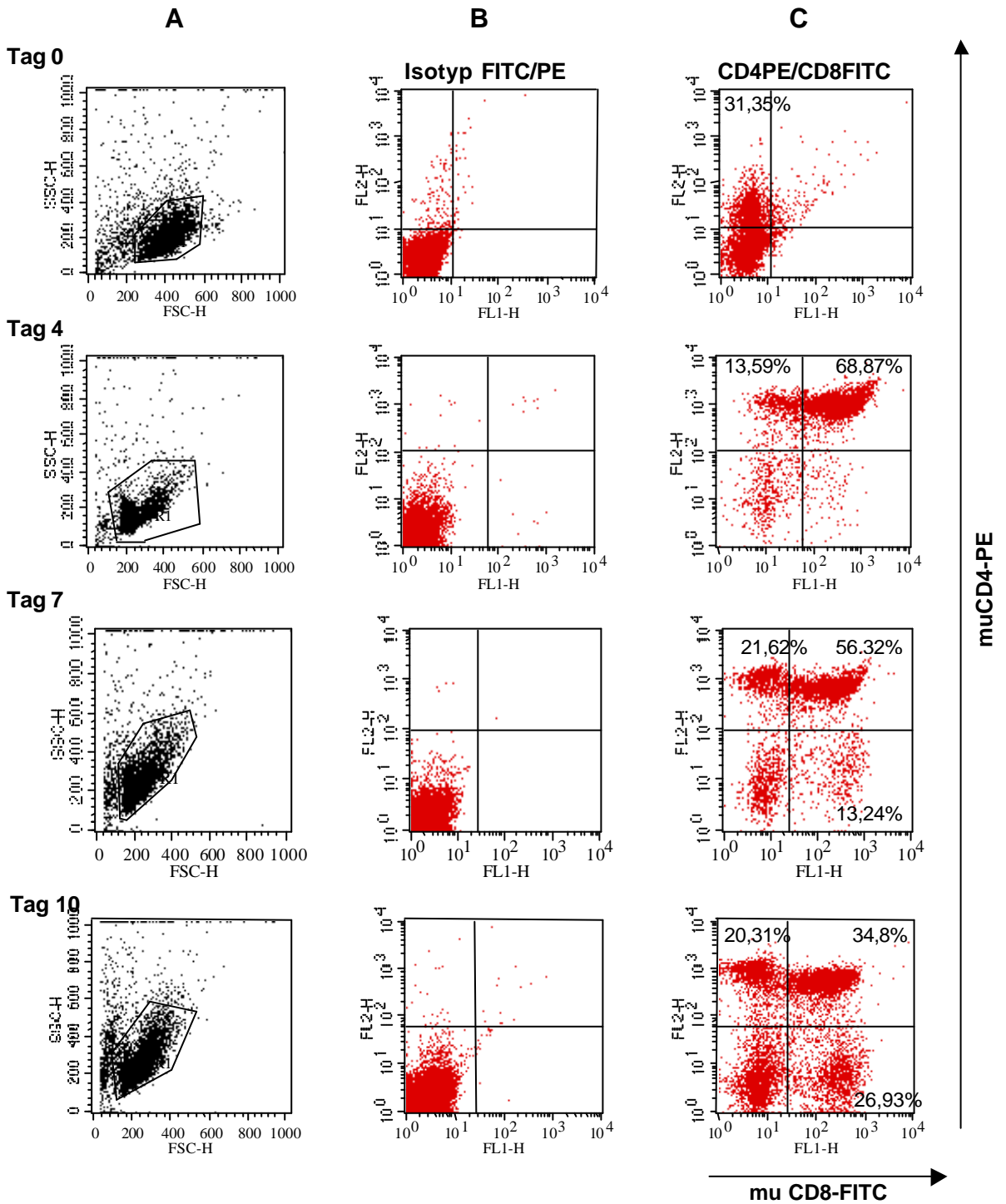
zum siebten Tag der Organkultur eine deutliche Proliferation beobachtet werden. An Tag zehn war jedoch ein starker Einbruch in der Zellzahl zu sehen. Gleichzeitig konnte bei lichtmikroskopischer Beurteilung der Thymi ein Hof aus thymozytenähnlichen Zellen um die Organe beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die Abnahme der Zellzahl auf das Auswandern reifer Thymozyten zurückzuführen ist.



**Abb. 3.22: Proliferation der murinen Thymozyten in der Organkultur**

Die Graphik zeigt die Zellzahl der Thymozytenpopulation am Tag der Organentnahme und vier, sieben und zehn Tage nach Organkultur.

Für die durchflußzytometrische Untersuchung der Thymozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gegen murinen CD4 und CD8 markiert. In Abb. 3.23 ist die Veränderung der murinen Thymozyten dargestellt. An Tag Null wurden hauptsächlich doppelnegative Zellen detektiert, aber auch eine Population von CD4-positiven Zellen (31,4%). Nach vier Tagen Organkultur war bereits eine deutliche Veränderung der Thymozytenpopulation zu erkennen. Der größte Teil der Zellen war jetzt CD4/CD8-doppelpositiv (68,9%) während nur noch 13,6% einfachpositive CD4-Zellen gemessen wurden. Nach weiteren drei Tagen konnte zusätzlich eine kleine CD8-einfachpositive Population (13,2%) detektiert werden. Am zehnten Tag der Organkultur war eine klare Auftrennung in eine



**Abb. 3.23: Differenzierung muriner Thymozyten in der Organkultur**

Abb. 3.23 Zeigt die Veränderung der Thymozyten im Verlauf von zehn Tagen Organkultur. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen murinen CD4 und CD8 markiert und im FACScan analysiert. Spalte A zeigt die Gesamtpopulation der Zellen, Spalte B die Isotypkontrolle und in Spalte D sind die CD4-/CD8-positiven Zellen dargestellt (mit Prozentangaben).

CD4- und eine CD8-Population zu erkennen, während nur noch 34,8% der Zellen CD4/CD8-doppelpositiv waren. Diese Veränderung in der Thymozytenpopulation zeigt, dass in der Organkultur eine *in vitro* Differenzierung muriner Thymozyten stattgefunden hat. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die etablierten Kulturbedingungen für Differenzierungsversuche geeignet sind.

### **3.12.3 Depletion der murinen Thymozyten durch 2-desoxy-Guanosin**

Im chimären FTOC-System würden proliferierende und sich differenzierende murine Thymozyten das Einwandern und die Differenzierung der humanen haematopoetischen Stammzellen stören. Aus diesem Grund wurde 2-desoxy-Guanosin (1,35mM) zum Medium gegeben, das die murinen Thymozyten aus den Thymi depletieren soll. Nach fünf Tagen Kultur mit 2-desoxy-Guanosin-Behandlung wurden die Organe von den Filtern genommen, gewaschen, in Suspension gebracht und die verbliebenen Thymozyten gezählt. Während unbehandelte Kontrollorgane  $4 - 5 \times 10^5$  thymozytenähnliche Zellen enthielten, wurden in den 2-desoxy-Guanosin-behandelten Thymi nur  $0,5 \times 10^3$  Thymozyten gezählt. Die Zahl der verbliebenen Restzellen war so gering, dass die Depletion als erfolgreich angesehen wurde.

### **3.12.4 Einwandern humaner CD34-positiver Zellen in den murinen Thymus**

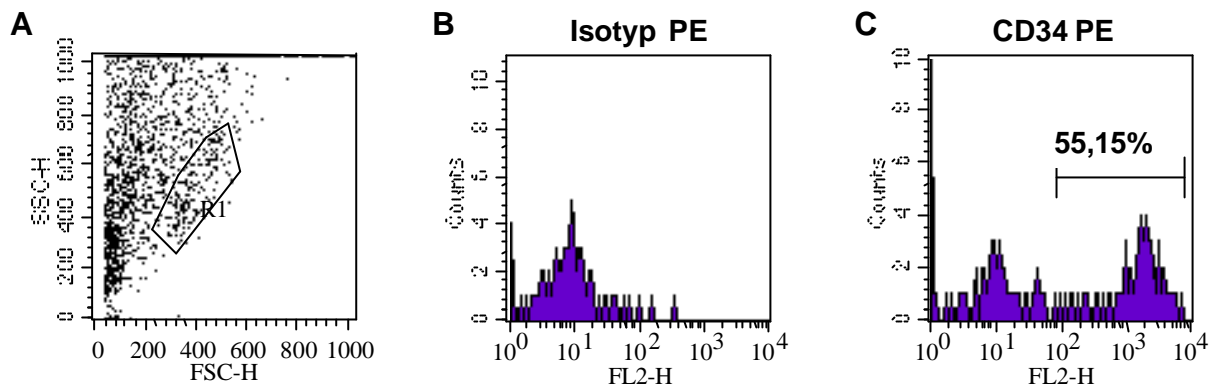
Der nächste Schritt war es, die humanen haematopoetischen Stammzellen in den murinen Thymus einwandern zu lassen. Dazu wurden frisch isolierte oder aufgetaute CD34-positive Stammzellen in RPMI ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml) resuspendiert und jeweils 20µl der Zellsuspension in die Näpfe von Terazaki-Platten gegeben. In jeden dieser Näpfe wurde ein von murinen Thymozyten depletierter Thymus gelegt. Um das Einwandern der humanen Zellen in die Thymi zu ermöglichen, wurden die Platten umgekehrt, so dass sich hängende Tropfen („hanging drops“) bildeten, in den Brutschrank gestellt und inkubiert. Um die ideale Inkubationszeit zu ermitteln, wurden die Thymi nach 24 bzw.

nach 48 Stunden in Suspension gebracht und die Zellen wurden gezählt. In den Organen, die 24 Stunden zusammen mit den CD34-positiven Zellen kultiviert wurden, konnten  $5-6 \times 10^3$  Thymozyten gezählt werden. Nach 48 Stunden Kultur in „hanging drops“ waren  $7,5 - 8 \times 10^3$  eingewandert. Die Zellzahl aus allen Ansätzen war zwar sehr gering, aber gegenüber den unbehandelten Organen, die nur  $0,45 - 0,5 \times 10^3$  Zellen aufwiesen deutlich erhöht.

**Tab. 3.16 Thymozytenzahl nach „hanging drops“**

Zellzahl nach Kultur in „hanging drops“		
0h	24h	48h
$0,5 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$
$0,45 \times 10^3$	$6 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3$

Um zu untersuchen, ob die gegenüber den unbehandelten Organen erhöhte Anzahl an Thymozyten tatsächlich auf das Einwandern der humanen CD34-positiven Zellen zurückzuführen ist, wurden die suspendierten Thymi mit Antikörpern gegen humanen CD34 inkubiert und im FACS gemessen. Wegen der geringen Zellzahl, war es schwierig, die Thymozyten als deutliche Population zu erkennen. Aus diesem Grund, wurden die Zellen, die in dem Bereich lagen, in dem in vorherigen Experimenten die murinen Thymozyten detektiert wurden (siehe 3.12.2), als Thymozytenpopulation definiert. Wie in Abb. 3.24 gezeigt ist, war mehr als die Hälfte der als Thymozytenpopulation definierten Zellen (55,2-59%) CD34-positiv. Es konnte also von einem Einwandern der CD34-positiven humanen Zellen in den murinen Thymus ausgegangen werden.




---

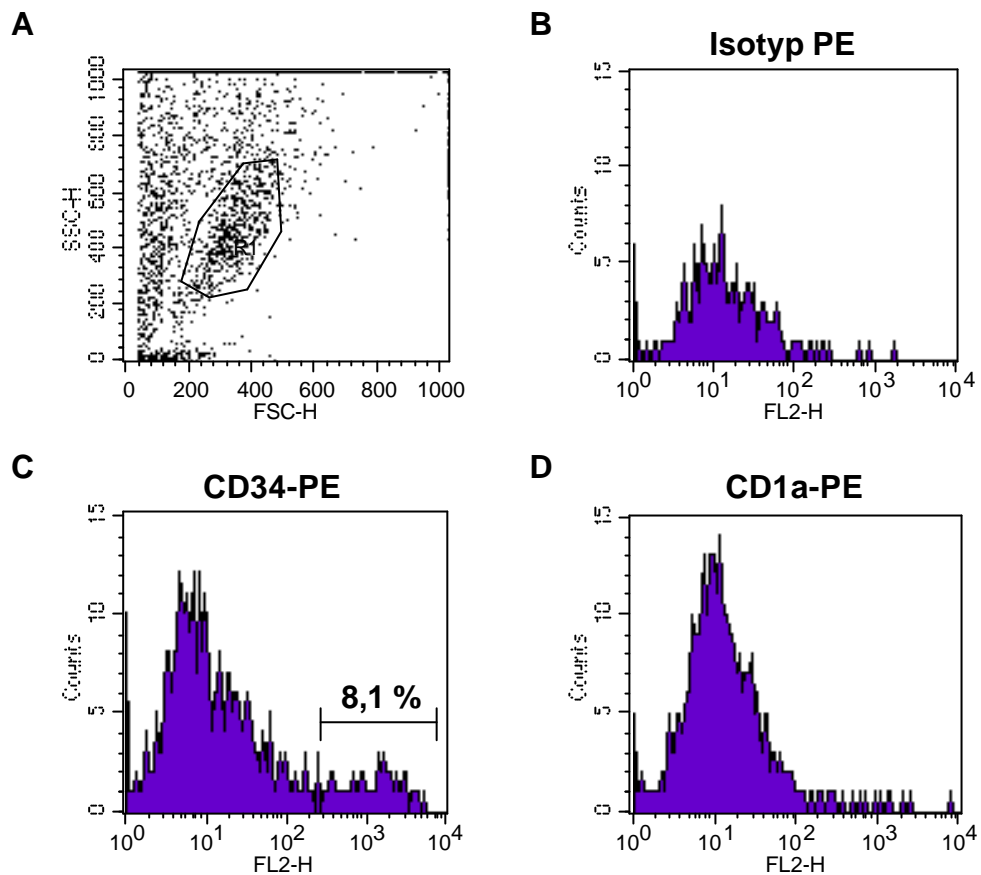
**Abb. 3.24: CD34-positive Zellen wandern in den murinen Thymus ein**

Um zu zeigen, ob humane Stammzellen in die murinen Thymi eingewandert waren, wurde die Zellsuspension mit einem PE-Antikörper gegen CD34 markiert und im FACS gemessen. Gezeigt ist die FACS-Analyse nach 48 Stunden „hanging drop“: Bild A zeigt die Gesamtpopulation der Zellen und die als Thymozytenpopulation definierten Zellen (R1); Bild B zeigt die Isotypkontrolle; In Bild C sind die CD34-positiven Zellen (mit Prozentangabe) dargestellt.

---

### 3.12.5 Die eingewanderten CD34-positiven Zellen differenzieren nicht zu T-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass humane CD34-positive Zellen in den murinen Thymus einwandern konnten, sollte untersucht werden, ob sich die eingewanderten Zellen in dieser Umgebung zu T-Zellen entwickeln. Dazu wurden die Thymi nach der „hanging drop“-Kultur wieder auf Filter umgesetzt und weiterkultiviert. Um ein frühes Differenzierungsstadium nachweisen zu können, wurden die Thymi zu verschiedenen Zeitpunkten (drei und fünf Tage) nach Einwandern der humanen Zellen geerntet, in Suspension gebracht und mit Antikörpern gegen CD34 und CD1a inkubiert. Zu keinem Zeitpunkt konnten CD1a-positive Zellen nachgewiesen werden. Es konnte also nicht von einer beginnenden T-Zell-Differenzierung ausgegangen werden. Trotzdem war ein Verlust an CD34-positiven Zellen zu beobachten: nach fünf Tagen Kultur wiesen nur noch 8,1% der Zellen in der Thymozytenpopulation CD34 an ihrer Oberfläche auf (gegenüber 55,2% an Tag null nach „hanging drop“). Abb. 3.25 zeigt die Histogramme einer FACS-Analyse an Tag 5 nach Einwandern der Zellen.



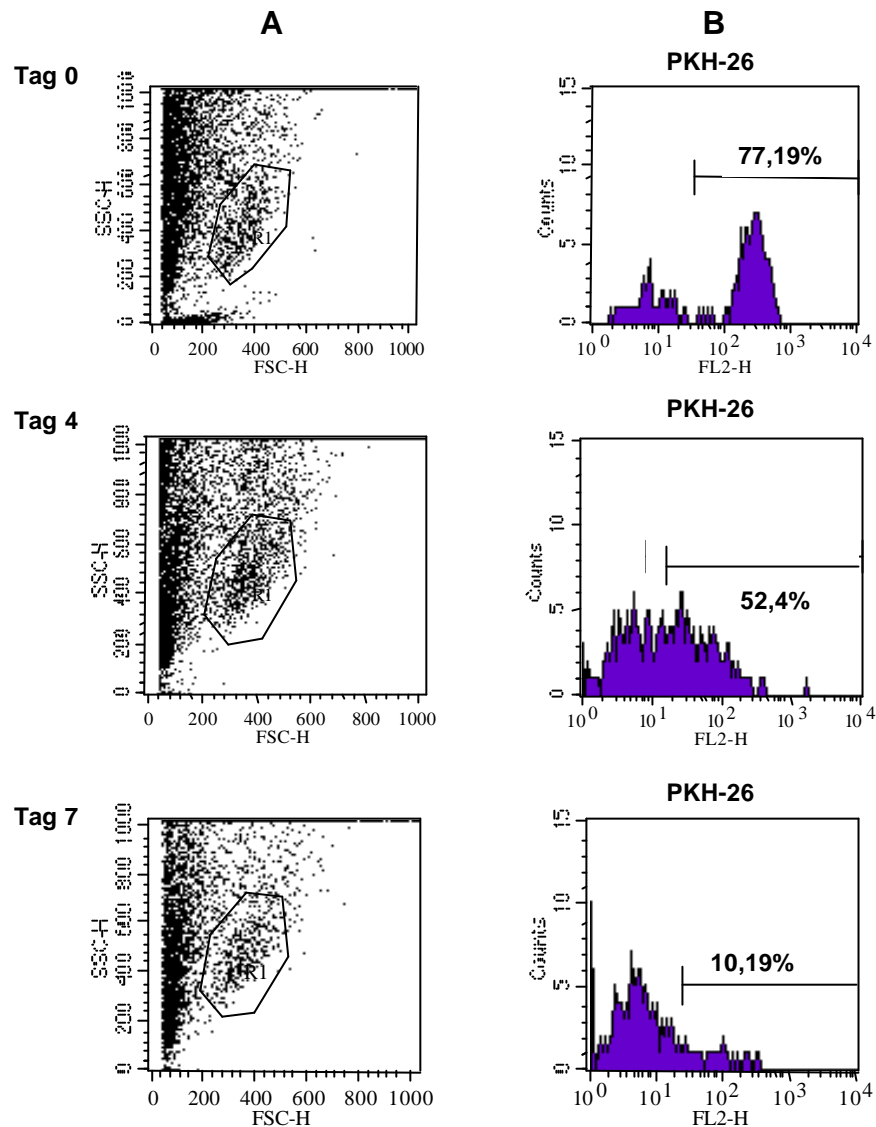
**Abb. 3.25: In den chimären FTOC kann kein CD1a nachgewiesen werden**

Die Abbildung zeigt beispielhaft, die FACS-Daten einer Organkultur fünf Tage nach Einwandern der humanen Zellen: Bild A zeigt die Gesamtpopulation der Zellen und die als Thymozyten definierte Population (R1); Bild B zeigt die Isotypkontrolle. In C und D sind die CD34- bzw. CD1a-positiven Zellen dargestellt. Die gemessenen 8,1% CD34-positiven Zellen stellen einen deutlichen Verlust gegenüber Tag 0 (Abb. 3.20; 55,15%) dar.

### 3.12.6 Verlust der eingewanderten humanen Zellen nach sieben Tagen

#### Kultur

Nachdem gezeigt werden konnte, dass humane CD34 zwar in den Thymus eingewandert waren, jedoch keine Differenzierung zu beobachten war, sollte untersucht werden, ob die humanen Zellen in den Mausthymi überlebten. Dazu wurden CD34-positive Zellen vor dem Einwandern in die Thymi mit dem Membranfarbstoff PKH-26 markiert. Die Rotfluoreszenz der Zellen sollte das Wiederfinden der humanen Zellen in der chimären Organkultur erleichtern und eine bessere Beobachtung ihrer Entwicklung ermöglichen. Wie in Abb. 3.26 zu



**Abb. 3.26: Verlust humaner Thymozyten in der chimären Organkultur**

CD34-positive Zellen wurden vor dem Einwandern in die murinen Thymi mit PKH-26 markiert. Die Abbildung zeigt die FACS-Analysen an Tag 0, 4 und 7 nach Einwandern der Zellen: Spalte A zeigt die Gesamtpopulation der Zellen und die als Thymozyten definierte Population (R1). In Spalte B sind die PKH-26-positiven, rotfluoreszierenden Zellen dargestellt (mit Prozentangabe).

sehen ist, waren die eingewanderten humanen Zellen an Tag Null deutlich als rotgefärbte Population zu erkennen, wodurch 77,19% der Zellen in der Thymozytenpopulation als humane Zellen beurteilt werden konnten. Bereits am vierten Tag der chimären Organkultur war ein deutlicher Verlust dieser Zellen zu erkennen. Nur noch die Hälfte (52,4%) der untersuchten Zellen wies den roten Farbstoff in der Membran auf. Nach weiteren drei Tagen wurde ein fast vollständiger Verlust der humanen Zellen beobachtet: der Anteil an

rotfluoreszierenden humanen Zellen war auf 10,19% gesunken. Wie schon im vorhergehenden Experiment (3.12.5) konnte also ein Verlust an humanen Zellen in den chimären Kulturen beobachtet werden. Es konnte also geschlossen werden, daß humane CD34-positive haematopoetische Zellen zwar in den murinen Thymus einwanderten, jedoch keine Proliferation und Differenzierung dieser Zellen stattfand; vielmehr muß aus dem Verlust der PKH-26-markierten Population gefolgert werden, dass die humanen Zellen in der chimären Organkultur abstarben.

### **3.12.7 Ausblick**

Wie in den Abschnitten 3.12.1 bis 3.12.6 gezeigt wurde, war es gelungen, ein chimäres FTOC-System soweit zu etablieren, dass eine Einwanderung CD34-positiver Zellen in die murinen Thymi erreicht werden konnte. Genauer heißt dies, dass geeignete Bedingungen für die Kultur funktioneller muriner Thymi etabliert wurden, unter denen die murinen Thymozyten proliferieren und differenzieren konnten. Des weiteren war es gelungen, die murinen Thymozyten durch Behandlung mit 2-desoxy-Guanosin aus den Thymi zu depletieren. Die von murinen Thymozyten depletierten Organe wurden anschließend mit humanen CD34-positiven haematopoetischen Stammzellen in sogenannten „hanging drop“-Kulturen kultiviert. Dies führte zum Einwandern der humanen Zellen in die murinen Thymi, wie durch Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen CD34 oder durch Membranfärbung der Zellen mit PKH-26 nachgewiesen werden konnte. Weitere Kultur dieser chimären Organe führte jedoch zum Verlust der humanen Thymozyten. Demnach sind die Bedingungen, die für die chimäre Organkultur etabliert wurden, noch nicht ideal. An dieser Stelle soll in zukünftigen Versuchen weiter gearbeitet werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 Herstellung replikationskompetenter HIV-1-Klone durch long-range PCR

HIV-1 weist wie viele Lentiviren, einen hohen Grad an Sequenzvariabilität zwischen Isolaten aus unterschiedlichen Patienten auf (Shaw *et al.*, 1984; Wain- Hobson *et al.*, 1985). Diese Variabilität ist hauptsächlich auf die hohe Fehlerrate bei der Reversen Transkription zurückzuführen (Preston *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988). Die hohe Mutationsrate erlaubt es dem Virus sich kontinuierlich vor der Immunreaktion der Körpers zu schützen bzw. Resistenzen gegen Therapeutika zu entwickeln, weshalb es im Verlauf einer HIV-Infektion meistens zu einer Veränderung der genetischen Zusammensetzung der vorherrschenden Virustypen kommt, die sich im Phänotyp widerspiegelt (Tersmette *et al.*, 1988; 1989a; 1989b).

Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, sollten im ersten Teil der vorliegenden Arbeit Virusklone aus den PBMC von HIV-Patienten hergestellt und charakterisiert werden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen sollte dabei auf der Variabilität und der Veränderung des *env*-Gens liegen. Dazu wurde Lymphozyten-DNA aus HIV-1-infizierten Patienten, die sich in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung befanden, isoliert. Wenn möglich sollten sequentielle Blutproben eingesetzt werden, um die Veränderung des Hüllproteins im Verlauf der Erkrankung zu charakterisieren. Mit Hilfe zweier Primer-Paare wurde aus der Lymphozyten-DNA in einer long-range-nested PCR ein 3kb langes Fragment amplifiziert, das dem vollständigen Gen für das HIV-1-Hüllprotein entsprach. Alle Patienten standen unter HAART-Therapie, wodurch die Virustiter entsprechend niedrig waren. Obwohl die Sensitivität der PCR-Methode einen limitierenden Faktor darstellte (Dittmar *et al.* 1997), konnte aus insgesamt zehn Blutproben das *env*-Gen amplifiziert werden, wobei bei drei Patienten die Amplifikation aus sequenzielle Blutproben erfolgreich war. Die Amplifikate wurden anschließend in den proviralen Klon NL4-3 kloniert, indem das *env*-Gen von NL4-3 durch das der Patienten ersetzt wurde. Auf diese Weise wurden rekombinante Virusklone aus neun Blutproben generiert (das Amplifikat aus der zweiten Blutprobe von Patient U7 konnte nicht kloniert

werden). Transfektion der Virusklone in HelaP4/CCR5 und anschließende Infektion dieser Zellen mit Transfektionsüberstand zeigte, dass 12 von 20 Klonen replikationskompetent waren. Die Tatsache, dass bei acht Klonen bei der Reinfektion keine infektiösen Viren produziert wurden, kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass in PBMC viele defekte Proviren vorliegen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre das Auftreten von Rekombinationsereignissen während der PCR-Reaktion (Delwart *et al.* 1992, Little *et al.* 1994). Insgesamt wurden zwölf replikationskompetente rekombinante HIV-1-Klone hergestellt, die sich in ausschließlich in ihrem patientenspezifischen Hüllprotein unterschieden. Derartige rekombinante Viren sind gut geeignet env-spezifische Effekte, wie zum Beispiel env-abhängigen Wirtszelltropismus, zu untersuchen.

#### **4.2 *in vitro* Variabilität der gp120-Regionen V1-2 und V3**

Die hohe Sequenzvariabilität zwischen den HIV-1-Isolaten aus verschiedenen Patienten ist zu einem großen Teil auf die hohe Varianz des env-Gens zurückzuführen. Das Oberflächenprotein gp120 von HIV-1 weist viele Epitope auf, die sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort des Wirtes induzieren können (Haigwood *et al.*, 1990; Clerici *et al.*, 1989; 1991, Ho *et al.*, 1991; Fung *et al.*, 1992). Die große Anzahl an Sequenzabweichungen, die in gp120 und insbesondere in den variablen Regionen (V1-V5) gefunden werden, verleihen dem Virus wahrscheinlich die Fähigkeit die Immunantwort zu umgehen (McKeating *et al.*, 1989).

In der vorliegenden Arbeit sollte zur genotypischen Charakterisierung der hergestellten Virusklone, die alle dem Subtyp B zugeordnet wurden, die Variabilität der Regionen V3 und V1-V2 untersucht werden. Gemäß der Definition von Modrow *et al.* zeigen variable Sequenzabschnitte nicht mehr als 25% konservierte Aminosäurenreste. Die Variabilität der Nukleotidsequenz der V3-Region ist demnach mit 37,1% gering. Außerdem zeigte sich, dass die V3-Region mit 37,1% gegenüber der V1-V2-Schleife (66,4%) wenig variabel war. Eine im Vergleich zu anderen Bereichen des env-Gens geringe Variabilität der V3-Region wurde auch von anderen Autoren gefunden (Kusumi *et al.*, 1992: Antonioli *et al.*, 1995).

Mit Ausnahme der Klone A1-A6 zeigten die V3-Sequenzen einen relativ einheitlichen Genotyp mit intraindividuellen Abweichungen von maximal 2,9% (H9-H13). Die rekombinanten Viren A1-A6 zeigten hingegen eine Varianz von 18,9%. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Klon A5 eine gegenüber den anderen vier Klonen stark veränderte Nukleotidsequenz zeigte. Zu diesem Zeitpunkt konnten in Patient H6 demnach zwei deutlich verschiedene Viruspopulationen gefunden werden: A1, A2, A3 und A6 bildeten die Population P2 während A5 zu einer Population P3 gehören muß. Das parallele Auftreten verschiedener Viruspopulationen in einem Patienten wurde schon früher beschrieben. Es war in diesem Fall trotzdem überraschend, da der Patient als asymptomatisch galt (siehe 3.1) und das Auftreten eines heterogenen Virusschwarms wurde bislang mit dem Ausbruch der AIDS-Erkrankung in Verbindung gebracht wurde (Simmonds *et al.*, 1990). Betrachtet man die Aminosäuresequenzen, so fällt auf, dass A5 eine große Ähnlichkeit zu den Klonen aus Patient D5 (C21-24 und H9-13) zeigt. Eine Kontamination mit Proben von Patient D5 kann nicht absolut ausgeschlossen werden, obwohl die PCR zur Amplifikation der *env*-Gene für alle Patienten separat durchgeführt wurde. Andererseits muß berücksichtigt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *env*-Gene aus Lymphozyten-DNA von Patienten gewonnen wurden, die unter HAART-Therapie standen. In gut kontrollierten Patienten findet man wenig replizierendes Virus, sondern vielmehr ein latentes Virusreservoir in den Zellen. Dies könnte zur Folge haben, dass aus der Lymphozyten-DNA von Patienten, bei denen die Virusreplikation stark unterdrückt war, vorwiegend archivierte *env*-Sequenzen amplifiziert wurden, und nur wenige *env*-Gene aus aktuell replizierenden Viren. Replizierende Viren sind unter HAART-Therapie einem hohen selektiven Druck ausgesetzt, der in einer deutlichen Evolution der *env*-Quasispezies resultieren kann (Günthard *et al.*, 1999). Ibanez *et al.* (2000) beobachteten, dass gerade bei Patienten, in denen die Virusreplikation durch HAART-Therapie gut unterdrückt werden konnte, eine besonders deutliche genetische Veränderung der *env*-Gene stattfand. Es wäre also denkbar, dass die *env*-Klone A1, A2, A3 und A6 eine archivierte Sequenz aus einer früheren virämischen Phase repräsentieren, während es sich bei A5 um das *env*-Gen der replizierenden Virusvariante

handelt, deren Sequenz sich aufgrund des selektiven Drucks aus der HAART-Therapie stark verändert hat.

Für alle anderen Klone waren die intraindividuellen Abweichungen in der Aminosäuresequenz noch geringer als in der Nukleotidsequenz. Mit Ausnahme von H11 (eine Aminosäuren-substitution) zeigten alle Klone aus einer Blutprobe die gleiche Aminosäuresequenz. Demnach waren die Basenpaaraustausche stille Mutationen. Die intraindividuelle Homogenität ließ darauf schließen, dass jeweils das vorherrschende env-Gen kloniert wurde. Bei der Ausnahme der Klone A1-A6 sollte bei weiteren Versuchen nach Möglichkeit mit beiden Populationen gearbeitet werden.

Von den Patienten H6, U7 und D5 konnten die V3-Regionen aus sequenziellen Blutproben analysiert werden, wobei es zwischen der ersten (P1) und der zweiten Blutentnahme (P2) jeweils zu einer Veränderung in der V3-Sequenz gekommen war. Wieder zeigte sich Patient H6 als besonders auffällig, da Population P2 (A1, A2, A3, A6) gegenüber der Sequenz aus der ersten Blutprobe (P1: 12-2, 12-7) kaum verändert war (1%), während A5 (Population P3) um 18,9% abwich. Bei den sequenziellen Klonen spiegelte sich die Veränderung auch in der Aminosäuresequenz wider.

Wie bereits erwähnt, zeigte die V1-V2-Region der rekombinanten Virusklone mit 66,4% eine deutlich höhere Variabilität als die V3-Sequenz (37,1%), die sich neben Nukleotidsubstitutionen auf viele Deletionen zurückführen ließ. Entsprechend variierte die Sequenzlänge des V1-V2-Bereiches: es wurden Längen zwischen 61 und 74 Aminosäuren gefunden. Diese Variabilität entspricht den Befunden anderer Arbeitsgruppen (Palmer *et al.*, 1996).

Innerhalb dieser Region zeigte sich ein großer Unterschied zwischen der V1- und der V2-Schleife: während die Gesamtpopulation im V2-Bereich um 66,4 % variierte, wurde für die V1-Sequenz eine Varianz von 90,7% gefunden. Diese unterschiedliche Variabilität spiegelte sich vor allem in der Sequenzlänge wider. Die V1-Region zeigte eine Differenz in der Sequenzlänge von 11 Aminosäuren (18-29 Aminosäuren). Die Länge des V2-Bereichs unterschied sich nur um maximal sieben Aminosäuren (36-43 Aminosäuren). Die gegenüber V1 sowohl in Sequenzlänge als auch Anzahl der Substitutionen geringere Variabilität der

V2-Schleife ist ein verbreitetes Phänomen (Wang *et al.*, 1995; Palmer *et al.* 1996).

Eine weitere Auffälligkeit war, dass einige Klone, die aus der selben Blutprobe hergestellt worden waren intraindividuelle Unterschiede in einzelnen variablen Regionen aufwiesen. Zum Beispiel waren bei Patient H6 in Population P1 die V1-V2 und die V3-Sequenzen für beide Klone (12-6, 12-7) identisch, während 12-7 in der V3-Schleife eine Deletion von sieben Aminosäuren aufwies. Ein weiteres Beispiel stellen die aus Patient J5 klonierten *env*-Gene G17-G24 dar, die in der V3- und V1-Region variierten (1 bzw. 4,2%), jedoch im V2-Bereich identisch waren. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Population P1 aus Patient D5 (Klone C21-C24), die einmal eine Mutation im V1-Bereich aufwies (C24) und für einen weiteren Klon (C22) eine Veränderung im V2-Bereich. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die drei Bereiche unabhängig voneinander mutieren (Palmer *et al.*, 1996).

#### **4.3 Die rekombinanten Virusklone zeigten einen sehr variablen Phänotyp**

T-Lymphozyten und Makrophagen stellen die hauptsächlichen Wirtszellen von HIV-1 dar, aber auch dendritische Zellen und Microglia des zentralen Nervensystems wurden als Zielzellen beschrieben (Gartner *et al.*, 1986, Koenig *et al.*, 1986; Pope *et al.*, 1994; Weissman *et al.*, 1995). Diese Zelltypen tragen alle das CD4-Molekül an ihrer Oberfläche, das als Rezeptor für den ersten Bindungsschritt von HIV-1 an die Wirtszelle dient. Durch die Bindung von HIV an den CD4-Rezeptor werden Konformationsänderungen im Hüllprotein des Virus ausgelöst. Dabei wird die Bindungstasche für den Korezeptor freigegeben, die vorher durch die V3-Schleife des Env verdeckt wurde. Dieses zweite Bindungsereignis führt zur Fusion von Virus und Wirtszellmembran und schließlich zum Eintritt des Viruspartikels in die Zelle. Als HIV-Korezeptor wurde zunächst CXCR4 und etwas später CCR5 beschrieben. Alle bisher in der Literatur beschriebenen HIV-1-Isolate nutzen entweder CCR5, oder CXCR4 oder beide Rezeptoren um in die Wirtszelle zu gelangen. Nach und nach wurden weitere mögliche Korezeptoren entdeckt, die alle zu der Familie der Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren gehören, wie zum Beispiel CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR8, BOB (GPR15), Bonzo (STRL33) und V28

(Alkhatib et al., 1997 ; Berger et al., 1997 ; Choe et al., 1996, 1998 ; Doranz et al., 1996 ; Rucker et al., 1997 ; Owen et al., 1998 ; Liao et al., 1997, Deng et al., 1997, Farzan et al., 1997). Auch wenn diese Korezeptoren *in vivo* eine untergeordnete Rolle spielen, so erweitert ihre Nutzung dennoch das Spektrum möglicher Wirtszellen (Weiss et al., 1996). Aus diesem Grund könnte der Viruseintritt durch alternative Rezeptoren (andere als CCR5 oder CXCR4) eine Rolle in der fortschreitenden Erkrankung und in der Effizienz der Virustransmission spielen. Die Nutzung verschiedener Korezeptoren ist dementsprechend ein wichtiges Kriterium zur phänotypischen Charakterisierung von HIV-1-Isolaten und -Klonen. Um die Spezifität der Virusklone für bestimmte Chemokinrezeptoren zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit spezielle Indikatorzelllinien benutzt: humane Osteosarkomzelllinien (GHOST), die neben CD4 jeweils einen der genannten Chemokinrezeptoren exprimieren. Die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Klone waren alle in der Lage GHOST-Zellen über CCR5 zu infizieren, wobei fünf Klone (G17, G19, 12-6, 12-7, K5-4, KN3-2) ausschließlich diesen Korezeptor nutzen konnten. B2 konnte zusätzlich CXCR4 nutzen und wurde als dualtropes Virus charakterisiert. Die übrigen Virusklone erwiesen sich als sehr interessant, da sie neben CCR5 und CXCR4 bis zu sieben alternative Korezeptoren nutzen konnten, um in die Indikatorzelllinie zu gelangen (C22: CCR3, CCR5, CCR8, CXCR4, BOB, V28; A5, H9, H10, H11: zusätzlich CCR1, CCR2b, Bonzo). Die Klone wiesen damit ein auffallend breites Spektrum an möglichen Korezeptoren auf. Interessant war jedoch nicht nur die Vielzahl an genutzten Korezeptoren, sondern auch die Rezeptoren selbst. Vier der Klone (A5, H9, H10, H11) waren in der Lage GHOST-Zellen über Bonzo und CCR1 zu infizieren. Bonzo wurde zwar bereits als möglicher Korezeptor für HIV-1 beschrieben (Deng *et al.*, 1997), bisher wurden aber nur sehr wenige Isolate gefunden, die in der Lage waren diesen Rezeptor zur Infektion zu nutzen (Pöhlmann *et al.*, 1999). CCR1-vermittelter Viruseintritt wurde bislang vor allem für HIV-2 beschrieben wurde (Guillon *et al.*, 1998; McKnight *et al.*, 1998).

Abgesehen von einer hohen Variabilität des Phänotyps innerhalb der Patientengruppe konnte auch eine Veränderung der Korezeptornutzung im Verlauf der Infektion festgestellt werden. Bei Patient H6 wurden aus der ersten Blutprobe Virusklone generiert, die ausschließlich CCR5 nutzen konnten,

während der Klon aus der zweiten Blutprobe (A5) als multitrop charakterisiert wurde. An dieser Stelle muss jedoch erneut darauf hingewiesen werden, dass eine Kontamination der Proben nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Auch bei Patient D5 konnte eine Verbreiterung des Spektrums an möglichen Korezeptoren festgestellt werden. Während der Klon C22 GHOST-Zellen über CCR5, CXCR4, CCR3, CCR8, BOB und V28 infizieren konnte, herrschte vier Jahre später ein Virustyp vor (H9, H10, H11), der in der Lage war zusätzlich auch noch CCR1 und Bonzo zu nutzen. Eine Veränderung im Tropismus der vorherrschenden Virusvariante wurde auch von anderen Arbeitsgruppen erwähnt (Connor *et al.*, 1997; van't Wout *et al.*, 1998).

Die Ermittlung der Korezeptornutzung von Virusklonen stellt eine gute Methode zur Phänotypisierung dar. Um die Situation *in vivo* besser wiederzugeben, wurden auch Infektionsstudien auf Primärzellen durchgeführt. Zunächst wurden Periphere Blutlymphozyten (engl.: peripheral blood monocytes; PBMC) infiziert, da CD4-positive Lymphozyten die Hauptzielzellen einer HIV-Infektion darstellen. Die *in vitro* Infektion von PBMC zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den 12 Virusklonen. Allein während der ersten sechs Tage nach Infektion war für die multitropen Viren (A5, C22, H9, H10, H11) und den dualtropen Klon (B2) ein schnellerer Anstieg der p24-Konzentration zu beobachten als für die CCR5-nutzenden Viren. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass für die dual- und multitropen Viren eine größere Anzahl an Zielzellen vorhanden war. Obwohl die multitropen Klone (A5, C22, H9, H10, H11) *in vitro* weit mehr verschiedene Korezeptoren nutzen konnten als das dualtrophe Virus B2, konnte kein Unterschied in der Effizienz der Infektion von PBMC festgestellt werden. Dieser Befund spiegelt die Tatsache wider, dass die alternativen Korezeptoren *in vivo* eine untergeordnete Rolle beim Eintritt in die Wirtszelle spielen.

Neben PBMC spielen auch Makrophagen eine wichtige Rolle als Wirtszelle für HIV-1. Die meisten HIV-1-Isolate sind in der Lage, Makrophagen zu infizieren, wobei große Unterschiede in der Infektiosität verschiedener Virusisolate beschrieben wurden (Valentin *et al.*, 1994). Diese Unterschiede wurden zunächst auf eine generelle Korrelation zwischen Zelltropismus und der

Fähigkeit in T-Zelllinien Syncytien induzieren zu können zurückgeführt. Unterschieden wurden dabei sogenannte NSI-Viren (nicht-Syncytium-induzierend; heute mit CCR5-Viren gleichgesetzt), denen ein erhöhter Makrophagentropismus zugeordnet wurde (Collmann et al., 1989; Schuitemaker et al., 1991) und SI-Viren (Syncytium-induzierende Viren; CXCR4-Viren und dual- und multitrope Viren, die CXCR4 nutzen), die in Makrophagen nur ineffizient oder gar nicht replizieren konnten (Collin et al., 1994). In der Zwischenzeit weiß man, dass vor allem T-Zell-adaptierte Laborstämme nicht in der Lage sind Makrophagen zu infizieren, während viele primäre SI-Viren einen Makrophagentropismus zeigen (Simmons, *et al.*, 1996; Simmons *et al.*, 1998; Tokunaga *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden Infektionsversuche auf Makrophagen mit exemplarisch ausgewählten Virusklonen durchgeführt. Alle untersuchten Klone waren in der Lage, Makrophagen produktiv zu infizieren. Für die Klone G17, G19, 12-6 und KN3-2, die vorher als CCR5-Viren (NSI-Viren) charakterisiert wurden, war der Makrophagentropismus zu erwarten. Überraschender war, dass sich auch die dual- und multitropen Viren (SI-Viren; B2, A5, H9, H10 und H11) als makrophagentrop erwiesen. Wie bereits erwähnt wird der Makrophagentropismus von SI-Viren kontrovers diskutiert. Während erste Untersuchungen mit primären SI-Isolaten zeigten, dass diese nicht in der Lage waren Makrophagen zu infizieren (Schuitemaker *et al.*, 1991; Karita *et al.*, 1997), wurde später ein molekularer Klon eines primären SI-Isolates, 89.6, beschrieben, der sowohl Makrophagen als auch T-Zelllinien effizient infizieren konnte (Collmann *et al.*, 1992). Dieses Virus wurde als multitropes Virus (CCR5, CXCR4, CCR3, CCR2b, CCR8, V28) charakterisiert (Los Alamos Datenbank), was zu der Hypothese führte, dass dual- und multitrope SI-Stämme als Zwischenstadium zwischen reinen CCR5- und CXCR4-Viren existieren könnten (Schuitemaker *et al.*, 1992; Connor *et al.*, 1997). Die Ergebnisse aus der Makrophageninfektion in dieser Arbeit unterstützen diese Hypothese. Die untersuchten SI-Viren waren alle als dual- oder multitrop charakterisiert worden, könnten also dem intermediären Virustyp zwischen reinen CCR5- und CXCR4-Viren zugeordnet werden und zeigen dementsprechend Makrophagen-tropismus. In der Zwischenzeit weiß man, dass auch CCR3 (Alali *et al.*, 1999) und CXCR4 (Verani *et al.*, 1998; Yi *et al.*,



1999; Valentin *et al.*, 2000) effektiv als Korezeptoren für die Infektion von Makrophagen genutzt werden können. Möglicherweise wird der Makrophagentropismus der dual- und multitropen Klone auch durch die Nutzung dieser alternativen Korezeptoren beeinflusst.

Quantitativ waren nach drei Wochen kaum Unterschiede zwischen den untersuchten Virusklonen zu finden. Allein der Virusklon A5 schien in Makrophagen besser zu replizieren als die übrigen Klone. Dies war vor allem deswegen überraschend, weil die Aminosäuresequenz der V3- und der V1-V2-Region dieses Virus mit den entsprechenden Sequenzen der Klone H10 und H11 weitgehend übereinstimmt. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass der Makrophagentropismus nicht allein durch die variablen Regionen des Hüllproteins determiniert ist. Auch die Transmembraneinheit des Hüllproteins, gp41 spielt eine Rolle beim Viruseintritt, so dass auch nach der Bindung an die Zelle oder nach dem Eintritt in die Zelle die Infektion teilweise oder ganz blockiert werden könnte (Davis *et al.*, 1997; Weissmann *et al.*, 1997; Gosling *et al.*, 1997)

#### **4.4 Korreliert der Phänotyp mit dem Krankheitsstatus der Patienten?**

Wie im vorherigen Abschnitt bereits diskutiert wurde, existieren viele verschiedene Quasispezies von HIV-1, die sich in ihrem Zelltropismus und in der Nutzung von Korezeptoren unterscheiden. Dabei werden die Hauptgruppen der NSI-Viren und der SI-Viren unterschieden. In vielen Patienten wurde festgestellt, dass zum Zeitpunkt der Serokonversion vor allem CCR5-nutzende NSI-Viren gefunden werden. Dieser Virustyp scheint auch die Hauptrolle bei der Übertragung von HIV-1 zu spielen (Zhu *et al.*, 1993; van't Wout *et al.*, 1994). In späteren Stadien der Infektion treten vermehrt SI-Viren auf. Diese CXCR4-nutzenden Viren zeigen in Zellkultur einen stärkeren zytopathischen Effekt (Glushakova *et al.*, 1995; Glushakova *et al.*, 1997; Glushakova *et al.*, 1998; Penn *et al.*, 1999; Grivel *et al.*, 1999; Grivel *et al.*, 2000) und werden mit dem Ausbruch und schnellerem Fortschreiten von AIDS in Verbindung gebracht (Koot *et al.*, 1993; Richman *et al.*, 1994; Connor *et al.*, 1997). Es wurde postuliert, dass ein Zusammenhang zwischen dem Phänotyp der

vorherrschenden Virusvariante und dem Krankheitsstatus des Patienten besteht (Connor *et al.*, 1997).

Diese Hypothese sollte anhand der in der vorliegenden Arbeit hergestellten und charakterisierten Viren überprüft werden. Dazu wurden die Patienten anhand der klinischen Daten in verschiedene Krankheitsstadien eingeteilt und der Phänotyp (im Bezug auf Korezeptornutzung) der vorherrschenden Virusvariante mit diesem Befund verglichen.

Bei der Analyse der Klone aus den sequenziellen Blutproben der Patienten H6 und D5 wurde eine Veränderung des Phänotyps der vorherrschenden Virusvariante festgestellt. Dabei handelte es sich bei den Virusklonen aus Patient D5 zu beiden Zeitpunkten um SI-Viren, wobei sich das Spektrum der *in vitro* genutzten Korezeptoren verbreiterte, in dem zwei zusätzliche Chemokinrezeptoren (Bonzo und CCR1) genutzt werden konnten. Deutlicher war die Veränderung bei Patient H6, wo aus der ersten Blutprobe reine CCR5-Viren kloniert wurden, während der Virusklon aus der zweiten Blutprobe (A5) als multitropes SI-Virus charakterisiert wurde. Hier hatte also im Verlauf der Infektion ein Wechsel von CCR5-nutzenden NSI-Viren zu multitropen SI-Viren stattgefunden. Dieser Befund passt gut zu der Hypothese, dass es im Verlauf einer HIV-1-Infektion zu einer Entwicklung von NSI- zu SI-Viren kommt (Schuitemaker *et al.*, 1992).

Ordnet man jedoch die Virusklone den Krankheitsstadien der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme zu, so ergibt sich ein kontroverses Bild. Die Patienten D5 und H4 befanden sich bereits zu Beginn der HAART-Therapie in einem schlechten Zustand und wurden entsprechend ihrer klinischen Daten in das späte Krankheitsstadium (C3) eingeordnet. Die Klone, die aus den Blutproben dieser Patienten hergestellt wurden, erwiesen sich als dualtrope (B2; Patient H4) bzw. multitrope (C22, H9, H10, H11; Patient D5) SI-Viren. In den asymptomatischen Patienten K1 und H6 (erste Blutentnahme) wurden CCR5-nutzende NSI-Viren (KN3-2, 12-6 und 12-7) gefunden. In diesen Fällen wurde aus Patienten in fortgeschrittenem Stadium der AIDS-Erkrankung SI-Varianten kloniert, während die vorherrschende Virusvariante in den asymptomatischen Patienten NSI-Phänotyp zeigten, was der postulierten Korrelation Krankheitsstatus und Virusphänotyp (Connor *et al.*, 1997) entspricht. Analysiert man jedoch die übrigen Klone aus der Patientengruppe,

so kann diese Hypothese nicht gehalten werden. Die Patienten U7 und J5 wurden gemäß ihrer klinischen Daten einem sehr fortgeschrittenen Krankheitsstadium (B3) zugeordnet. Dennoch wurden aus ihren Blutproben CCR5-Viren (NSI) kloniert. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen von Li *et al.* (1999), die ebenfalls Patienten beschrieben, in denen trotz fortgeschrittener AIDS-Erkrankung nur NSI-Isolate gefunden wurden. Das Auftreten von CCR5-Viren in einem späten Krankheitsstadium steht im Widerspruch zu der postulierten Korrelation, der ausbrechenden und fortschreitenden AIDS-Erkrankung mit dem Auftreten von SI-Viren. Besonders deutlich wird dieser Widerspruch bei der Analyse der Daten von Patient H6. Dieser Patient war zu Beginn der HAART-Therapie asymptomatisch und war deshalb in das Krankheitsstadium A1 eingestuft worden. Aus den klinischen Daten war auch zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme keine Verschlechterung des Gesundheitszustandes zu erkennen. Trotzdem konnte zu diesem Zeitpunkt ein Virusklon hergestellt werden (A5), der sich in Genotyp und Phänotyp deutlich von den Klonen aus der ersten Blutprobe (12-6, 12-7) unterschied und als multitropes SI-Virus charakterisiert wurde. Es muss jedoch erneut darauf hingewiesen werden, dass A5 in der V3-Region eine Sequenz aufwies, die von den anderen Klonen, die aus dieser Blutprobe hergestellt wurden, stark abwich. In der untersuchten Patientengruppe konnten SI- und NSI-Varianten sowohl in der asymptomatischen Phase als auch nach Ausbruch von AIDS gefunden werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Entstehung genotypisch und phänotypisch veränderter Quasispezies auch in Patienten beobachtet werden kann, deren Gesundheitszustand sich nicht verschlechterte. Es liegt also keine zwingende Korrelation von Virusphänotyp und Krankheitsstatus des Patienten vor. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen gestützt (Li *et al.*, 1999)

#### **4.5 Der Phänotyp von HIV-1-Isolaten kann anhand der Aminosäuresequenz des V3-loop vorhergesagt werden**

Die Behandlung von AIDS-Patienten erfolgte bislang vor allem mit Medikamenten, die die viralen Enzyme Reverse Transkriptase und Protease inhibieren. Dabei kam es bereits zur Entwicklung vieler resistenter

Virusstämme, weshalb nach neuen Therapeutika gesucht wird. Ein interessanter Angriffspunkt wäre dabei der Viruseintritt in die Wirtszelle. Es wurde gezeigt, daß die natürlichen Liganden der Chemokin-Rezeptoren in der Lage sind virale Infektion zu hemmen (Paxton *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996) und erste modifizierte Chemokine erwiesen sich *in vitro* und *in vivo* als effektive Inhibitoren (Simmons *et al.*, 1997; Mack *et al.*, 1998; Lusso *et al.*, 2000). Darüber hinaus werden synthetischen Antagonisten wie AMD3100 und T-22, die die Interaktion zwischen Chemokinenrezeptoren und ihren Liganden nachahmen in klinischen Studien getestet (D'Souza *et al.*, 2000). Eine weitere Stelle die einen Eingriff in den Prozess des Viruseintritts erlaubt, stellt die Fusion der viralen und der zellulären Membranen dar. Das 36-Aminosäurenpeptid T20 kann diesen Schritt hemmen, indem es an die zweite helikale Region des gp41 Transmembranproteins bindet (Chan *et al.*, 1998; Kilby *et al.*, 1998; Eckert *et al.*, 1999). Um Therapeutika, die den Viruseintritt hemmen gezielt einsetzen zu können, ist es notwendig, dass der Phänotyp der im Patienten vorherrschenden Virusvariante bekannt ist. Die Isolation von Viren aus dem Patientenmaterial und anschließende Charakterisierung ist mit großem Zeitaufwand verbunden, weshalb dieser Weg zur Bestimmung der geeigneten Therapie in der Praxis kaum durchführbar ist. Um die Phänotypisierung der vorherrschenden Virusvariante eines Patienten zu erleichtern, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein rekombinanter Virusassay entwickelt, bei dem das vollständige env-Gen aus Patientenmaterial amplifiziert und dazu eingesetzt wird, einen rekombinanten Virusschwarm herzustellen (Dittmar *et al.* 2001), mit dessen Hilfe der Phänotyp der vorherrschenden Virusvariante eines Patienten ermittelt werden kann. Noch einfacher wäre es jedoch für die Praxis, wenn direkt aus der Sequenz des vorherrschenden Virustyps eine Aussage über den Phänotyp gemacht und anhand dieser Information geeignete Chemokinrezeptor-Antagonisten gewählt werden könnten.

Das Hüllprotein von HIV interagiert bei der Infektion einer Wirtszelle mit den beiden Rezeptoren. Aus diesem Grund wird der Wirtszelltropismus (Nutzung bestimmter Korezeptoren) vor allem über die Zusammensetzung des Gens für das Oberflächenprotein gp120 determiniert. Studien mit chimären Virushüllen zeigten, dass sich der Bereich, durch den der Tropismus determiniert wird, im Wesentlichen auf die V3-Region eingrenzen lässt (Shioda *et al.*, 1992; de Jong

*et al.*, 1992; Grimaila *et al.*, 1992; Ebenbichler *et al.*, 1993). Donaldson *et al.* beschrieben 1994 eine Methode zur genotypischen Differenzierung zwischen NSI- und SI-Viren. Die Arbeitsgruppe ordnete verschiedene Virusisolate in zwei Phänotyp-Gruppen (NSI- und SI-Viren) ein. Die Isolate wurden sequenziert und ihre V3-loop-Sequenzen mit der Konsensussequenz (Los Alamos Datenbank) für NSI- bzw. SI-Viren verglichen. Für jedes Virus wurde die Anzahl, der von der jeweiligen Konsensussequenz abweichenden Aminosäuren ermittelt. Diese wurde in einem Plot gegen die Nettoladung der V3-loop-Sequenz aufgetragen. Dabei ergab sich eine klare Trennung zwischen beiden Virusgruppen, wobei die NSI-Viren durchgehend niedrigere Nettoladungen und geringere Anzahl an Abweichungen von der Konsensussequenz aufwiesen. Diese Methode wurde auch für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten HIV-1-Klone angewandt. Um eine größere Gruppe von Virusklonen bzw. –Isolaten untersuchen zu können, wurden der Analyse verschiedene publizierte HIV-1-Isolate (Los Alamos Datenbank) hinzugefügt. Dabei ergab sich wie von Donaldson *et al.* (1994) publiziert eine klare Trennung zwischen NSI- und SI-Viren, wobei die NSI-Viren wie in der Publikation durchgehend geringere Nettoladungen und weniger Abweichungen von der Konsensussequenz aufwiesen als die SI-Viren. Bei näherer Analyse des aus den Sequenzdaten entstandenen Plots, konnte eine weitere Auffälligkeit festgestellt werden. Es war nicht nur die erwartete Trennung zwischen NSI- und SI-Viren zu sehen, sondern eine weitere Auftrennung der SI-Isolate: in dieser Virusgruppe waren distinkte Ansammlungen von reinen CXCR4-nutzenden Viren mit sehr hohen Nettoladungen bzw. von dual- und multitropen Viren, die sich im Bezug auf Nettoladung und Aminosäuresubstitutionen in der V3-Schleife einem mittleren Bereich zuordnen lassen. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die V3-loop-Sequenz nicht nur, wie von Donaldson *et al.* (1994) publiziert, ausreicht um einen NSI- oder SI-Phänotyp vorauszusagen. Darüber hinaus kann anhand dieser Information vorausgesagt werden, ob es sich um dual- bzw. multitrope SI-Viren oder reine CXCR4-nutzende Viren handelt. In der Praxis würde dies bedeuten, dass der behandelnde Arzt anhand der V3-Sequenz erkennen könnte, welche Korezeptoren von der vorherrschenden Virusvariante genutzt werden. Gemäss dieser Information könnte dann eine

Antagonist für die jeweiligen Korezeptoren gewählt werden, um so den Eintritt des Virus in die Wirtszelle zu verhindern.

Die durchgeführte Analyse der V3-Sequenzen eröffnet neben der Möglichkeit, den Virus-Phänotyp vorherzusagen noch einen weiteren interessanten Aspekt. In 4.3 wurde bereits diskutiert, dass bei vielen Patienten im Verlauf der Infektion eine Veränderung des Virusphänotyps von CCR5 zu CXCR4-Viren stattfindet. Dies geschieht wahrscheinlich nicht in einem Schritt, sondern über die Zwischenstufe von dual- und multitropen Viren (Connor *et al.*, 1997). Die Aufteilung der HIV-Klone und –Isolate in die drei distinkten Gruppen von CCR5-CXCR4- und dual bzw. multitropen Viren (Abb.3.9) unterstützt diese Hypothese. Die Populationen der CCR5 und der reinen CXCR4-nutzenden Isolate liegen im Plot sehr weit voneinander entfernt, d.h. die Aminosäuresequenzen und die daraus resultierenden Nettoladungen der V3-Region sind sehr unterschiedlich. Es ist demnach kaum zu erwarten, dass durch den Austausch einzelner Aminosäuren ein direkter Korezeptorwechsel von CCR5 zu CXCR4 erfolgt. Die Population der dual- und multitropen Viren ist im Plot zwischen den Extremen CCR5 (niedrige Nettoladung) und CXCR4 (hohe Nettoladung) zu finden. Dies zeigt sich vor allem darin, dass die Nettoladung in einem mittleren Bereich liegt. Anhand dieser Analyse kann man sich sehr gut vorstellen, dass es durch Substitution von Aminosäuren zur Erhöhung der Nettoladung kommt, was dem Virus die Fähigkeit verleiht, neben CCR5 auch CXCR4 und evtl. weitere Korezeptoren zu nutzen. Werden weitere Mutationen eingeführt, so erhöht sich die Nettoladung weiter, was dazu führt, dass das Virus nicht mehr in der Lage ist, CCR5 zu nutzen, wodurch ein reines CXCR4-Virus entsteht.

#### **4.6 Etablierung eines *in vitro* T-Zell-Differenzierungssystems**

In 4.5 wurde diskutiert, dass eine gut charakterisierte Viruspopulation wie sie in der vorliegenden Arbeit hergestellt wurde, zum Beispiel für Analysen zur Vorhersage des Virusphänotyps eingesetzt werden kann. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die gezielte Infektion bestimmter Zelltypen, um auf diese Weise mehr über die Pathogenese einer HIV-1-Infektion zu lernen. Das Hauptproblem in der HIV-Pathogenese stellen Depletion und Dysfunktion der

CD4-positiven T-Zellen dar, was zum Zusammenbruch des Immunsystems und zur Ausbildung des Krankheitsbildes AIDS führt. Bis heute ist noch nicht vollständig geklärt, wodurch es zu diesem massiven Verlust an T-Zellen kommt. Vermutlich spielt eine gestörte oder gar vollständig blockierte Produktion von CD4-positiven T-Zellen die Hauptrolle bei ihrer fortschreitenden Depletion (Fleury *et al.*, 1998; Hellerstein *et al.*, 1999). Dabei ist es sehr wahrscheinlich, dass die Differenzierung im Thymus gestört ist, da in allen Stadien der Erkrankung Infektion im Thymus (Stroma und Thymozytenpopulation) gezeigt werden konnte und außerdem die Architektur des Thymus bei HIV-Patienten zerstört ist (Rosenzweig *et al.*, 1993). Außerdem wurde bei HIV-1-infizierten Kindern eine Thymus-Dysfunktion festgestellt (Kourtis *et al.*, 1996). Um die pathogenen Mechanismen im Thymus näher untersuchen zu können, wäre es interessant, die Thymuspathogenese *in vitro* untersuchen zu können. Aus diesem Grund sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit versucht werden, ein *in-vitro* T-Zell-Differenzierungssystem zu etablieren. Dieses System könnte dann später dazu eingesetzt werden, den Einfluß einer HIV-Infektion auf die T-Zell-Differenzierung zu untersuchen, indem Zellen aus definierten Differenzierungsstadien mit verschiedenen Viren infiziert werden.

Bevor mit der Etablierung eines derartigen Differenzierungssystems begonnen werden konnte, musste die Qualität der Ausgangsmaterials, der CD34-positiven haematopoetischen Stammzellen überprüft werden. Die CD34-positiven Zellen wurden mit Hilfe von magnetischen Kügelchen (MACS-System) aus Nabelschnurblut isoliert. FACS-Analysen zeigten, dass die so isolierte Zellpopulation zu 94,52 bis 97,2 % rein war. Dies entspricht den Angaben des Herstellers. Eine weitere Voraussetzung für eine erfolgreiche *in vitro*-Differenzierung ist die vollständige Funktionsfähigkeit der haematopoetischen Stammzellen, d.h. die Zellen müssen sich zur Proliferation und zur Differenzierung anregen lassen. Zur Überprüfung der Proliferationsfähigkeit wurde ein relativ einfaches System zur Expansion von Stammzellen eingesetzt. Gemäß der von Laer *et al.* (2000) publizierten Methode, wurden die CD34-positiven Zellen in Medium kultiviert, dem die Zytokine Flt3, IL3 und SCF

zugesetzt wurden. Dabei ergab sich nach zwei Tagen eine zwei- bis dreifache Expansion der Zellen und nach weiteren acht Tagen konnte sogar eine zehnfache Expansion beobachtet werden. Dies entspricht der unter diesen Kulturbedingungen publizierten Expansion und kann als Beweis für die Proliferationsfähigkeit der CD34-positiven Zellen gelten. In der Expansionskultur konnte neben der Proliferation der Zellen noch ein weiteres Phänomen beobachtet werden: die Zellen veränderten im Verlauf der Expansionskultur ihren Phänotyp. Während am zweiten Tag noch alle Zellen CD34-positiv waren, konnten nach zehn Tagen Kultur kaum noch CD34-positive Zellen in der FACS-Analyse nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass während der Expansionskultur neben der Proliferation der Zellen auch eine gewisse Differenzierung stattgefunden hat. Dieser Befund schließt aus, dass eine derartige Expansionskultur zur Vermehrung des Ausgangsmaterials eingesetzt werden kann, da ausschließlich CD34-positive Zellen für die *in vitro* Differenzierung eingesetzt werden sollten. Gleichzeitig kann die Veränderung des Phänotyps der haematopoetischen Stammzellen in der Expansionskultur als erster Hinweis auf ihr Differenzierungspotential interpretiert werden. Dieser Hinweis sollte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Pluripotente haematopoetische Stammzellen exprimieren neben CD34 einen weiteren charakteristischen Marker auf ihrer Zellmembran, der als AC133 bezeichnet wird und ausschließlich auf diesem Zelltyp gefunden wird (Yin *et al.*, 1997). Die Expression von AC133 auf der Oberfläche einer Stammzelle gilt demnach als Hinweis auf vollständiges Differenzierungspotential. Aus diesem Grund wurde eine FACS-Analyse mit Antikörpern gegen AC133 durchgeführt. Die untersuchten Stammzellen waren zu 92-94,2% CD34/AC133-doppelpositiv, woraus geschlossen werden kann, dass durchschnittlich 93% der aufgereinigten Zellen ein vollständiges Differenzierungspotential besitzen. Die Fähigkeit zur gezielten Differenzierung sollte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. Caux *et al.* beschrieben 1996 ein *in vitro* Differenzierungssystem für Makrophagen, bei dem die CD34-positiven Stammzellen zunächst mit Hilfe der Zytokine GM-CSF, SCF und TNF $\alpha$  expandiert und anschließend durch Kultivierung mit M-CSF zu Makrophagen differenziert wurden. Dieses System sollte als Beweis für die Differenzierungsfähigkeit der aus Nabelschnurblut isolierten haematopoetischen



Stammzellen dienen. Wie von Caux *et al.* publiziert, wurde nach sechs Tagen Kultur mit GM-CSF, SCF und TNF $\alpha$  eine bis zu 20-fache Expansion der Zellen festgestellt. Außerdem ergaben FACS-Analysen, dass die Zellen, wie erwartet, auf ihrer Oberfläche kein CD34 mehr exprimierten, wohingegen CD1a und CD14 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnten. Nach weiteren sechs Tagen Kultur mit M-CSF-supplementiertem Medium war der Großteil der Zellen CD14-positiv, während nur noch auf wenigen Zellen CD1a nachgewiesen werden konnte. Im Lichtmikroskop zeigten die Zellen einen makrophagenähnlichen Phänotyp, was zusammen mit den FACS-Daten auf eine erfolgreiche Makrophagendifferenzierung schließen lässt und als Beweis für das Differenzierungspotential der CD34-positiven Zellen gilt. Zusammenfassend zeigten diese Vorversuche neben der hohen Reinheit der isolierten haematopoetischen Stammzellen ihre Fähigkeit zur Proliferation und zur Differenzierung. Die mit Hilfe des MACS-System gewonnenen CD34-positiven Zellen waren also für die Etablierung eines Systems zur *in vitro* T-Zell-Differenzierung geeignet.

Während Differenzierung von haematopoetischen Stammzellen zu Makrophagen oder dendritischen Zellen (Caux *et al.*, 1996) relativ einfach durch gezielte Stimulation mit Zytokinen erreicht werden kann, wird zur T-Zell-Differenzierung immer der direkte Kontakt zu Stromazellen benötigt. Die Stromazellen bilden die für die Differenzierung notwendigen Zytokine ( Lee *et al.*, 1987; Kaushansky *et al.*, 1988; Fibbe *et al.* 1988). Darüber hinaus verfügen Stromazellen über eine komplexe extrazelluläre Matrix, die den direkten Zellkontakt zwischen Stroma und Progenitorzellen unterstützt (Bentley *et al.*, 1982; Verfaillie *et al.*, 1990; Liesveld *et al.*, 1991). Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung des Stroma, ist es schwierig den verschiedenen Zelltypen ihre konkrete Rolle in der Differenzierung von haematopoetischen Stammzellen zuzuordnen (Allen *et al.*, 1984).

Thalmeier *et al.*, etablierten 1994 eine Feeder-Zelllinie für haematopoetische Stammzellen aus Knochenmarkstroma (L88). PCR-Analysen zeigten, dass diese Zelllinie eine große Anzahl von haematopoetischen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren produziert, wie zum Beispiel IL6, IL7, IL8, IL10, IL11, kit-Ligand, GM-CSF, G-CSF und M-CSF. Diese Vielzahl von Zytokinen lässt

darauf schließen, dass die Zelllinie zur Differenzierung haematopoetischer Zellen geeignet sein könnte. Aus diesem Grund wurde die L88-Zelllinie für einen ersten Versuch zur *in vitro* T-Zell-Differenzierung gewählt. Dafür wurden CD34-positive Zellen mit der Stromazelllinie, die zuvor mit  $\gamma$ -Strahlen bestrahlt wurde, in Kokultur genommen. Zur besseren Unterscheidung der beiden Zelltypen, in der FACS-Analyse, wurden die Stammzellen vor der Kokultur mit einem rotfluoreszierenden Membranfarbstoff (PKH-26) gefärbt. Die Kokulturansätze wurden im Verlauf von drei Wochen regelmäßig geerntet und durchflußzytometrisch analysiert. Dabei sollte versucht werden, verschiedene Oberflächenmarker nachzuweisen, die für die Differenzierung von Thymozyten charakteristisch sind (CD34, CD1a, CD69). Keiner dieser Differenzierungsmarker konnte in den Kokulturen nachgewiesen werden. Es wurde jedoch ein Verlust an CD34-positiven Zellen beobachtet, obwohl die Membranfärbung der Zellen zeigte, dass die ursprünglich eingesetzten haematopoetischen Stammzellen noch in den Kokulturen vorhanden waren. Dieser Befund deutete darauf hin, dass eine Differenzierung zu einem anderen Zelltyp als T-Zellen stattgefunden hat. Aus diesem Grund wurden erneut Kokulturen angesetzt, wobei in diesem neuen Ansatz gezeigt werden konnte, dass nach zehn Tagen Kokultur nicht nur ein Verlust von CD34 auf der Zelloberfläche zu beobachten war, sondern auch eine Expression von CD14, einem charakteristischen Marker für Makrophagen. In Kokultur mit der L88-Zelllinie scheinen sich CD34-positive haematopoetische Stammzellen also in die Makrophagenrichtung zu differenzieren. Dieser Befund lässt sich gut damit vereinbaren, dass von der Stromazelllinie unter anderem der Makrophagendifferenzierungsfaktor M-CSF produziert wird (Thalmeier *et al.* 1994).

Der zweite Versuch, ein *in vitro* T-Zell-Differenzierungssystem zu etablieren, basierte auf einer von Merckenschlager und Fisher (1992a, 1992b, 1993) beschriebenen Methode, mit der humane Thymozyten in murinem Thymus ausdifferenziert werden. Jenkinson *et al.*, beschrieben 1992 eine Methode, mit der die Thymozyten mit Hilfe von 2-desoxy-Guanosin aus dem fötalen Thymus depletiert werden, und die so entstandenen Thymusrudimente mit Thymozyten-Vorläuferzellen rekonstituiert werden. Auf diese Weise war es möglich, die

Differenzierung von T-Lymphozyten *in vitro* zu untersuchen (Jenkinson und Owen 1990). Merckenschlager und Fisher (1992a, 1992b, 1993) gelang es, dieses System weiterzuentwickeln, indem sie die murinen Thymusrudimente mit humanen Thymozyten (aus Nabelschnurblut isoliert) rekonstituierten. Die Umgebung des murinen Thymusstroma war ausreichend, um zur Differenzierung der humanen Thymozyten zu führen. In der vorliegenden Arbeit sollte ein ähnliches System etabliert werden, bei dem allerdings nicht die gesamte Lymphozyten-Population aus Nabelschnurblut eingesetzt werden sollte, sondern ausschließlich die CD34-positiven haematopoetischen Stammzellen. Auf diese Weise soll eine parallele Differenzierung aller Thymozyten erreicht werden, die es ermöglicht, in zukünftigen Versuchen gezielt bestimmte Differenzierungsstadien zu infizieren.

Zunächst mussten geeignete Bedingungen für die Kultur des murinen Thymus gefunden werden. Das von Merckenschlager und Fisher publizierte Medium, das mit Mercaptoethanol supplementiert wurde, erwies sich als ungeeignet, da die Organe unter diesen Bedingungen nach wenigen Tagen abstarben. In Medium mit 10% humanem AB-Serum ohne Zusatz von Mercaptoethanol (Clark *et al.*, 1999) konnte der murine Thymus zwar etwas länger in Kultur gehalten werden, doch erst der Zusatz von 20% humanem AB-Serum führte dazu, dass eine Differenzierung der murinen Thymozyten stattfand. Außerdem wurden verschiedene Filtersysteme getestet. Am besten eigneten sich die Nucleopore-Filter, die direkt auf der Mediumoberfläche schwammen, wodurch die Organe nur von einer dünnen Mediumschicht umgeben waren, was einen idealen Gasaustausch ermöglicht.

Nachdem die Kulturbedingungen etabliert waren, konnte mit den Versuchen zur T-Zelldifferenzierung begonnen werden. Dazu wurden die murinen Thymi zunächst für vier Tage mit 2-desoxy-Guanosin behandelt, was zu einer annähernd vollständigen Depletion der murinen Thymozyten führte, wie durch Bestimmung der Zellzahl gezeigt wurde. Der nächste Schritt war es nun, humane CD34-positive Zellen in den murinen Thymus einwandern zu lassen. Dazu wurden  $1 \times 10^4$  Stammzellen in Tropfen von je 20  $\mu$ l in Terazaki-Platten ausgesät. In jeden dieser Tropfen wurde ein von murinen Thymozyten depletierter und anschließend gewaschener Thymus gelegt. Die Platten wurden über Kopf („hanging drops“) für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Wurden die

Thymi anschließend gewaschen und in Suspension gebracht, so konnte im Vergleich zu unbehandelten Organen, eine erhöhte Zellzahl festgestellt werden: während in den Thymi ohne humane CD34-Zellen nur  $0,45-0,4 \times 10^3$  thymozytenähnliche Zellen gezählt wurden, waren nach 24 Stunden „hanging drops“  $5-6 \times 10^3$  und nach 48 Stunden  $7,5-8 \times 10^3$  Zellen zu finden. FACS-Analysen dieser suspendierten Thymi zeigten, dass sich in der Thymozytenpopulation CD34-positive Zellen befanden. Die erhöhte Zellzahl und der Nachweis CD34-positiver Zellen im FACS wurde als Hinweis dafür gesehen, dass humane haematopoetische Stammzellen in die murinen Thymi eingewandert waren. Dieses Ergebnis konnte dadurch bestätigt werden, dass die humanen Zellen, bevor sie zusammen mit dem murinen Thymus inkubiert wurden, mit dem rotfluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 markiert wurden. FACS-Analysen dieser Ansätze zeigten eine deutliche Rotfluoreszenz in der Thymozytenpopulation, was als weiterer Beweis für das Einwandern der humanen CD34-positiven Zellen gesehen wurde. Dabei war auffällig, dass nach PKH26-Färbung 77% der Zellen in der Thymuspopulation eine Rotfluoreszenz zeigten, während in dem vorangegangenen Experiment nur 55-59% der Thymozyten CD34-positiv waren. Dies ist erstaunlich, da man aufgrund der hohen Reinheit der Präparationen in beiden Versuchen eine vergleichbare Anzahl positiver Zellen erwarten würde. Möglicherweise, kam es bereits während dem Einwandern der humanen Zellen in den murinen Thymus („hanging drop“-Kultur) zu einem Herunterregulieren von CD34 auf der Zelloberfläche.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass haematopoetische Stammzellen in die murinen Thymi einwanderten, sollte untersucht werden, ob eine Differenzierung dieser Zellen stattfinden würde. Dazu wurden die Thymi im Anschluß an das Einwandern der humanen Zellen erneut auf schwimmenden Filtern in Kultur genommen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Organkulturen geerntet und durchflußzytometrisch analysiert. Dabei sollte untersucht werden, ob auf den eingewanderten Zellen nach einigen Tagen CD1a als Marker für einen ersten Differenzierungsschritt zu T-Lymphozyten gefunden werden kann. Dies gelang zu keinem Zeitpunkt nach Einwandern der Zellen. Es fand also keine Differenzierung der humanen Zellen statt. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass der Anteil CD34-positiver Zellen abnahm. Dies könnte möglicherweise

bedeuten, dass die humanen Zellen in den Mausthymi nicht überleben konnten. Um dies zu überprüfen wurden humane Zellen vor dem Einwandern in die Thymi mit dem Membranfarbstoff PKH26 markiert. FACS-Analysen zeigten direkt nach den „hanging drops“ eine deutliche Rotfluoreszenz in der Thymoztenpopulation. Bereits vier Tage nach dem Einwandern der Zellen wiesen jedoch nur noch ca 50% der Zellen in der Thymozytenpopulation den roten Farbstoff auf, während nach weiteren drei Tagen ein fast vollständiger Verlust der rotfluoreszierenden Zellen beobachtet wurde. Daraus wurde geschlossen, dass die eingewanderten humanen Zellen nach einigen Tagen Kultur abstarben.

In einem komplexen System, wie dem der chimären FTOC gibt es viele kritische Komponenten, die dafür verantwortlich sein könnten, dass die in die Mausthymi eingewanderten Zellen nicht differenzieren, sondern wahrscheinlich absterben. Zunächst könnte die Qualität der eingesetzten CD34-positiven Stammzellen eine Rolle spielen. Die ausführlichen Vorversuche zeigten jedoch, dass die aus Nabelschnurblut aufgereinigten Zellen sehr rein waren und außerdem sowohl über Proliferationsfähigkeit als auch über Differenzierungspotential verfügten. Mangelnde Qualität der humanen Zellen kann also als Ursache für die nicht erfolgte Differenzierung ausgeschlossen werden. Auch die für die Organkultur etablierten Kulturbedingungen sind wahrscheinlich nicht für das Absterben der CD34-positiven Zellen verantwortlich, da unter diesen Bedingungen eine Differenzierung der murinen Thymozyten möglich war.

Ein kritischer Schritt in diesem chimären FTOC-System ist die Depletion der murinen Thymozyten durch 2-desoxy-Guanosin. Sollte dieses Zellgift nicht ausreichend aus den Thymi herausgewaschen worden sein, so könnte verbleibendes 2-desoxy-Guanosin dazu führen, dass die eingewanderten humanen Zellen ebenfalls depletiert werden. Sollte dies die Ursache für den Verlust der eingewanderten Zellen sein, so müsste der Waschschrift nach der Behandlung mit 2-deoxy-Guanosin optimiert werden. Es wäre aber auch denkbar, dass die Dosierung des 2-desoxy-Guanosin zu hoch ist. Dies könnte dazu führen, dass durch die Droge neben der Depletion der Thymozyten auch eine nachhaltige Schädigung des Thymusstroma bewirkt wird. Die Schädigung des Stroma könnte sich auf Zytokinproduktion und extrazelluläre Matrix

auswirken, wodurch die Stromazellen möglicherweise nicht mehr in der Lage wären, die für das Überleben und die Differenzierung der humanen Zellen notwendige Mikroumgebung zu schaffen. In zukünftigen Versuchen soll also ermittelt werden, ob es möglich ist, eine niedrigere Konzentration von 2-desoxy-Guanosin einzusetzen um eine eventuelle Schädigung des Thymusstroma auszuschließen. Eine weitere Möglichkeit die Probleme zu umgehen, die mit dem Einsatz von 2-desoxy-Guanosin verbunden sein könnten, ist die Präparation von Thymus aus sogenannten SCID-Mäusen. Da bei diesen immundefizienten Mäusen keine haematopoetischen Stammzellen in den Thymus einwandern, könnte der kritische Schritt der Thymozytendepletion umgangen werden. Derzeit steht unserer Arbeitsgruppe jedoch keine SCID-Zucht zur Verfügung.

Der nächste Schritt im Protokoll für chimäre FTOC, der problematisch sein könnte, ist die Kultur der Organe in den „hanging drops“ (M. Merkschlager, persönliche Kommunikation), da die Thymi zusammen mit den humanen CD34-positiven Zellen in nur 20µl Medium kultiviert werden. Durch Versuche mit Thymuskulturen ohne 2-desoxy-Guanosin-Behandlung konnte gezeigt werden, dass bei erneuter Kultivierung auf Filtern nach der Überkopfkultur, eine normale Differenzierung der murinen Thymozyten stattfand. Aus diesem Grund kann ausgeschlossen werden, dass sich die „hanging drop“-Kultur schädlich auf die Organe auswirkt.

Schließlich wäre es auch denkbar, dass der kritische Faktor in dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen System darin liegt, dass versucht wird, ausschließlich CD34-positive Zellen in den murinen Thymus einwandern zu lassen. Merkschlager und Fisher setzten jeweils die gesamte Lymphozytenpopulation aus Nabelschnurblut ein. Dadurch waren direkt nach dem Einwandern der humanen Zellen Thymozyten in verschiedenen Differenzierungsstadien zu finden (Merkschlager und Fisher 1992a, 1992b, 1993). Thymozyten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien produzieren ein charakteristisches Repertoire an Zytokinen, wodurch eine andere Mikroumgebung entsteht, als wenn man nur CD34-positive Zellen in den Thymus einwandern läßt. Um diesen möglichen Effekt zu untersuchen, wäre es hilfreich zunächst Versuche mit gesamt-PBMC durchzuführen. Sollten diese Ansätze zu einer erfolgreichen T-Zell-Differenzierung führen, würde dies

bedeuten, dass die Kulturbedingungen die für die chimären FTOC etabliert wurden prinzipiell ausreichend sind. Gleichzeitig könnte daraus gefolgert werden, dass die CD34-positiven haematopoetischen Stammzellen zusätzlich stimuliert werden müssten, um eine erfolgreiche Differenzierung zu erreichen. Verhasselt *et al.* publizierten 1999 ein System, in dem CD34-positive Zellen vor dem Einwandern in den Thymus mit TPO (Thrombopoietin), SCF (Stammzellfaktor; engl.: stem cell factor) und flt3/flt2-Ligand stimuliert wurden. Diese in der T-Zell-Differenzierung früh agierenden Zytokine dienten nicht nur zur Expansion der haematopoetischen Stammzellen, sondern erleichterten auch die Repopulation des murinen Thymus. Möglicherweise ist eine derartige Stimulation unumgänglich, wenn ausschließlich CD34-positive Zellen in den chimären FTOC ausdifferenziert werden sollen.

## 5 Zusammenfassung

Das humane Immundefizienzvirus HIV-1 zeichnet sich durch eine hohe Variabilität zwischen den Virusisolaten aus verschiedenen Patienten aus, aber auch durch die Fähigkeit, sich innerhalb eines Patienten im Verlauf der Infektion zu verändern und sogenannte Quasispezies zu bilden. Die genetische Variabilität ist im Hüllprotein von HIV-1 besonders stark ausgeprägt und spiegelt sich im Wirtszelltropismus wider.

Um die Zusammenhänge zwischen genotypischer und phänotypischer Veränderung der vorherrschenden Virusvariante in HIV-1-Patienten näher zu untersuchen, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das env-Gen aus dem Blut HIV-1 infizierter Patienten amplifiziert und charakterisiert. Obwohl alle Patienten unter HAART-Therapie standen, war es möglich, das Gen für das Hüllprotein aus insgesamt sechs Patienten zu klonieren. Bei zwei Patienten (H6, D5) war die env-Klonierung aus sequenziellen Blutproben erfolgreich. Die so erhaltenen rekombinanten HIV-1-Klone wurden zunächst genotypisch charakterisiert. Sequenzanalysen zeigten, dass die V3-Schleife im Vergleich zur V1-V2-Region wenig variabel war. Klone, die aus der selben Blutprobe eines Patienten stammten, wiesen in ihrer Aminosäuresequenz keine, bzw. nur geringe Abweichungen auf. Eine Analyse der Gesamtpopulation zeigte, dass deutliche Sequenzunterschiede zwischen den Klonen der einzelnen Patienten bestehen. Neben Abweichungen in der Aminosäuresequenz zwischen unterschiedlichen Patienten konnten auch Substitutionen in den env-Genen beobachtet werden, die aus sequentiellen Blutproben amplifiziert wurden (Patienten H6, U7 und D5).

Die genetische Variabilität spiegelte sich im Phänotyp der Virusklone wider. Korezeptorstudien mit GHOST-Zellen ergaben, dass ein breites Spektrum an unterschiedlichen Korezeptoren genutzt werden konnte: neben CCR5 nutzenden Viren (G17, G19, 12-6,12-7, K5-4, KN3-2) wurde ein dualtroper (CCR5/CXCR4) Virusklon (B2) gefunden und außerdem Viren (A5, C22, H9, H10, H11), die bis zu neun verschiedene Korezeptoren nutzten. Ferner konnte eine Veränderung der genutzten Korezeptoren bei Klonen festgestellt werden, die aus sequenziellen Blutproben eines Patienten stammten (Patienten H6 und D5). Trotz großer Unterschiede bei den *in vitro* genutzten Korezeptoren, zeigte



die Infektion primärer Zellen keine entsprechenden Differenzen zwischen den Virusklonen. Eine Korrelation zwischen dem Phänotyp der rekombinanten Viren und dem Krankheitsstatus der Patienten war nicht erkennbar.

Eine weitergehende Analyse der Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp der Virusklone zeigte, dass anhand der Information der V3-Sequenz nicht nur wie erwartet zwischen NSI oder SI-Viren unterschieden, sondern darüber hinaus eine Voraussage gemacht werden kann, ob es sich um dual- bzw. multitrope oder reine CXCR4 nutzende SI-Viren handelt. Diese Vorhersagemethode bietet einen wichtigen Aspekt für die HIV-1 Therapie, da sie es dem behandelnden Arzt ermöglicht, auf einfache Weise, Chemokin-Antagonisten zur Hemmung des Viruseintritts in die Zelle gezielt auszuwählen.

Gut charakterisierte rekombinante Virusklone stellen die Basis für verschiedene *in vitro* Infektionsversuche dar. Besonders interessant sind Studien zur Infizierbarkeit von Thymozyten in verschiedenen Differenzierungsstadien von der haematopoetischen Stammzelle zur reifen T-Zelle, um auf diese Weise mehr über die HIV-1-Pathogenese zu lernen. Aus diesem Grund sollte im zweiten Teil der Arbeit versucht werden, ein *in vitro* Differenzierungssystem für T-Zellen zu etablieren.

Vorversuche zeigten, dass das Ausgangsmaterial, CD34-positive haematopoetische Stammzellen, für die Differenzierungsversuche geeignet war. Die Präparation der Zellen aus Nabelschnurblut wies eine hohe Reinheit (95-97%) auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Stammzellen sowohl über die Fähigkeit zur Proliferation als auch zur Differenzierung verfügten.

Der erste Versuch zur T-Zell-Differenzierung wurde in Kokultur mit der Knochenmarkszelllinie L88 durchgeführt. In den Kokulturen konnte die Entwicklung CD14-positiver, makrophagenähnlicher Zellen beobachtet werden. Es kam jedoch nicht zur Differenzierung von reifen T-Zellen.

In einem zweiten Ansatz sollte versucht werden, ein chimäres FTOC-(fetal thymus organ culture)-System zu etablieren. Zunächst wurden die Kulturbedingungen für die fötalen Organe optimiert. Es gelang dann, die murinen Thymozyten aus den Thymi zu depletieren und humane CD34-positive Zellen einwandern zu lassen. Allerdings wurde nach wenigen Tagen chimärer Organkultur ein Verlust der Stammzellen beobachtet. In zukünftigen Experimenten soll ermittelt werden, weshalb es nicht zur Proliferation und

Differenzierung der humanen Zellen kommt, um auf dieser Grundlage die Bedingungen optimieren zu können.

## 6 Literatur

- Alizon, M., S. Wain-Hobson, L. Montagnier, and P. Sonigo (1986). Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from african patients. *Cell* 46:63-74.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, C.C. Broder, Y. Feng, P.E. Kennedy, P.M. Murphy, and E.A. Berger. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 272:1955-8.
- Allen, T.D., and T.M. Dexter. 1984. The essential cells of the hemopoietic microenvironment. *Exp Hematol*. 12:517-21.
- Anderson, R.W. 1997. Mathematical models of HIV pathogenesis. *Nat Med*. 3:936-7.
- Antonioli, I.M., C. Baumberger, S. Yerly, and L. Perrin. 1995. V3 sequences in primary HIV-1 infection. *Aids*. 9:11-7.
- Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*. 226:1209-11.
- Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220:868-71.
- Bentley, S.A. 1982. Bone marrow connective tissue and the haemopoietic microenvironment. *Br J Haematol*. 50:1-6.
- Blom, B., P. Res., E. Noteboom, K. Weijer, L.L. Lanier, H.J. Phillips, and H. Spits (1997). Prethymic CD34<sup>+</sup> progenitors capable of developing into T cells are not committed to the T cell lineage. *J. Immunol*. 158:3571-3577.
- Broder, C.C., and E.A. Berger. 1995. Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of human immunodeficiency virus type 1 tropism for CD4+ T- cell lines vs. primary macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9004-8.
- Bron, R., P.J. Klasse, D. Wilkinson, P.R. Clapham, A. Pelchen-Matthews, C. Power, T.N. Wells, Kim, S.C. Peiper, J.A. Hoxie, and M. Marsh (1997). Promiscuous use of CC and CCX chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by human immunodeficiency virus type 2 envelope protein. *J. Virol*. 71:8405-8415.
- Brown, P.O., B. Bowerman, H.E. Varmus, J.M. and Bishop (1987). Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 49: 347-357.
- Brun-Vezinet, F., C. Rouzioux, L. Montagnier, S. Chamaret, J. Gruest, F. Barre-Sinoussi, D. Geroldi, J.C. Chermann, J. McCormick, S. Mitchell, and et al. 1984. Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. *Science*. 226:453-6.
- Bushman, F.D., T. Fujiwara, and R. Craigie. 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science*. 249:1555-8.
- Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med*. 184:695-706.

- Cecilia, D., V.N. KewalRamani, J. O'Leary, B. Volsky, P. Nyambi, S. Burda, S. Xu, D.R. Littman, and S. Zolla-Pazner. 1998. Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage. *J Virol.* 72:6988-96.
- Chan, D.C., D. Fass, J.M. Berger, and P.S. Kim. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* 89:263-73.
- Chang, D.K., S.F. Cheng, and V.D. Trivedi. 1999. Biophysical characterization of the structure of the amino-terminal region of gp41 of HIV-1. Implications on viral fusion mechanism. *J Biol Chem.* 274:5299-309.
- Chen, S.S., S.F. Lee, and C.T. Wang. 2001. Cellular membrane-binding ability of the C-terminal cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane protein gp41. *J Virol.* 75:9925-38.
- Cheng-Mayer, C., M. Qoirroga, J.W. Tung, D. Dina, and J.A. Levy (1990). Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophage tropism, cytopathology, and CD4 antigen modulation. *J. Virol.* 64:4390-4398.
- Cheng-Mayer, C., R. Liu, N.R. Landau, and L. Stamatatos (1997). Macrophage tropism of human immunodeficiency virus, type 1 and utilization of the CC-CKR5 coreceptor. *J.Virol.* 71: 1657-1661.
- Chesnut, R.W., and H.M. Grey. 1986. Antigen presentation by B cells and its significance in T-B interactions. *Adv Immunol.* 39:51-94.
- Cho, M.W., M.K. Lee, M.C. Carney, J.F. Berson, R.W. Doms, M.A. and Martin (1998). Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. *J. Virol.* 72:2509-2525.
- Choe, H. 1998. Chemokine receptors in HIV-1 and SIV infection. *Arch Pharm Res.* 21:634-9.
- Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P.D. Ponath, L. Wu, C.R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* 85:1135-48.
- Choe, W., A. Albright, J. Sulcove, S. Jaffer, J. Hesselgesser, E. Lavi, P. Crino, and D.L. Kolson. 2000. Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol.* 6 Suppl 1:S61-9.
- Clapham, P.R., D. Blanc, and R.A. Weiss. 1991. Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus. *Virology.* 181:703-15.
- Clark, D.R., R.J. de Boer, K.C. Wolthers, and F. Miedema. 1999. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Adv Immunol.* 73:301-27.
- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M.A. Rey, M.O. Santos-Ferreira, A.G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al. 1986a. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science.* 233:343-6.
- Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier, and M. Alizon. 1986b. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature.* 324:691-5.
- Clerici, M., M.I. Stocks, R.A. Zajac, R.N. Boswell, D.C. Bernstein, D.L. Mann, G.M. Shearer, and J.A. Berofsky (1989). Interleukin-2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from asymptomatic HIV-seropositive individuals. *Nature* 339:383-385.

- Clerici, M., J.A. Berzofsky, G.M. Shearer, and C.O. Tacket. 1991a. Exposure to human immunodeficiency virus (HIV) type I indicated by HIV- specific T helper cell responses before detection of infection by polymerase chain reaction and serum antibodies [corrected]. *J Infect Dis.* 164:178-82.
- Clerici, M., D.R. Lucey, R.A. Zajac, R.N. Boswell, H.M. Gebel, H. Takahashi, J.A. Berzofsky, and G.M. Shearer. 1991b. Detection of cytotoxic T lymphocytes specific for synthetic peptides of gp160 in HIV-seropositive individuals. *J Immunol.* 146:2214-9.
- Coffin, J., A. Haase, J.A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al. 1986. What to call the AIDS virus? *Nature.* 321:10.
- Coffin, J.M., Huges, S.H. & Varmus, H.E. (1997). *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Collin, M., P. Illei, W. James, and S. Gordon. 1994. Definition of the range and distribution of human immunodeficiency virus macrophage tropism using PCR-based infectivity measurements. *J Gen Virol.* 75:1597-603.
- Collman, R. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 tropism for human macrophages. *Pathobiology.* 60:213-8.
- Collman, R., N.F. Hassan, R. Walker, B. Godfrey, J. Cutilli, J.C. Hastings, H. Friedman, S.D. Douglas, and N. Nathanson. 1989. Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types. *J Exp Med.* 170:1149-63.
- Combadiere, C., K. Salzwedel, E.D. Smith, H.L. Tiffany, E.A. Berger, and P.M. Murphy. 1998. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 273:23799-804.
- Connor, R.I., K.E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe, and N.R. Landau. 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med.* 185:621-8.
- Dalglish, A.G., P.C. Beverley, P.R. Clapham, D.H. Crawford, M.F. Greaves, and R.A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 312:763-7.
- De Jong, J.J., A. De Ronde, W. Keulen, M. Tersmette, and J. Goudsmit. 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol.* 66:6777-80.
- Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G.A. Huttley, M.W. Smith, R. Allikmets, J.J. Goedert, S.P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, and S.J. O'Brien. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science.* 273:1856-62.
- Decroly, E., S. Wouters, C. Di Bello, C. Lazure, J.M. Ruyschaert, and N.G. Seidah. 1996. Identification of the paired basic convertases implicated in HIV gp160 processing based on in vitro assays and expression in CD4(+) cell lines. *J Biol Chem.* 271:30442-50.
- Del Porto, P., L. Bruno, M.G. Mattei, H. von Boehemer, and C. Saint-Ruf (1995). Cloning and comparative analysis of the human pre-T-cell receptor  $\alpha$ -chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:12105-12109.

- Delwart, E.L., G.L. Buchsacher, Jr., E.O. Freed, and A.T. Panganiban. 1992. Analysis of HIV-1 envelope mutants and pseudotyping of replication- defective HIV-1 vectors by genetic complementation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 8:1669-77.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R.E. Sutton, C.M. Hill, C.B. Davis, S.C. Peiper, T.J. Schall, D.R. Littman, and N.R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 381:661-6.
- Deng, H.K., D. Unutmaz, V.N. Kewal-Ramani, and D.R. Littman (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses, *Nature* 388:296-300.
- Dittmar, M.T., G. Simmons, Y. Donaldson, P. Simmonds, P.R. Clapham, T.F. Schulz, and R.A. Weiss. 1997. Biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 clones derived from different organs of an AIDS patient by long-range PCR. *J Virol*. 71:5140-7.
- Dittmar, M.T., S. Eichler, S. Reinberger, L. Henning, and H.-G. Kräusslich (2001). A recombinant virus assay using full length envelope sequences to detect changes in HIV-1 coreceptor usage. *Virus Genes* 23: 281-290.
- Donaldson, Y.K., J.E. Bell, E.C. Holmes, E.S. Hughes, H.K. Brown, and P. Simmonds. 1994. In vivo distribution and cytopathology of variants of human immunodeficiency virus type 1 showing restricted sequence variability in the V3 loop. *J Virol*. 68:5991-6005.
- Doranz, B.J., J. Rucker, Y. Yi, R.J. Smyth, M. Samson, S.C. Peiper, M. Parmentier, R.G. Collman, and R.W. Doms. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta- chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 85:1149-58.
- Dragic, T., V. Litwin, G.P. Allaway, S.R. Martin, Y. Huang, K.A. Nagashima, C. Cayanan, P.J. Maddon, R.A. Koup, J.P. Moore, and W.A. Paxton. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC- CKR-5. *Nature*. 381:667-73.
- D'Souza, M.P., J.S. Cairns, and S.F. Plaeger. 2000. Current evidence and future directions for targeting HIV entry: therapeutic and prophylactic strategies. *Jama*. 284:215-22.
- Ebenbichler, C., P. Westervelt, A. Carrillo, T. Henkel, D. Johnson, and L. Ratner. 1993. Structure-function relationships of the HIV-1 envelope V3 loop tropism determinant: evidence for two distinct conformations. *Aids*. 7:639-46.
- Eckert, D.M., V.N. Malashkevich, L.H. Hong, P.A. Carr, and P.S. Kim. 1999. Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell*. 99:103-15.
- Edinger, A.L., J.E. Clements, and R.W. Doms. 1999. Chemokine and orphan receptors in HIV-2 and SIV tropism and pathogenesis. *Virology*. 260:211-21.
- Etemad-Moghadam, B., D. Rhone, T. Steenbeke, Y. Sun, J. Manola, R. Gelman, J.W. Fanton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M.K. Axthelm, N.L. Letvin, and J. Sodroski. 2001. Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD+ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *J Virol*. 75:5646-55.
- Etemad-Moghadam, B., Y. Sun, E.K. Nicholson, M. Fernandes, K. Liou, R. Gomila, J. Lee, and J. Sodroski. 2000. Envelope glycoprotein determinants of increased fusogenicity in a pathogenic simian-human immunodeficiency virus (SHIV-KB9) passaged in vivo. *J Virol*. 74:4433-40.
- Farzan, M., H. Choe, K. Martin, L. Marcon, W. Hofmann, G. Karlsson, Y. Sun, P. Barrett, N. Marchand, N. Sullivan, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1997. Two orphan

- seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med.* 186:405-11.
- Feng, Y., C.C. Broder, P.E. Kennedy, and E.A. Berger. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 272:872-7.
- Fibbe, W.E., J. van Damme, A. Billiau, H.M. Goselink, P.J. Voogt, G. van Eeden, P. Ralph, B.W. Altrock, and J.H. Falkenburg. 1988. Interleukin 1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 71:430-5.
- Fisher, A.G., L. Larsson, L.K. Goff, D.E. Restall, L. Happerfield, and M. Merckenschlager. 1990. Human thymocyte development in mouse organ cultures. *Int Immunol.* 2:571-8.
- Fleury, S., R.J. de Boer, G.P. Rizzardì, K.C. Wolthers, S.A. Otto, C.C. Welbon, C. Graziosi, C. Knabenhans, H. Soudeyns, P.A. Bart, S. Gallant, J.M. Corpataux, M. Gillet, P. Meylan, P. Schnyder, J.Y. Meuwly, W. Spreen, M.P. Glauser, F. Miedema, and G. Pantaleo. 1998. Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat Med.* 4:794-801.
- Franke, E.K., H.E. Yuan, and J. Luban. 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature.* 372:359-62.
- Frankel, A.D., and J.A. Young. 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem.* 67:1-25.
- Fung, M.S., C.R. Sun, W.L. Gordon, R.S. Liou, T.W. Chang, W.N. Sun, E.S. Daar, and D.D. Ho. 1992. Identification and characterization of a neutralization site within the second variable region of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol.* 66:848-56.
- Gabuzda, D.H., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W.A. Haseltine, and J. Sodroski. 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol.* 66:6489-95.
- Gallaher, W.R. (1987). Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* 50:327-328.
- Galy, A., M. Travis, D. Cen, and B. Chen. 1995. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity.* 3:459-73.
- Gartner, S., P. Markovits, D.M. Markovitz, R.F. Betts, and M. Popovic. 1986. Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS. *Jama.* 256:2365-71.
- Gaulton, G.N., J.V. Scobie, and M. Rosenzweig. 1997. HIV-1 and the thymus. *Aids.* 11:403-14.
- Gelderblom, H.R. 1991. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids.* 5:617-37.
- Gelderblom, H.R., E.H. Hausmann, M. Ozel, G. Pauli, and M.A. Koch. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology.* 156:171-6.
- Gelderblom, H.R. (1991) Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure and viral funktion. *Aids* 5: 617-638.
- Glushakova, S., B. Baibakov, L.B. Margolis, and J. Zimmerberg. 1995. Infection of human tonsil histocultures: a model for HIV pathogenesis. *Nat Med.* 1:1320-2.
- Glushakova, S., B. Baibakov, J. Zimmerberg, and L.B. Margolis. 1997. Experimental HIV infection of human lymphoid tissue: correlation of CD4+ T cell depletion and virus

- syncytium-inducing/non-syncytium-inducing phenotype in histocultures inoculated with laboratory strains and patient isolates of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 13:461-71.
- Glushakova, S., J.C. Grivel, W. Fitzgerald, A. Sylwester, J. Zimmerberg, and L.B. Margolis. 1998. Evidence for the HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency. *Nat Med*. 4:346-9.
- Gonda, M.A., F. Wong-Staal, R.C. Gallo, J.E. Clements, and R.V. Gilden. 1985a. Heteroduplex mapping in the molecular analysis of the human T-cell leukemia (lymphotropic) viruses. *Cancer Res*. 45:4553s-4558s.
- Gonda, M.A., F. Wong-Staal, R.C. Gallo, J.E. Clements, O. Narayan, and R.V. Gilden. 1985b. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science*. 227:173-7.
- Gottlieb, M.S., R. Schroff, H.M. Schanker, J.D. Weisman, P.T. Fan, R.A. Wolf, and A. Saxon. 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 305:1425-31.
- Grimaila, R.J., B.A. Fuller, P.D. Rennert, M.B. Nelson, M.L. Hammarskjold, B. Potts, M. Murray, S.D. Putney, and G. Gray. 1992. Mutations in the principal neutralization determinant of human immunodeficiency virus type 1 affect syncytium formation, virus infectivity, growth kinetics, and neutralization. *J Virol*. 66:1875-83.
- Grivel, J.C., M.L. Penn, D.A. Eckstein, B. Schramm, R.F. Speck, N.W. Abbey, B. Herndier, L. Margolis, and M.A. Goldsmith. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor preferences determine target T-cell depletion and cellular tropism in human lymphoid tissue. *J Virol*. 74:5347-51.
- Günthadt, H.F., S.D.W. Frost, A.J. Leigh-Brown, C.C. Ignacio, K. Kee, A.S., Perelson, C. A. Spina, D.V. Havlir, M. Hezareh, D.J. Looney, D.D. Richman, and J.K. Wong (1999). Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy. *J. Virol*. 73:9404-9412.
- Guillon, C., M.E. van der Ende, P.H. Boers, R.A. Gruters, M. Schutten, and A.D. Osterhaus. 1998. Coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 2 primary isolates and biological clones is broad and does not correlate with their syncytium-inducing capacities. *J Virol*. 72:6260-3.
- Haigwood, N.L., J.R. Shuster, G.K. Moore, H. Lee, P.V. Skiles, K.W. Higgins, P.K. Barr, C.G. Nascimento, and K.S. Steimer (1990). Importance of hypervariable regions of HIV-1 gp120 in the generation of virus neutralizing antibodies. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6 :855-869.
- Heemskerk, M.H.M., B. Blom, G. Nolan, A.P.A. Stegmann, A.Q. Bakker, K. Weijer, P.C.M. Res, P.C.M. and H. Spits (1997). Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *J. Exp. Med*. 186:1597-1602.
- Heeney, J.L. 1995. AIDS: a disease of impaired Th-cell renewal? *Immunol Today*. 16:515-20.
- Hellerstein, M., M.B. Hanley, D. Cesar, S. Siler, C. Papageorgopoulos, E. Wieder, D. Schmidt, R. Hoh, R. Neese, D. Macallan, S. Deeks, and J.M. McCune. 1999. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med*. 5:83-9.
- Ho, D.D., T.R. Rota, and M.S. Hirsch (1986). Infection of monocyte/macrophages by human T-lymphotropic virus type III. *J. Clin. Invest*. 77:1712-1715.



- Hunter, E. (1997). gp41, a multifunctional protein involved in HIV entry and pathogenesis. In Korber B., Foley, B., Leitner, T., McCutchan, F., Hahn, B., Mellors J.W., Myers, G., and Kuiken C. (ed). Human Retroviruses and AIDS. A Compilation and analysis of Nucleic Acid and Amino Acid sequences, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico.
- Ibanez, A., B. Clotet, M.A. Martinez (2000). Human immunodeficiency virus type 1 population bottleneck during indinavir therapy causes a genetic drift in the env quasispecies. *J. Gen. Virol.* 81:85-95
- Iwatani, Y., T. Ueno, A. Nishimura, X. Zhang, T. Hattori, A. Ishimoto, M. Ito, and H. Sakai. 2001. Modification of virus infectivity by cytoplasmic tail of HIV-1 TM protein. *Virus Res.* 74:75-87.
- Jacks, T. 1990. Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons. *Curr Top Microbiol Immunol.* 157:93-124.
- Jenkinson, E.J., and J.J. Owen. 1990. T-cell differentiation in thymus organ cultures. *Semin Immunol.* 2:51-8.
- Kanbe, K., N. Shimizu, Y. Soda, K. Takagishi, and H. Hoshino. 1999. A CXC chemokine receptor, CXCR5/BLR1, is a novel and specific coreceptor for human immunodeficiency virus type 2. *Virology.* 265:264-73.
- Kao, S.Y., A.F. Calman, P.A. Luciw, and B.M. Peterlin. 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature.* 330:489-93.
- Karita, E., J.N. Nkengasong, B. Willems, G. Vanham, K. Fransen, L. Heyndrickx, W. Janssens, P. Piot, and G. van der Groen. 1997. Macrophage-tropism of HIV-1 isolates of different genetic subtypes. *Aids.* 11:1303-4.
- Kaushansky, K., N. Lin, and J.W. Adamson. 1988. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte- macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation. *J Clin Invest.* 81:92-7.
- Kilby, J.M., S. Hopkins, T.M. Venetta, B. DiMassimo, G.A. Cloud, J.Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M.R. Johnson, M.A. Nowak, G.M. Shaw, and M.S. Saag. 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med.* 4:1302-7.
- Klatzmann, D., F. Barre-Sinoussi, M.T. Nugeyre, C. Danquet, E. Vilmer, C. Griscelli, F. Brun-Veziret, C. Rouzioux, J.C. Gluckman, J.C. Chermann, and et al. 1984a. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper- inducer T lymphocytes. *Science.* 225:59-63.
- Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J.C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984b. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* 312:767-8.
- Koenig, S., H.E. Gendelman, J.M. Orenstein, M.C. Dal Canto, G.H. Pezeshkpour, M. Yungbluth, F. Janotta, A. Aksamit, M.A. Martin, and A.S. Fauci. 1986. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science.* 233:1089-93.
- Koot, M., P.T. Schellekens, J.W. Mulder, J.M. Lange, M.T. Roos, R.A. Coutinho, M. Tersmette, and F. Miedema. 1993. Viral phenotype and T cell reactivity in human immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic men treated with zidovudine. *J Infect Dis.* 168:733-6.
- Kourtis, A.P., C. Ibegbu, A.J. Nahmias, F.K. Lee, W.S. Clark, M.K. Sawyer, and S. Nesheim. 1996. Early progression of disease in HIV-infected infants with thymus dysfunction. *N Engl J Med.* 335:1431-6.

- Kowalsky, M., J. Potz, L. Basiripour, T. Dorfman, W.C. Goh, E. Trwilliger, A. Dayton, C. Rosen, W. Haseltine, and J. Sodroski (1987). Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 237:1351-1355.
- Kusumi, K., B. Conway, S. Cunningham, A. Berson, C. Evans, A.K. Iversen, D. Colvin, M.V. Gallo, S. Coutre, E.G. Shpaer, and et al. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 envelope gene structure and diversity in vivo and after cocultivation in vitro. *J Virol.* 66:875-85.
- Kwong, P.D., R. Wyatt, J. Robinson, R.W. Sweet, J. Sodroski, and W.A. Hendrickson. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 393:648-59.
- Lasky, L.A., G. Nakamura, D.H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, and D.J. Capon. 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell.* 50:975-85.
- Laurent-Crawford, A.G., B. Krust, S. Muller, Y. Riviere, M.A. Rey-Cuille, J.M. Bechet, L. Montagnier, and A.G. Hovanessian. 1991. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology.* 185:829-39.
- Leis, J., D. Baltimore, J.M. Bishop, J. Coffin, E. Fleissner, S.P. Goff, S. Oroszlan, H. Robinson, A.M. Skalka, H.M. Temin, and et al. 1988. Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol.* 62:1808-9.
- Levy, J.A., A.D. Hoffman, S.M. Kramer, J.A. Landis, J.M. Shimabukuro, and L.S. Oshiro. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.* 225:840-2.
- Li, S., J. Juarez, M. Alali, D. Dwyer, R. Collman, A. Cunningham, and H.M. Naif. 1999. Persistent CCR5 utilization and enhanced macrophage tropism by primary blood human immunodeficiency virus type 1 isolates from advanced stages of disease and comparison to tissue-derived isolates. *J Virol.* 73:9741-55.
- Liao, F., G. Alkhatib, K.W. Peden, G. Sharma, E.A. Berger, and J.M. Farber. 1997. STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med.* 185:2015-23.
- Liesveld, J.L., J.M. Winslow, M.C. Kempfski, D.H. Ryan, J.K. Brennan, and C.N. Abboud. 1991. Adhesive interactions of normal and leukemic human CD34+ myeloid progenitors: role of marrow stromal, fibroblast, and cytomatrix components. *Exp Hematol.* 19:63-70.
- Little, S.J., N.L. Riggs, M.Y. Chowder, N.J. Fitch, D.D. Richman, C.A. Spina, and J.C. Guatelli (1994). Cell surface CD4 downregulation and resistance to superinfection induced by a defective provirus of HIV-1. *Virology* 205:578-582.
- Luban, J., K.L. Bossolt, E.K. Franke, G.V. Kalpana, and S.P. Goff. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell.* 73:1067-78.
- Luciew, P.A. (1996). Human immunodeficiency viruses and their replication. *Fields Virology* 1881-1951.
- Lusso, P. 2000. Chemokines and viruses: the dearest enemies. *Virology.* 273:228-40.
- Mack, M., B. Luckow, P.J. Nelson, J. Cihak, G. Simmons, P.R. Clapham, N. Signoret, M. Marsh, M. Stangassinger, F. Borlat, T.N. Wells, D. Schlondorff, and A.E. Proudfoot. 1998. Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med.* 187:1215-24.

- Maddon, P.J., A.G. Dalgleish, J.S. McDougal, P.R. Clapham, R.A. Weiss, and R. Axel. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 47:333-48.
- Malim, M.H., S. Bohnlein, J. Hauber, and B.R. Cullen. 1989a. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell*. 58:205-14.
- Malim, M.H., J. Hauber, S.Y. Le, J.V. Maizel, and B.R. Cullen. 1989b. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*. 338:254-7.
- Mandel, T.E., and M.M. Kennedy (1978). The differentiation of murine thymocytes *in vivo* and *in vitro*. *Immunology* 35:317.
- Martinez, C.E., A.C. Jaleco, P. Res, E. Noteboom, K. Weijer, and H. Spits (1998). Characterization of CD34<sup>+</sup> thymic stromal cells located in the subcapsular cortex of the human thymus. *Exp. Haematol*. 26:588-596.
- Masur, H., M.A. Michelis, J.B. Greene, I. Onorato, R.A. Stouwe, R.S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H.W. Murray, and S. Cunningham-Rundles. 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med*. 305:1431-8.
- McCune, J.M., L.B. Rabin, M.B. Feinberg, M. Lieberman, J.C. Kosek, G.R. Reyes, and I.L. Weissman. 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell*. 53:55-67.
- McKeating, J.A., J. Gow, J. Goudsmit, L.H. Pearl, C. Mulder, and R.A. Weiss. 1989. Characterization of HIV-1 neutralization escape mutants. *Aids*. 3:777-84.
- McKnight, A., M.T. Dittmar, J. Moniz-Periera, K. Ariyoshi, J.D. Reeves, S. Hibbitts, D. Whitby, E. Aarons, A.E. Proudfoot, H. Whittle, and P.R. Clapham. 1998. A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4. *J Virol*. 72:4065-71.
- Merkenschlager, M., and A.G. Fisher. 1992a. Human postnatal thymocytes generate phenotypically immature CD3dim, CD5dim, CD1abright progeny in organ culture. *J Immunol*. 148:1012-5.
- Merkenschlager, M., and A.G. Fisher. 1992b. Selective manipulation of the human T-cell receptor repertoire expressed by thymocytes in organ culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:4255-9.
- Merkenschlager, M., and A.G. Fisher. 1993. T cell development: new approaches. *Leukemia*. 7 Suppl 2:S40-4.
- Modrow, S., B.H. Hahn, G.M. Shaw, R.C. Gallo, F. Wong-Staal, and H. Wolf. 1987. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol*. 61:570-8.
- Moore, J.P., and P.L. Nara. 1991. The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection. *Aids*. 5:S21-33.
- Muesing, M.A., D.H. Smith, C.D. Cabradilla, C.V. Benton, L.A. Lasky, and D.J. Capon. 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*. 313:450-8.
- Muesing, M.A., D.H. Smith, and D.J. Capon. 1987. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans- activator protein. *Cell*. 48:691-701.

- Mullis, K.B., and F.A. Faloon. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- Naif, H.M., S. Li, M. Alali, A. Sloane, L. Wu, M. Kelly, G. Lynch, A. Lloyd, and A.L. Cunningham. 1998. CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 72:830-6.
- Nicholson, J.K., G.D. Cross, C.S. Calaway, and J.S. McDougal (1986). In vitro infection of human monocytes with human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV). *J. Immunol.* 137:323-329.
- Nygren, A., T. Bergman, T. Matthews, H. Jornvall, and H. Wigzell. 1988. 95- and 25-kDa fragments of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 bind to the CD4 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6543-6.
- Olshevsky, U., E. Helseth, C. Furman, J. Li, W. Haseltine, and J. Sodroski. 1990. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J Virol.* 64:5701-7.
- Owen, R.L. 1998. M cells as portals of entry for HIV. *Pathobiology.* 66:141-4.
- Palmer, C., P. Balfe, D. Fox, J.C. May, R. Frederiksson, E.M. Fenyo, and J.A. McKeating. 1996. Functional characterization of the V1V2 region of human immunodeficiency virus type 1. *Virology.* 220:436-49.
- Papiernik, M., Y. Brossard, N. Mulliez, J. Roume, C. Brechot, F. Barin, A. Goudeau, J.F. Bach, C. Griscelli, R. Henrion, and et al. 1992. Thymic abnormalities in fetuses aborted from human immunodeficiency virus type 1 seropositive women. *Pediatrics.* 89:297-301.
- Park, E.J., L.K. Vujcic, R. Anand, T.S. Theodore, and G.V. Quinnan, Jr. 1998. Mutations in both gp120 and gp41 are responsible for the broad neutralization resistance of variant human immunodeficiency virus type 1 MN to antibodies directed at V3 and non-V3 epitopes. *J Virol.* 72:7099-107.
- Parren, P.W., J.P. Moore, D.R. Burton, and Q.J. Sattentau. 1999. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *Aids.* 13:S137-62.
- Paxton, W.A., T. Dragic, R.A. Koup, and J.P. Moore. 1996. The beta-chemokines, HIV type 1 second receptors, and exposed uninfected persons. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 12:1203-7.
- Penn, M.L., J.C. Grivel, B. Schramm, M.A. Goldsmith, and L. Margolis. 1999. CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD4+ T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:663-8.
- Perez, L.G., M.A. O'Donnell, and E.B. Stephens. 1992. 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.
- Pleskoff, O., C. Treboute, A. Brelot, N. Heveker, M. Seman, and M. Alizon. 1997. Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science.* 276:1874-8.
- Pohlmann, S., M. Krumbiegel, and F. Kirchhoff. 1999. Coreceptor usage of BOB/GPR15 and Bonzo/STRL33 by primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol.* 80:1241-51.
- Poignard, P., E.O. Saphire, P.W. Parren, and D.R. Burton. 2001. gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol.* 19:253-74.

- Polzer, S., M.T. Dittmar, H. Schmitz, B. Meyer, H. Müller, H.-G. Kräusslich, and M. Schreiber (2001). Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp 120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology* 11:11-19.
- Pope, M., M.G. Betjes, N. Romani, H. Hirmand, P.U. Cameron, L. Hoffman, S. Gezelter, G. Schuler, and R.M. Steinman. 1994. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell*. 78:389-98.
- Popovic, M., M.G. Sarngadharan, E. Read, and R.C. Gallo. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. 224:497-500.
- Posner, M.R., T. Hideshima, T. Cannon, M. Mukherjee, K.H. Mayer, and R.A. Byrn. 1991. An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/GP120, inhibits virus binding to cells, and neutralizes infection. *J Immunol*. 146:4325-32.
- Preston, B.D., B.J. Poiesz, and L.A. Loeb. 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. 242:1168-71.
- Ramarli, D., S. Reina, M. Merola, M.T. Scupoli, O. Poffe, A.P. Riviera, M. Brentegani, E. Fiorini, A. Vella, O. Varnier, and G. Tridente. 1996. HTLV type IIIB infection of human thymic epithelial cells: viral expression correlates with the induction of NF-kappa B-binding activity in cells activated by cell adhesion. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 12:1217-25.
- Ramiro, A.R., C. Trigueros, C. Marquez, J.L. San Millan, and M.L. Toribio. 1996. Regulation of pre-T cell receptor (pT alpha-TCR beta) gene expression during human thymic development. *J Exp Med*. 184:519-30.
- Reinberger, S., M. Spring, T. Nisslein, C. Stahl-Hennig, G. Hunsmann, and U. Dittmer. 1999. Kinetics of lymphocyte apoptosis in macaques infected with different simian immunodeficiency viruses or simian/human immunodeficiency hybrid viruses. *Clin Immunol*. 90:141-6.
- Res, P., E. Martinez-Caceres, A. Cristina Jaleco, F. Staal, E. Noteboom, K. Weijer, and H. Spits. 1996. CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood*. 87:5196-206.
- Reeves, J.D., A. McKnight, S. Potemps, G. Simmons, P.W. Gray, T. Wells, R.A. Weiss, and S.J. Talbot (1997). CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7-transmembrane receptors CXCR4, CCR3 and V28 for entry. *Virology* 231: 7795-7804.
- Richman, D.D., and S.A. Bozzette. 1994. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis*. 169:968-74.
- Roberts, J.D., K. Bebenek, and T.A. Kunkel. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 242:1171-3.
- Rosen, C.A., and G.N. Pavlakis. 1990. Tat and Rev: positive regulators of HIV gene expression. *Aids*. 4:499-509.
- Rosenzweig, M., D.P. Clark, and G.N. Gaulton. 1993. Selective thymocyte depletion in neonatal HIV-1 thymic infection. *Aids*. 7:1601-5.
- Rucker, J., A.L. Edinger, M. Sharron, M. Samson, B. Lee, J.F. Berson, Y. Yi, B. Margulies, R.G. Collman, B.J. Doranz, M. Parmentier, and R.W. Doms. 1997. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus- encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol*. 71:8999-9007.
- Samson, M., A.L. Edinger, P. Stordeur, J. Rucker, V. Verhasselt, M. Sharron, C. Govaerts, C. Mollereau, G. Vassart, R.W. Doms, and M. Parmentier. 1998. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte- derived dendritic cells and

- macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol.* 28:1689-700.
- Samson, M., F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C.M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R.J. Smyth, R.G. Collman, R.W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 382:722-5.
- Sanchez, M.J., M.O. Muench, M.G. Roncarolo, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1994. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med.* 180:569-76.
- Sattentau, Q.J., and R.A. Weiss. 1988. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell.* 52:631-3.
- Schnittman S.M., K.H. Singer, I.J. Greenhouse (1991). Thymic microenvironment induces HIV expression. *J. Immunol.* 147:2553-2558.
- Schols, D., and E. De Clercq. 1998. The simian immunodeficiency virus mnd(GB-1) strain uses CXCR4, not CCR5, as coreceptor for entry in human cells. *J Gen Virol.* 79:2203-5.
- Schols, D., S. Struyf, J. Van Damme, J.A. Este, G. Henson, and E. De Clercq. 1997. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med.* 186:1383-8.
- Schroff, R.W., M.S. Gottlieb, H.E. Prince, L.L. Chai, and J.L. Fahey. 1983. Immunological studies of homosexual men with immunodeficiency and Kaposi's sarcoma. *Clin Immunol Immunopathol.* 27:300-14.
- Schuitmaker, H., M. Koot, N.A. Kootstra, M.W. Dercksen, R.E. de Goede, R.P. van Steenwijk, J.M. Lange, J.K. Schattenkerk, F. Miedema, and M. Tersmette. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol.* 66:1354-60.
- Shaw, G.M., B.H. Hahn, S.K. Arya, J.E. Groopman, R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1984. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science.* 226:1165-71.
- Shimizu, N., Y. Soda, K. Kanbe, H.Y. Liu, A. Jinno, T. Kitamura, H. Hoshino (1999). An orphan G protein-coupled receptor, GPR1, acts as a coreceptor to allow replication of human immunodeficiency virus type 1 and 2 in brain-derived cells. *J. Virol.* 73:5231-5239.
- Shimizu, N., Y. Soda, K. Kanbe, H.Y. Liu, R. Mukai, T. Kitamura, H. Hoshino (2000). A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 74:619-626.
- Shioda, T., J.A. Levy, and C. Cheng-Mayer. 1992. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:9434-8.
- Simmonds, P. 1990. Variation in HIV virus load of individuals at different stages in infection: possible relationship with risk of transmission. *Aids.* 4:S77-83.
- Simmons, G., P.R. Clapham, L. Picard, R.E. Offord, M.M. Rosenkilde, T.W. Schwartz, R. Buser, T.N. Wells, and A.E. Proudfoot. 1997. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science.* 276:276-9.
- Simmons, G., J.D. Reeves, A. McKnight, N. Dejucq, S. Hibbitts, C.A. Power, E. Aarons, D. Schols, E. De Clercq, A.E. Proudfoot, and P.R. Clapham. 1998. CXCR4 as a functional

- coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *J Virol.* 72:8453-7.
- Simmons, G., D. Wilkinson, J.D. Reeves, M.T. Dittmar, S. Beddows, J. Weber, G. Carnegie, U. Desselberger, P.W. Gray, R.A. Weiss, and P.R. Clapham. 1996. Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J Virol.* 70:8355-60.
- Sol, N., C. Treboute, E. Gomas, F. Ferchal, B. Shacklett, and M. Alizon. 1998. The rhesus macaque CCR3 chemokine receptor is a cell entry cofactor for HIV-2, but not for HIV-1. *Virology.* 240:213-20.
- Sonza, S., S.H. Burgess, and S.M. Crowe. 1991. Direct quantification of HIV-1 infectivity for monocyte--macrophages using an infectious focus assay. *Aids.* 5:571-4.
- Speck, R.F., K. Wehrly, E.J. Platt, R.E. Atchison, I.F. Charo, D. Kabat, B. Chesebro, and M.A. Goldsmith. 1997. Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J Virol.* 71:7136-9.
- Starcich, B.R., B.H. Hahn, G.M. Shaw, P.D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E.S. Parks, W.P. Parks, S.F. Josephs, R.C. Gallo, and et al. 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell.* 45:637-48.
- Su, L., H. Kaneshima, M. Bonyhadi, S. Salimi, D. Kraft, L. Rabin, and J.M. McCune. 1995. HIV-1-induced thymocyte depletion is associated with indirect cytopathogenicity and infection of progenitor cells in vivo. *Immunity.* 2:25-36.
- Tersmette, M., R.E. de Goede, B.J. Al, I.N. Winkel, R.A. Gruters, H.T. Cuypers, H.G. Huisman, and F. Miedema. 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol.* 62:2026-32.
- Tersmette, M., R.A. Gruters, F. de Wolf, R.E. de Goede, J.M. Lange, P.T. Schellekens, J. Goudsmit, H.G. Huisman, and F. Miedema. 1989a. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol.* 63:2118-25.
- Tersmette, M., J.M. Lange, R.E. de Goede, F. de Wolf, J.K. Eeftink-Schattenkerk, P.T. Schellekens, R.A. Coutinho, J.G. Huisman, J. Goudsmit, and F. Miedema. 1989b. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet.* 1:983-5.
- Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C.T. Walsh, J. Sodroski, and H.G. Gottlinger. 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature.* 372:363-5.
- Thali, M., J.P. Moore, C. Furman, M. Charles, D.D. Ho, J. Robinson, and J. Sodroski. 1993. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol.* 67:3978-88.
- Thalmeier, K., P. Meissner, G. Reisbach, M. Falk, A. Brechtel, and P. Dormer. 1994. Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. *Blood.* 83:1799-807.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-82.

- Tokunaga, K., M.L. Greenberg, M.A. Morse, R.I. Cumming, H.K. Lyerly, and B.R. Cullen. 2001. Molecular basis for cell tropism of CXCR4-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol.* 75:6776-85.
- Valentin, A., K. Nilsson, and B. Asjo. 1994. Tropism for primary monocytes and for monocytoid cell lines are separate features of HIV-1 variants. *J Leukoc Biol.* 56:225-9.
- Valentin, A., H. Trivedi, W. Lu, L.G. Kostrikis, and G.N. Pavlakis. 2000. CXCR4 mediates entry and productive infection of syncytia-inducing (X4) HIV-1 strains in primary macrophages. *Virology.* 269:294-304.
- van't Wout, A.B., L.J. Ran, C.L. Kuiken, N.A. Kootstra, S.T. Pals, and H. Schuitemaker (1998). Analysis of the temporal relationship between human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J. Virol.* 72:488-496.
- von Laer, D., A. Corovic, B. Vogt, B. Fehse, S. Roscher, A. Rimek, C. Baum, and W. Ostertag (2000). Loss of CD38 antigen on CD34+CD38+ cells during shortterm culture. *Leukemia* 14:947-8.
- Verani, A., E. Pesenti, S. Polo, E. Tresoldi, G. Scarlatti, P. Lusso, A.G. Siccardi, and D. Vercelli. 1998. CXCR4 is a functional coreceptor for infection of human macrophages by CXCR4-dependent primary HIV-1 isolates. *J Immunol.* 161:2084-8.
- Verfaillie, C., K. Blakolmer, and P. McGlave. 1990. Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J Exp Med.* 172:509-2.
- Verhasselt, B., T. Kerre, E. Naessens, D. Vanhecke, M. De Smedt, B. Vandekerckhove, and J. Plum. 1999. Thymic repopulation by CD34(+) human cord blood cells after expansion in stroma-free culture. *Blood.* 94:3644-52.
- Wain-Hobson, S., P. Sonigo, O. Danos, S. Cole, and M. Alizon. 1985. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell.* 40:9-17.
- Wang, N., T. Zhu, and D.D. Ho. 1995. Sequence diversity of V1 and V2 domains of gp120 from human immunodeficiency virus type 1: lack of correlation with viral phenotype. *J Virol.* 69:2708-15.
- Weiss, R.A. 1996. HIV receptors and the pathogenesis of AIDS. *Science.* 272:1885-6.
- Weissenhorn, W., A. Dessen, S.C. Harrison, J.J. Skehel, and D.C. Wiley. 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature.* 387:426-30.
- Weissenhorn, W., S.A. Wharton, L.J. Calder, P.L. Earl, B. Moss, E. Aliprandis, J.J. Skehel, and D.C. Wiley. 1996. The ectodomain of HIV-1 env subunit gp41 forms a soluble, alpha-helical, rod-like oligomer in the absence of gp120 and the N-terminal fusion peptide. *Embo J.* 15:1507-14.
- Weissman, D., Y. Li, J.M. Orenstein, and A.S. Fauci. 1995. Both a precursor and a mature population of dendritic cells can bind HIV. However, only the mature population that expresses CD80 can pass infection to unstimulated CD4+ T cells. *J Immunol.* 155:4111-7.
- Wouters, S., E. Decroly, M. Vandenbranden, D. Shober, R. Fuchs, V. Morel, M. Leruth, N.G. Seidah, P.J. Courtoy, and J.M. Ruyschaert. 1999. Occurrence of an HIV-1 gp160 endoproteolytic activity in low-density vesicles and evidence for a distinct density distribution from endogenously expressed furin and PC7/LPC convertases. *FEBS Lett.* 456:97-102.
- Wu, L., N.P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A.A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. CD4-induced interaction of



- primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature*. 384:179-83.
- Wyatt, R., J. Moore, M. Accola, E. Desjardin, J. Robinson, and J. Sodroski. 1995. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J Virol*. 69:5723-33.
- Xiao, L., S.M. Owen, I. Goldman, A.A. Lal, J.J. deJong, J. Goudsmit, and R.B. Lal. 1998. CCR5 coreceptor usage of non-syncytium-inducing primary HIV-1 is independent of phylogenetically distinct global HIV-1 isolates: delineation of consensus motif in the V3 domain that predicts CCR-5 usage. *Virology*. 240:83-92.
- Yi, Y., S.N. Isaacs, D.A. Williams, I. Frank, D. Schols, E. De Clercq, D.L. Kolson, and R.G. Collman. 1999. Role of CXCR4 in cell-cell fusion and infection of monocyte-derived macrophages by primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains: two distinct mechanisms of HIV-1 dual tropism. *J Virol*. 73:7117-25.
- Yin, A.H., S. Miraglia, E.D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A.G. Leary, J. Olweus, J. Kearney, and D.W. Buck. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 90:5002-12.
- Zhu, T., H. Mo, N. Wang, D.S. Nam, Y. Cao, R.A. Koup, and D.D. Ho. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science*. 261:1179-81.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIDS	engl.: aquired immunodeficiency syndrome; erworbenes Immunschwächesyndrom
Amp.	Ampicillin
ARV	engl.: AIDS related virus
AS	Aminosäure
$\alpha$	anti
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CA	Capsidprotein
ca.	circa
CD	engl.: cluster of differentiation; Oberflächenprotein/-marker
CLP	engl.: common lymphoid progenitors; gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle
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	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FTOC	engl.: fetal thymus organ culture; Organkultur fötaler Thymi
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
Gy	Grey
h	Stunde
HeBS	engl.: HEPES buffered saline; HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HTLV	Humanes T-Zell Leukämievirus
IL	Interleukin
IN	Integrase
ISP	engl.: immature singlepositive; unreif einfachpositiv
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LTR	engl.: long terminal repeat
μ	mikro
m	milli
M	molar
MA	Matrix
MACS	engl.: magnetic antibody cell sorting
min	Minute
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
NSI	nicht syncytium induzierend
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
?; psi	engl.: packaging signal ; Verpackungssignal von HIV
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Reverse Transkriptase
sec.	Sekunde
SIV	engl.: simian immunodeficiency virus; Affen-Immundefizienz Virus
sog.	sogenannt
SU	Oberflächenglykoprotein (gp120)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tat, <i>tat</i>	virales Transaktivatorprotein; Gen für das virale Transaktivatorprotein
TE	Tris/EDTA
TM	Transmembranglykoprotein (gp41)
TMB	Tetramethylbenzidin
7TM GPCR	engl.: seven transmembrane G protein coupled receptor ; G-Protein verbundener Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen.
U	engl.: unit ; Einheit
UV	ultraviolett
V1-V5	variable Regionen im Hüllprotein (1-5)
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

w/v Gewichts-/Volumenverhältnis  
w/w Gewichts-/Gewichtsverhältnis  
z.B. zum Beispiel

## 7.2 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

## Danksagung

Die hier vorgelegte Arbeit wurde in der Abteilung Zellbiologie und Virologie des Heinrich-Pette-Institutes für Virologie und Immunologie in Hamburg und in der Abteilung Virologie des Hygieneinstitutes der Universität Heidelberg in der Zeit von Januar 1999 bis Dezember 2001 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H.-G. Kräusslich danke ich für die Bereitstellung der sehr guten Arbeitsmöglichkeiten, für sein förderndes Interesse und die stetige Diskussionsbereitschaft. Außerdem bedanke ich mich für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. G. Adam danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. M.T. Dittmar möchte ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung danken, und dafür dass ich die Möglichkeit zu Forschungsaufenthalten in der Arbeitsgruppe von Robin Weiss (Wohl Virion Centre, University College London) hatte. Außerdem bedanke ich mich für drei lehrreiche Jahre.

Bei den Ärzten Dr. H.J. Stellbrink, Dr. J. v. Lunzen und Dr. B. Zöllner möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner „Mäusemama“ U. Müller, die mich sehr einfühlsam an die Arbeit mit den Mäusen herangeführt und die Tiere im Heinrich-Pette-Institut betreut hat.

Many thanks to the group of Robin Weiss, particularly to Paul Clapham, Áine McKnight, Jackie Reeves and Graham Simmons for supervision and helpful discussions.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Kollegen in Hamburg und Heidelberg, wobei ich besonders dem „Umzugsteam“ Denis, Jens, Jessica und Lars für den guten Zusammenhalt in dieser Phase danken möchte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Freund Tawfiq Saed für Unterstützung, Ermutigung, Verständnis und, und, und....

## Lebenslauf

von: Stefanie Reinberger

Persönliche Daten: geboren am 25.11.1970 in Biberach/Riß

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg: 1977-1990 Grundschule und Gymnasium in Schorndorf

05/90 Abitur

1909-1991 Freiwilliges soziales Jahr im Jugenddorf  
Wolfstein

1991-1998 Biologiestudium an der Universität Göttingen

1991-1993 Grundstudium

1993-1998 Hauptstudium  
Schwerpunkte: Biochemie, Humangenetik,  
Physikalische Chemie

08/96-01/98 Diplomarbeit im Deutschen Primatenzentrum  
Göttingen zum Thema „Verlauf und  
Regulation der Apoptose bei SIV und SHIV-  
infizierten Makaken“

08/98-12/98 Tätigkeit als Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
in der Abt. Tumorstudiologie des Heinrich-  
Pette-Institutes (HPI), Hamburg

01/99-12/01 Promotion am Heinrich-Pette-Institut (HPI),  
Hamburg und in der Abteilung Virologie  
(Hygieneinstitut) der Universität Heidelberg  
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.G.  
Kräusslich  
Thema: Phänotypische Charakterisierung  
des viralen Hüllproteins (Env) von HIV-1  
durch Konstruktion rekombinanter HIV-1-  
Varianten

## Publikationen

Reinberger S., M. Spring, T. Nisslein, C. Stahl-Henning, G. Hunsmann & U. Dittmer (1999). Kinetics of lymphocyte apoptosis in macaques infected with different simian immunodeficiency viruses or simian/human immunodeficiency hybrid viruses. *Clin. Immunol.* 90:141-146.

Dittmar, M.T., S. Eichler, S. Reinberger, L. Henning & H.-G. Kräusslich (2001). A recombinant virus assay using full-length envelope sequences to detect changes in HIV-1 coreceptor usage. *Virus genes.* 23:281-290.

Reinberger S., H.-J. Stellbrink, J.V. Lunzen, B. Zöllner, H.-G. Kräusslich & M.T. Dittmar (2000). Genotypical and phenotypical characterisation of recombinant HIV-1 clones of a Hamburg cohort. Posterbeitrag bei „European Virology“ im September 2000 in Glasgow.

Reinberger S., H.-J. Stellbrink, J.V. Lunzen, B. Zöllner, H.-G. Kräusslich & M.T. Dittmar (2001). Genotypic and phenotypic characterisation of recombinant HIV-1 clones. Posterbeitrag bei der „Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie“ im März 2001.