

Universität Hamburg

Fakultät für Biologie

**Neutralisation von Varianten des Humanen
Immundefizienz Virus Typ I (HIV-1), West-Nil
Virus und Hantaan Virus mit modifiziertem
humanem Serumalbumin (HSA)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Markus Voßmann

Hamburg, November 2004

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. SCHMITZ
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. G. ADAM

Tag der Disputation: 14. Januar 2005

Hamburg, den 29. Dezember 2004



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Arno Frühwald'.

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

1. Einleitung	1
1.1 Das Humane Immundefizienzvirus Typ I (HIV-1).....	3
1.1.1 Der Aufbau des HIV-1	3
1.1.2 Virus-Zell-Interaktionen	5
1.2 Flaviviren	8
1.2.1 Der Aufbau der Flaviviren	8
1.2.2 Virus-Zell-Interaktionen	10
1.3 Das Hantaan-Virus.....	11
1.3.1 Der Aufbau des Hantaan-Virus.....	11
1.3.2 Virus-Zell-Interaktionen	12
1.4 Inhibition der Virus-Zell-Interaktion	13
1.4.1 Polyanionische Inhibitoren	13
1.4.2 Die unspezifische Immunantwort	14
1.5 Zielsetzung.....	16
2. Material	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Geräte.....	18
2.3 Zelllinien, Virus- und Bakterienstämme.....	19
2.4 Verbrauchsmaterial	19
2.5 Plasmide.....	20
2.6 Antikörper	21
2.7 Verwendete Kits	21
3. Methoden.....	22
3.1 Zellbiologische Methoden	22
3.1.1 Kultivierung adhärenter Zellen	22
3.1.2 Einfrieren von Zellen	22
3.1.3 Auftauen von Zellen	22
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl und des Kulturzustandes	23

3.1.5	Apoptose-Test.....	23
3.1.6	³ H-Thymidin Test.....	23
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	24
3.2.1	Anzucht und Lagerung von Bakterien.....	24
3.2.2	Herstellung von kompetenten Bakterien.....	24
3.2.3	Restriktion von DNA.....	25
3.2.4	Ligation von DNA.....	25
3.2.5	Transformation von <i>E. Coli</i>	26
3.2.6	Präparation von Plasmid-DNA.....	26
3.2.7	Reinigung von DNA.....	26
3.2.8	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	26
3.2.9	DNA-Sequenzierung.....	27
3.2.10	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
3.3	Proteinanalytische Methoden.....	28
3.3.1	BCA-Assay.....	28
3.3.2	SDS-PAGE.....	28
3.3.3	Proteinfärbungen.....	29
3.3.3.1	Coomassie-Färbung.....	29
3.3.3.2	Silberfärbung.....	29
3.3.3.3	Kupferfärbung.....	30
3.3.4	Indirekte Immunfluoreszenz.....	30
3.3.5	Surface Plasmon Resonance (SPR) Messungen.....	31
3.3.6	HOCl-Modifikation von Proteinen.....	32
3.4	Virologische Methoden.....	32
3.4.1	<i>Bluecell</i> -Infektionstest.....	32
3.4.2	p24-Antigen-ELISA.....	33
3.4.3	Bestimmung der TCID ₅₀	34
3.4.4	Herstellung infektiöser Virusüberstände.....	35
3.4.4.1	HIV-1.....	35
3.4.4.2	West-Nil Virus.....	36
3.4.4.3	Dengue-2 Virus.....	36
3.4.4.4	Gelbfieber-Virus.....	36
3.4.4.5	Hantaan-Virus.....	37

4. Ergebnisse	38
4.1 Analyse von HOCl-modifiziertem HSA.....	38
4.1.1 SDS-PAGE von HSA und HOCl-modifiziertem HSA.....	38
4.1.2 Nachweis von HSA und HOCl-modifiziertem HSA in der SDS-PAGE durch Kupfer-, Coomassie- und Silberfärbung.....	40
4.1.3 Anlagerung von HSA und HOCl-modifiziertem HSA an Dextran	42
4.1.4 Massendifferenz von immobilisiertem HSA vor und nach der Modifikation mit HOCl	44
4.1.5 Interaktionsmessungen zwischen HIV gp120 und HOCl-modifiziertem HSA	46
4.2 Inhibition der HIV-1-Infektion.....	48
4.2.1 Neutralisation der HIV-1-Infektion von TZM-bl-Zellen.....	48
4.2.2 Vitalität von TZM-bl-Zellen.....	50
4.2.2.1 Lichtmikroskopische Beobachtungen.....	50
4.2.2.2 ³ H-Thymidintest.....	52
4.2.2.3 Apoptose-Test.....	54
4.2.3 Infektionsversuche mit anderen Viren.....	56
4.2.3.1 Infektion mit Gelbfieber-Virus	56
4.2.3.2 Infektion mit Dengue-2-Virus	59
4.2.4 Vitalität von Vero B4-Zellen	61
4.2.4.1 Lichtmikroskopische Beobachtungen.....	61
4.2.4.2 ³ H-Thymidintest.....	63
4.2.4.3 Apoptose-Test.....	65
4.2.5 SPR-Messungen der VEBP—gp120 Interaktion.....	67
4.2.6 Neutralisationstests verschiedener HI-Viren mit VEBP.....	70
4.2.7 Bindungsstudien mit intakten Virusmutanten.....	73
4.2.7.1 Etablierung der Testmethode	73
4.2.7.2 SPR-Untersuchungen mit unterschiedlich glycosylierten HI-Viren...	75
4.3 Inhibition der West-Nil Virus-Infektion durch VEBP.....	79
4.3.1 Expression und Aufreinigung der West-Nil B-Domäne.....	79
4.3.2 SPR-Untersuchungen der B-Domäne mit VEBP.....	81
4.3.3 Inhibition der West-Nil Virus Infektion durch VEBP	83

4.3.4	Inhibition der West-Nil Infektion bei Zugabe von VEBP zu verschiedenen Zeitpunkten	85
4.4	Inhibition der Hantaan-Virus-Infektion durch VEBP.....	89
5.	Diskussion	93
5.1	Vom HSA zum VEBP	93
5.1.1	Hypochlorit induzierte HSA Veränderungen	93
5.1.2	VEBP Interaktion mit viralen Hüllproteinen	97
5.2	VEBP neutralisiert HIV-1, WNV und HTNV	100
5.3	Ausblick	104
6.	Zusammenfassung.....	105
7.	Literaturverzeichnis.....	107
8.	Anhang	121
8.1	Lebenslauf.....	121
8.2	Veröffentlichungen	122
8.3	Abkürzungsverzeichnis.....	123

1. Einleitung

Viruserkrankungen spielen weltweit eine sehr wichtige Rolle, da sie jedes Jahr viele Millionen Menschenleben fordern. Bestes Beispiel hierfür ist wohl die Pandemie des Humanem Immundefizienzvirus Typ I (HIV-1). Alleine mit HIV-1 sind weltweit etwa 38 Millionen Menschen infiziert und etwa 20 Millionen Menschen starben bereits seit dem Beginn der Pandemie im Jahr 1981 (UNAIDS, 2003). Aber auch andere Viren wie West-Nil Virus oder Hantaan Virus haben eine zunehmende Bedeutung erlangt. So konnte 1999 erstmals ein West-Nil Virus Ausbruch in Nordamerika verzeichnet werden. Seitdem breitet sich dieses Virus dort immer weiter aus.

Die Entwicklung von antiviralen Wirkstoffen ist daher eminent wichtig. Vor allen Dingen Wirkstoffe mit einem breiten, antiviralen Wirkungsspektrum müssen gefunden werden, damit auch gegen die sogenannten „emerging viruses“, die aufkommenden neuen Viren, mögliche Therapieansätze gefunden werden können. Ein Ansatzpunkt für die Entwicklung eines solchen Wirkstoffes ist ein Schritt im Lebenszyklus von Viren, der für viele Viren nach einem ähnlichen Mechanismus verläuft.

Allen Viren gemeinsam ist, dass das Viruspartikel (Virion) aus Proteinen und Nukleinsäure, entweder DNA oder RNA, besteht. Einige Viren sind von einer Lipidmembran, die als Hülle oder *Envelope* bezeichnet wird, umgeben. Aufgrund des Fehlens eigener Ribosomen und energiebildender Stoffwechselsysteme sind alle Viren intrazelluläre Parasiten. Da alle Viren auf den fremden Zellstoffwechsel angewiesen sind und deswegen Zellen infizieren müssen, lässt sich die Vermehrung in mehrere, zeitlich aufeinander folgende Phasen einteilen:

- Zunächst werden bestimmte Rezeptoren auf der Membran der Wirtszelle erkannt. Dies wird durch die viralen Proteine vermittelt. Bei umhüllten Viren sind die in die Virusmembran eingelagerten Membranproteine dafür verantwortlich. Das Virus lagert sich durch diesen als *Adsorption* oder *Attachment* bezeichneten Vorgang an die Wirtszelle an.
- Daraufhin müssen die Virionen durch die Zellmembran in das Zellinnere gelangen. Dieser als *Penetration* oder *Entry* bezeichnete Prozess geschieht entweder durch direkte Fusion von Virus- und Zellmembran oder aber durch rezeptorvermittelte Endocytose. Bei der Penetration von Viren durch

rezeptorvermittelte Endocytose muss das Virion zusätzlich durch einen als *Uncoating* bezeichneten Vorgang aus dem Vesikel freigesetzt werden.

- Nach dem Entry beginnt die virale *Replikation*. Damit sind die komplexen Vorgänge zur Genexpression und Genomreplikation gemeint. Diese sind bei jedem Virus verschieden, je nachdem, ob es sich um ein RNA- oder DNA-Virus handelt und in welcher Orientierung und Form die Erbinformation vorliegt. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Replikation von Viren wird von jedem Virus auch ein unterschiedliches Zellmilieu für eine erfolgreiche Replikation benötigt, worin die Zellspezifität von Viren mit begründet liegt.
- Nach der Replikation liegen virale Strukturproteine und Genome in großer Zahl in der Zelle vor, die dann zu Virionen zusammengebaut werden. Die Freisetzung der Virionen erfolgt entweder durch *Budding* (Knospung) der Viren oder aber durch die Lyse der Wirtszelle.

Ein möglicher Ansatzpunkt zur Entwicklung antiviraler Wirkstoffe ist die Inhibition der Vorgänge, die zum Eintritt des Virus in die Wirtszelle führen. Dieser Schritt des viralen Lebenszyklus ist für die Entwicklung breit antiviral wirkender Stoffe besonders interessant, da bestimmte zelluläre Oberflächenstrukturen von einer Vielzahl von Viren verwendet werden. So wird die Interaktion von Heparansulfat mit Viren wie Herpes Simplex Virus Typ I und Typ II (HSV I und II, Herold *et al.*, 1996), Varicella-Zoster Virus (VZV, Zhu *et al.*, 1995), Pseudorabies Virus (PrV, Trybala *et al.*, 1998), dem Humanen Cytomegalovirus (Watanabe, 1998), Maul-und-Klauenseuche-Virus Typ O (Jackson *et al.*, 1996), Respiratory Syncytial Virus (RSV, Krusat *et al.*, 1997), dem Humanen Immundefizienzvirus Typ I (HIV-1, Harrop & Rider, 1998) sowie Dengue Virus (Chen *et al.*, 1997) beobachtet.

Die Inhibition des viralen Eintritts des HIV-1, der Flaviviren und des Hantaan Virus in Zellen soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Dazu werden diese Viren im Folgenden kurz vorgestellt.

1.1 Das Humane Immundefizienzvirus Typ I (HIV-1)

Anfang der 80er Jahre wurde in den USA erstmals ein Krankheitsbild mit schweren opportunistischen Infektionen beschrieben (Brennan & Durack, 1981; Gottlieb *et al.*, 1981), welches nachfolgend als erworbenes Immunschwächesyndrom (*acquired immunodeficiency syndrom*, AIDS) bezeichnet wurde. Bald darauf gelang der Gruppe von Luc Montagnier am Pariser Pasteur-Institut die Isolierung eines neuartigen Retrovirus aus dem Lymphgewebe eines AIDS-Patienten. Dieses Virus konnte als AIDS-Erreger identifiziert werden (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983), was auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte (Gallo *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984; Sarngadharan *et al.*, 1984). Es wurde dem Genus Lentivirus aus der Familie der Retroviren zugeordnet und schließlich Humanes Immundefizienzvirus (human immunodeficiency virus, HIV) genannt (Coffin *et al.*, 1986). Mittlerweile ist AIDS zu der bedeutendsten Infektionskrankheit unserer Zeit geworden. Die Zahl der HIV-Infizierten ist weltweit von 35 Millionen 2001 auf 38 Millionen in 2003 gestiegen, die Zahl der Neuinfektionen liegt jährlich bei etwa 5 Millionen. Seit 1981 sind etwa 20 Millionen Menschen an den Folgen von AIDS gestorben (alle Zahlen von UNAIDS, 2003).

1.1.1 Der Aufbau des HIV-1

Das infektiöse Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 100 nm (Frank *et al.*, 1978; siehe Abbildung 1) und ist von einer doppelten Lipidmembran umgeben, die der Cytoplasmamembran der Wirtszelle entstammt. In diese Membran eingelagert ist das Transmembranprotein gp41, das mit dem externen Hüllprotein gp120 durch nicht kovalente Wechselwirkungen assoziiert ist. Beide Proteine sind glykosyliert, liegen als Heterotrimer vor (Lu *et al.*, 1995; Weissenhorn *et al.*, 1997) und sind elektronenmikroskopisch als Spikes sichtbar (Gelderblom *et al.*, 1987). Das gp120 ist für die Bindung zellulärer Rezeptoren verantwortlich und ist gemeinsam mit dem gp41 für den Eintritt des Virus in die Zelle von essentieller Bedeutung (Dimitrov & Broder, 1998). An der Innenseite der Virusmembran befindet sich das Matrixprotein p17, das unter anderem zur Formgebung und Stabilität des Virus beiträgt. Die Funktion der

daneben befindlichen Lateralkörper ist noch weitgehend ungeklärt. Im Zentrum des Viruspartikels liegt das aus dem Capsidprotein p24 gebildete Capsid. In dessen Innerem liegt das aus zwei identischen RNA-Molekülen positiver Polarität bestehende virale Genom, das mit dem Nucleocapsidprotein p7 assoziiert ist. Ausserdem findet man die RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, p51/66), die Protease p9 und die Integrase p38 im Capsid. Das Capsid ist mit der Virusmembran über das Link-Protein p6 verbunden (Levy, 1998).

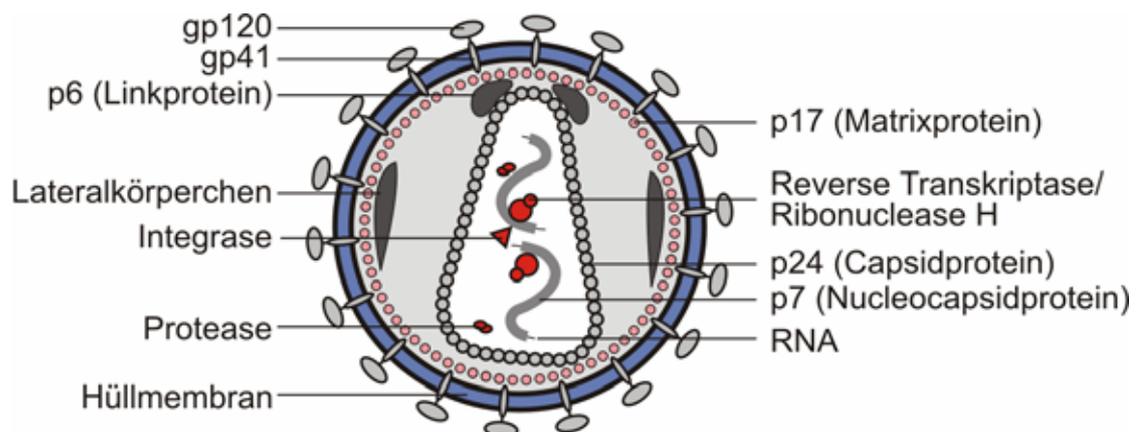


Abbildung 1: Aufbau und Struktur des HIV-1. Mit der Virusmembran assoziiert sind die Glycoproteine gp41 und gp120. An der Innenseite der Membran findet man das Matrixprotein p17. Das Linkprotein p6 und die Lateralkörperchen sind mit dem Matrixprotein assoziiert. Die Virusmembran umschließt das Capsid, das von dem Capsidprotein p24 gebildet wird und die beiden Kopien der viralen RNA umschließt. Das Nucleocapsidprotein p7 und die Reverse Transkriptase sind mit der RNA assoziiert. Im Capsid befinden sich außerdem die Integrase und die Protease. Abbildung aus „Molekulare Virologie“ (Modrow, Falke).

1.1.2 Virus-Zell-Interaktionen

Die Infektion von Zellen mit HIV-1 wird durch die Interaktion der viralen Hüllproteine gp120 und gp41 mit zellulären Rezeptoren eingeleitet. Das gp120 weist eine hohe Sequenzvariabilität auf, die besonders in den variablen Regionen V1 – V5 zu Tage tritt. Diese hochvariablen Regionen werden durch konservierte Regionen (C1 – C5) voneinander getrennt. Die V1 – V4 Bereiche sind an ihren N- und C-terminalen Enden durch Disulfidbrücken zu Schleifen geformt (Leonard *et al.*, 1990). Das gp120 ist je nach Virusisolat an 20 bis 25 Positionen durch eine N-Glykosylierung modifiziert (Leonard *et al.*, 1990). Die Erkennungssequenz für eine N-Glykosylierung besteht aus dem Aminosäuremotiv NXS oder NXT, wobei X eine beliebige Aminosäure außer Aspartat oder Prolin sein kann. Diese Kohlenhydratstrukturen machen etwa 50 % des Molekulargewichts des gp120 aus (Lasky *et al.*, 1986; Mizuochi *et al.*, 1988; Geyer *et al.*, 1988). Die N-Glykosylierung der V3 Schleife ist für das Virus von besonderer Bedeutung, da sie das Virus durch Maskierung wichtiger Epitope vor der Immunabwehr schützt (Schonning *et al.*, 1996). Die V3 Schleife stellt die wichtigste immunogene Region des Virus dar (*principal neutralizing domain*, Carrow *et al.*, 1991; Zwart *et al.*, 1991) und ist das Ziel neutralisierender Antikörper (Schreiber *et al.*, 1997).

HIV-1 infiziert *in vivo* CD4-exprimierende (CD4⁺) Zellen, zu denen unter anderem T-Helferzellen, Monocyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen zählen. Aufgrund dieser Beobachtung konnte CD4 als Rezeptor des HIV identifiziert werden (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984, Sattentau *et al.*, 1988). In Experimenten mit Maus-Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von CD4 alleine nicht ausreicht, um Zellen mit HIV zu infizieren (Maddon *et al.*, 1986; Ashorn *et al.*, 1990; Clapham *et al.*, 1991). Schließlich wurden zwei weitere Corezeptoren entdeckt, CCR5 (Alkhatib *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996) und CXCR4 (Feng *et al.*, 1996). Beides sind Mitglieder der 7-Transmembran-Chemokinrezeptor-Familie. Während CCR5 auf Makrophagen auftritt ist CXCR4 in der Membran von T-Lymphozyten zu finden. Die Entdeckung von zwei unterschiedlichen Corezeptoren deckt sich mit der bereits früher gemachten Beobachtung von zwei unterschiedlichen Viruspopulationen. Während kurz nach der Neuinfektion mit HIV in Patientenseren nur Viren zu finden sind, die eher langsam und mit geringeren Titern replizieren, treten mit dem Fortschreiten der Krankheit vermehrt Viren auf, die schnell und zu hohen Virustitern replizieren (Asjo *et al.*, 1986). Das unterschiedliche Replikationsverhalten

beider Viruspopulationen erklärt sich durch den Wechsel des Corezeptor-Gebrauchs von CCR5-nutzenden Viren kurz nach der Neuinfektion zu CXCR4-nutzenden Viren nach Ausbruch von AIDS. Aufgrund des Corezeptor-Tropismus werden HI-Viren in X4-trop, R5-trop oder R5X4-dualtrop eingeteilt. Entscheidend für den Tropismus ist die Aminosäuresequenz der V3 Schleife (Hwang *et al.*, 1991) und hierbei vor allen Dingen die Gesamtnettoladung der Schleife. Bei vielen basischen Aminosäuren in der Sequenz der Schleife und damit einer hohen Gesamtnettoladung von etwa +7 handelt es sich um ein X4-tropes Virus, bei niedrigeren Gesamtnettoladungen der Schleife von etwa +3 ist das Virus R5-trop. Auch die Glycosylierung der V3-Schleife hat einen Einfluss auf den Tropismus. So konnte beobachtet werden, dass dualtrophe Viren durch das Entfernen einer Glycosylierungsstelle durch eine Punktmutation in der V3 Schleife zu X4-monotropen Viren verändert werden können, obwohl die Gesamtnettoladung der Schleife durch die Punktmutation nicht beeinflusst wurde (Polzer *et al.*, 2002).

Der Infektionsvorgang des HIV-1 ist in Abbildung 2 dargestellt. Zunächst bindet HIV über gp120 an CD4. Durch diese Bindung werden sterische Änderungen im gp120 ausgelöst, wodurch die Corezeptor-Bindungsstelle des gp120 freigelegt wird (Salzwedel & Berger, 2000). Die Bindung des Corezeptors bewirkt weitere Umlagerungen (hauptsächlich im gp41), wodurch die Fusionsdomäne von gp41 freigelegt und in die Membran der Wirtszelle eingelagert wird. Durch weitere Umlagerungen im gp41 kommen die Transmembran- und die Fusionsdomäne von gp41 in räumliche Nähe, wodurch die Fusion von Virus- und Wirtszellmembran eingeleitet wird.

Die Interaktion von gp120 mit CD4 ist unerlässlich für den Fusionsvorgang von Virus mit Zellmembran. Ob CD4 jedoch eine wichtige Rolle bei der Adsorption von HIV an die Wirtszelle spielt ist fraglich. So exprimieren einige Wirtszellen wie z. B. T-Zellen große Mengen CD4, während andere Zielzellen wie Makrophagen oder dendritische Zellen kaum nachweisbare CD4-Mengen exprimieren. Es ist wahrscheinlich, dass die Adsorption bei diesen Zellen CD4-unabhängig verläuft. So konnte z. B. auch gezeigt werden, dass die Adsorption von HIV an HeLa-Zellen über die Interaktion von gp120 mit dem Glycosaminoglycan Heparansulfat erfolgt (Mondor *et al.*, 1998). Dies konnte für X4-trope sowie für R5X4-trope Viren gezeigt werden, ist jedoch weniger effektiv für R5-trope Viren, da die Adsorption hauptsächlich durch die Interaktion der positiv geladenen V3 Schleife mit negativ geladenen Sulfat-Gruppen des Glycosaminoglycans vermittelt wird (Moulard *et al.*, 2000).

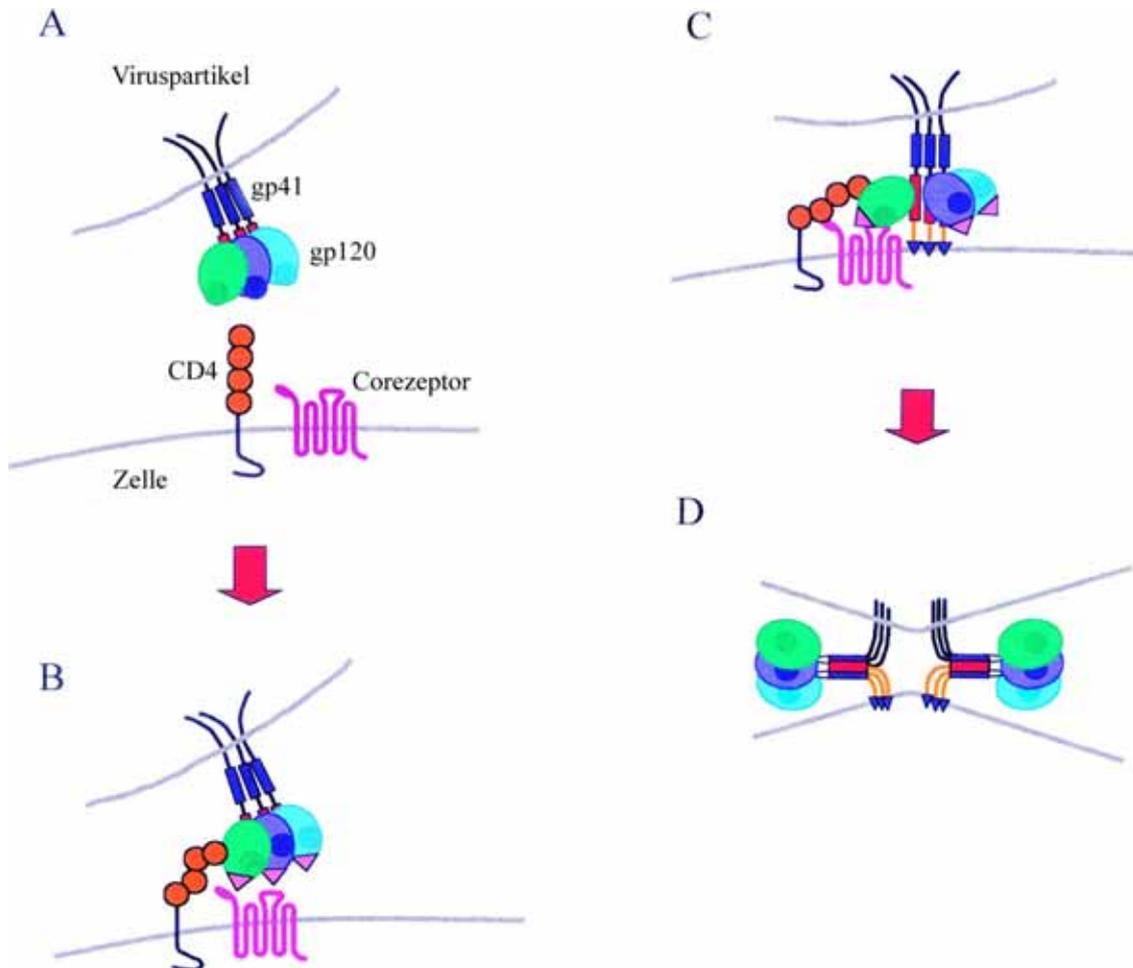


Abbildung 2: Vorgänge während der Adsorption und des Eintritts von HIV-1. Zunächst bindet HIV über gp120 an CD4 (Bild A). Durch diese Bindung werden sterische Änderungen im gp120 ausgelöst, wodurch die Corezeptor-Bindungsstelle von gp120 freigelegt wird (Bild B). Die Bindung des Corezeptors bewirkt weitere Umlagerungen (hauptsächlich im gp41), wodurch die Fusionsdomäne von gp41 freigelegt und in die Membran der Wirtszelle eingelagert wird (Bild C). Durch weitere Umlagerungen im gp41 kommen die Transmembran- und die Fusionsdomäne von gp41 in räumliche Nähe, wodurch die Fusion von Virus- und Wirtszellmembran eingeleitet wird (Bild D).

1.2 Flaviviren

Das Genus der Flaviviren gehört zur Familie Flaviviridae. Dem Genus gehören insgesamt etwa 70 Viren an. Sie gliedern sich nach ihrer Kreuzreaktivität im Hämagglutinationshemmtest in neun Serokomplexe (Calisher *et al.*, 1989; Zanotto *et al.*, 1996). Die bekanntesten Vertreter sind das Dengue Virus Typ 1-4 (Serokomplex Dengue Virus), das Gelbfiebervirus (Serokomplex Gelbfieber) und das West-Nil Virus (WNV, Serokomplex Japanische Enzephalitis). Vor allen Dingen das West-Nil Virus ist wieder in den Vordergrund gerückt, seitdem es 1999 zum ersten Mal in Nordamerika ausgebrochen ist und sich seitdem dort ausbreitet. So wurden alleine in den Vereinigten Staaten im Jahre 2002 4156 Personen mit West-Nil Virus infiziert, was 284 Todesfälle zur Folge hatte (O'Leary *et al.*, 2004). Ein Großteil der Flaviviren und auch die drei vorgestellten Vertreter werden durch Arthropoden (Insekten oder Spinnentiere) übertragen und werden daher auch als Arboviren (arthropod-borne viruses) bezeichnet.

1.2.1 Der Aufbau der Flaviviren

Die infektiösen Viren haben einen Durchmesser von 40 – 60 nm (siehe Abbildung 3) und sind von einer Membran umgeben. Darin eingelagert befinden sich die als Homodimere vorliegenden E-Proteine (51 – 60 kDa) sowie die M-Proteine (7 – 8 kDa). Innerhalb der Membran liegt das Capsid, das aus dem viralen C-Protein (12 kDa) gebildet wird. Mit der Capsidinnenseite ist das Genom (9 – 11 kb) assoziiert. Es handelt sich um ein einzelsträngiges RNA-Molekül in Plusstrangorientierung mit einem großen Leserahmen.

1.2.2 Virus-Zell-Interaktionen

Für die Adsorption an die Wirtszelle und die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor ist das virale E-Protein verantwortlich (Heinz *et al.*, 1994; Rey *et al.*, 2003). Durch die Röntgenstrukturaufklärung der Ektodomäne des E-Proteins ließen sich drei Domänen unterscheiden, die als Domäne I, II und III bezeichnet werden (Rey *et al.*, 1995). Diese entsprechen den bereits zuvor serologisch definierten Domänen A bis C (Mason *et al.*, 1990; Roehrig *et al.*, 1990), wobei Domäne I der Antigenomäne C, Domäne II der Antigenomäne A und Domäne III der Antigenomäne B entsprechen. Die Domänen II und III des E-Proteins wurden in mehreren Studien mit der Interaktion mit dem zellulären Rezeptor in Verbindung gebracht (Crill *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2004; Ni *et al.*, 2000; Thullier *et al.*, 2001). Der für die Infektion benötigte zelluläre Rezeptor ist für viele Flaviviren noch nicht bekannt. Für Dengue-Viren konnte gezeigt werden, dass Heparan-Sulfat für die Adsorption an die Zelle benutzt wird. Jedoch wird ein weiterer Rezeptor für die Infektion benötigt (Rey *et al.*, 2003). Kürzlich konnte DC-SIGN als Rezeptor für die Infektion von dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Tassaneeritthep *et al.*, 2003). Erst vor wenigen Wochen wurde der Rezeptor für West-Nil Virus publiziert. Hierbei handelt es sich um $\alpha_v\beta_3$ Integrin, ein Mitglied der Integrin-Superfamilie (Chu & Ng, 2004). Nach der Interaktion des E-Proteins mit dem zellulären Rezeptor wird das Virus über Endocytose in die Zelle aufgenommen. Die virale- und die endosomale Membran verschmelzen dann bei saurem pH und das Capsid gelangt so in das Cytoplasma (Heinz & Allison, 2001).

1.3 Das Hantaan-Virus

Das Hantaan-Virus gehört dem Genus Hantavirus aus der Familie der Bunyaviren an. Der Name leitet sich vom Fluss Hantaan in Korea ab. In diesem Gebiet wurden die ersten Erkrankungen beschrieben. Der natürliche Wirt des Hantaan-Virus ist die gestreifte koreanische Feldmaus (*Apodemus agrarius corea*), bei der es zu einer asymptomatisch verlaufenden, persistierenden Infektion kommt. Die Verbreitung des Virus erfolgt über die Exkremate der infizierten Nagetiere. Bei humanen Infektionen kann das Virus in etwa einem Drittel aller Fälle hämorrhagisches Fieber auslösen, die Mortalität liegt zwischen 5 und 10 % (Cohen, 1982).

1.3.1 Der Aufbau des Hantaan-Virus

Die Virionen der Hantaviren sind sphärisch und haben einen Durchmesser von 100 – 120 nm (siehe Abbildung 4). Sie sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben, in die die viralen Glycoproteine G1 und G2 eingelagert sind. Die Glycoproteine liegen als Heterodimer vor und sind jeweils über den carboxyterminalen Teil in der Membran verankert. Der cytoplasmatische Teil des etwa 70 kDa großen G1-Proteins hat eine Länge von 142 Aminosäuren, der des etwa 55 kDa großen G2-Proteins nur 8 Aminosäuren. Innerhalb der Hüllmembran befindet sich das L-Protein und das in drei Segmente gegliederte, einzelsträngige RNA Genom in Negativstrangorientierung. Das Genom ist mit den Nucleocapsidproteinen (N-Proteine) zu Nucleocapsiden komplexiert. Auf dem S-Segment (small) des Genoms ist das N-Protein, auf dem M-Segment sind die Glycoproteine und auf dem L-Segment (large) ist das L-Protein codiert (Elliott, 1994; Nathanson & Gonzalez, 1994). Das L-Protein erfüllt mehrere Aufgaben: es dient als RNA-abhängige RNA-Polymerase und hat Aufgaben bei der Initiation der Transkription und der Replikation des Virusgenoms (Garcin *et al.*, 1995).

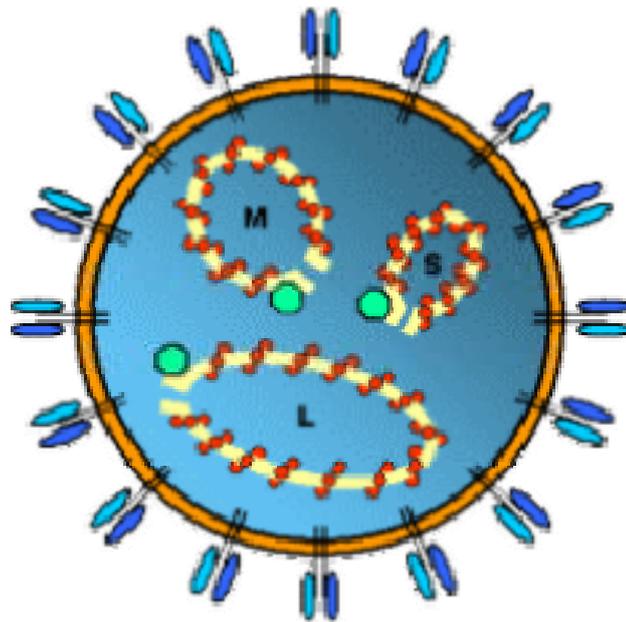


Abbildung 4: Aufbau der Hantaviren. Hantaviren sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben. In diese eingelagert sind die beiden Glycoproteine G1 und G2, die als Heterodimer vorliegen. Innerhalb der Membran befindet sich das mit N-Proteinen komplexierte RNA-Genom und das L-Protein. Das einzelsträngige Genom liegt segmentiert als S (small)-Segment, M (medium)-Segment und L (large)-Segment in Negativstrangorientierung vor.

1.3.2 Virus-Zell-Interaktionen

Für die Adsorption und das Eindringen des Virus in die Zelle sind die beiden viralen Glycoproteine G1 und G2 von entscheidender Bedeutung (Gonzalez *et al.*, 1982; Grady *et al.*, 1983; Kingford *et al.*, 1983). Auf zellulärer Seite konnten bisher β_3 -Integrine als Rezeptor identifiziert werden (Gavrilovskaya *et al.*, 1998, 1999). Es gibt Hinweise auf weitere Rezeptoren. Hantaan-Virus bindet an ein bisher noch nicht identifiziertes, 30 kDa großes Zelloberflächenprotein (Kim *et al.*, 2002). So konnte durch Antikörper gegen dieses Protein die Bindung des Virus an die Zellen und auch die Infektion der Zellen inhibiert werden. Dies deutet darauf hin, dass es mehr als einen Rezeptor für die Hantaan-Infektion auf den Wirtszellen gibt. Die Penetration der Zellen nach der Interaktion mit den zellulären Rezeptoren erfolgt endocytotisch (Jin *et al.*, 2002).

1.4 Inhibition der Virus-Zell-Interaktion

1.4.1 Polyanionische Inhibitoren

Es gibt mehrere Möglichkeiten, den Eintritt von Viren in die Wirtszellen zu verhindern oder zumindest zu stören. Zum einen auf der viralen Seite durch die Bindung von Substanzen an die viralen Hüllproteine, die für die Adsorption des Virus an die Zelle verantwortlich sind. Zum anderen besteht die Möglichkeit, durch Interaktion von Substanzen mit den zellulären Rezeptoren das Eindringen in die Zelle zu verhindern. Da viele Viren für den Eintritt in die Wirtszellen auf die Bindung an negativ geladene Zelloberflächenmoleküle wie Heparansulfat durch elektrostatische Wechselwirkungen angewiesen sind (Dengue, HSV I und II, VZV, PrV, HIV-1, RSV (siehe Seite 2)), lässt sich auch der Eintritt vieler Viren in die Wirtszellen mit Hilfe von polyanionischen Molekülen inhibieren. So wird die Infektion von Zellen mit RSV, HSV I wie auch die Infektion mit Japanischem Encephalitis Virus durch Heparansulfat inhibiert (Krusat *et al.*, 1997; Shukla *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2001). Zu den polyanionischen Inhibitoren zählen z. B. Polycarboxylate, Polyphosphate, Polysulfate oder Polysulfonate.

Ein gut untersuchtes Beispiel für den Wirkungsmechanismus polyanionischer Inhibitoren ist die Inhibition der HIV-1-Infektion durch Dextransulfat (Baba *et al.*, 1988; Ito *et al.*, 1987; Mitsuya *et al.*, 1988; Ueno & Kuno, 1987). Dies geschieht durch die Bindung des Dextransulfats an die V3 Schleife des viralen gp120 (Callahan *et al.*, 1991; Harrop *et al.*, 1994; Moulard *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 1995). Die Bindung beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen V3 Schleife und des negativ geladenen Dextransulfats. Durch diese Interaktion wird die Bindung der V3 Schleife an den Corezeptor blockiert und der Eintritt des Virus in die Zelle verhindert.

Durch die chemische Modifikation von humanem Serumalbumin (HSA) lassen sich ebenfalls Inhibitoren des Viruseintritts in Wirtszellen herstellen. So konnte gezeigt werden, dass durch Succinylierung oder Acotinylierung der positiv geladenen Lysin-Reste von HSA eine (Succinylierung) bzw. zwei (Acotinylierung) negative Ladungen pro Lysin-Rest in das Protein eingeführt werden konnten (Jansen *et al.*, 1993). Dadurch wurde ein stark negativ geladenes Protein erhalten, welches, ebenso wie das Polyanion Dextransulfat, den Eintritt von HIV-1 in Zellen inhibiert. Bei Untersuchungen zum

Wirkungsmechanismus der Inhibition durch negativ geladene Albumine konnte gezeigt werden, dass succinyliertes HSA (Suc-HSA) über elektrostatische Wechselwirkungen mit der V3 Schleife von gp120 die Interaktion mit dem Corezeptor der HIV-Infektion verhindert (Kuipers *et al.*, 1999). Aufgrund der Ähnlichkeiten im Mechanismus der Inhibition sowie in der Ladung der Moleküle werden durch chemische Modifikation hergestellte, negativ geladene Serumalbumine ebenfalls zu den polyanionischen Inhibitoren gezählt. Sie haben den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu Polyanionen wie Dextransulfat nicht die unerwünschten, stark antikoagulierenden Eigenschaften der Polyanionen aufweisen (Jansen *et al.*, 1993).

1.4.2 Die unspezifische Immunantwort

Die Ausbreitung von Infektionserregern wird im menschlichen Körper sowohl durch die humorale und zelluläre Immunantwort als auch durch die unspezifische Immunantwort verhindert. Ein Teil der unspezifischen Immunantwort ist das Protein Myeloperoxidase (MPO). MPO ist ein Arginin-reiches und dadurch stark basisches Protein, das aus Häm-Gruppen und jeweils zwei etwa 60 und 14 kDa großen Untereinheiten besteht. Es kommt hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten und in Monozyten vor. Die Aktivierung dieser Zellen durch verschiedene Stimuli wie z. B. Bakterientoxine führt zur Produktion großer Mengen Superoxid-Radikale durch eine membranassoziierte NADPH-Oxidase. Diese werden weiter durch Superoxid-Dismutasen zu Wasserstoffperoxid umgewandelt (Klebanoff, 1988). Etwa 70 % des entstehenden Wasserstoffperoxids wird zusammen mit Chlorid-Ionen von der MPO zu Hypochlorit (HOCl) umgewandelt (Klebanoff, 1991; Kettle & Winterbourn, 1997). Dieses durch die MPO-Aktivität entstehende HOCl hat antivirale und antibakterielle Wirksamkeit (Thomas, 1979; Weiss & LoBuglio, 1982; Klebanoff, 1999) und reagiert mit vielfältigen biologischen Stoffen wie Proteinen, DNA (Prutz, 1996), Lipiden (Winterbourn *et al.*, 1992) und Cholesterin (Carr *et al.*, 1996). Aufgrund ihrer Häufigkeit und hohen Reaktivität mit HOCl sind Proteine jedoch die hauptsächlichen Reaktionspartner.

Die Reaktionen von Hypochlorit mit Proteinen sind äußerst komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. *In vitro* konnte bisher gezeigt werden, dass die Reaktion von HOCl hauptsächlich mit den Seitenketten der Aminosäuren erfolgt (Pattison & Davies,

2001). Hierbei konnten die Seitenketten auch entsprechend ihrer Reaktivität folgendermaßen geordnet werden: Methionin > Cystein >> Cystin ~ Histidin ~ α -amino > Tryptophan > Lysin >> Tyrosin ~ Arginin > Glutamin ~ Asparagin (Pattison & Davies, 2001). Die Reaktionen der Schwefel enthaltenden Seitenketten mit HOCl sind bisher am besten untersucht. So konnte gezeigt werden, dass Cystein durch HOCl-Oxidation über mehrere Intermediate in Cysteinsäure überführt wird (Pereira *et al.*, 1973; Drozd *et al.*, 1988; Fu *et al.*, 2002). Das gleiche Endprodukt wird für die Oxidation des Disulfids Cystin erhalten (Savige & Maclaren, 1966; Capozzi & Modena, 1974). Für die beiden basischen Seitenketten von Lysin und Arginin ist bisher noch sehr wenig in Bezug auf die Oxidation mit HOCl bekannt. Für Lysin wird angenommen, dass die Amin-Funktion der Seitenkette über Chloramin-Intermediate in eine Aldehyd-Funktion überführt wird (Zgliczynski *et al.*, 1968; Zgliczynski *et al.*, 1971; Armesto *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1997; Hazen *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2000). Neben der Modifikation der Seitenketten kann es durch die Entstehung reaktiver Intermediate auch zur Aggregation von Proteinen kommen (Vissers & Winterbourn, 1991). Diese Aggregation wurde bei geringen molaren Überschüssen von HOCl beobachtet. Wurde das molare Verhältnis von HOCl zu Proteinen weiter erhöht, so konnte der gegenteilige Effekt, die Fragmentation von Proteinen, beobachtet werden (Thomas, 1979). Dies beruht wahrscheinlich auf der Reaktion von HOCl mit allen potentiellen Reaktionspartnern der Aminosäureseitenketten, so dass noch im Überschuss vorhandenes HOCl mit den Amid-Funktionen des Protein-Backbones reagiert, was schliesslich zu der Spaltung der Peptidbindung führt.

Das Vorkommen von HOCl-modifizierten Proteinen *in vivo* konnte nachgewiesen werden. So wurden von Hazell *et al.* (1996) monoklonale Antikörper erzeugt, mit denen spezifisch HOCl-modifizierte Proteine nachgewiesen werden konnten. In menschlichem Probenmaterial konnten dann auch mit Hilfe dieses Antikörpers mehrere HOCl-modifizierte Proteine identifiziert werden. Da die Myeloperoxidase ein Teil der unspezifischen Immunantwort ist, stellt sich die Frage, ob Proteine, die durch das MPO-Katalyse Produkt HOCl modifiziert werden, antivirale Eigenschaften haben. Dies soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.5 Zielsetzung

Da im Menschen HOCl-modifizierte Proteine nachweisbar sind, stellt sich die Frage, ob sie Bestandteil der unspezifischen Immunantwort sind. Man kann sich vorstellen, dass HOCl-modifiziertes Serumalbumin Eigenschaften besitzt, die die Virusinfektion blockieren können.

Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob HOCl-modifiziertes humanes Serumalbumin einen Einfluss auf die Infektion von Zellen mit HIV-1, West-Nil Virus und Hantaan Virus hat. Dies soll *in vitro* in Zellkulturexperimenten analysiert werden. In weiteren Zellkulturexperimenten soll die Toxizität des HOCl-modifiziertem HSA durch Untersuchungen zur Zellvitalität und zum Zellstoffwechsel bestimmt werden.

Weiterhin soll die Interaktion des HOCl-modifiziertem HSA mit viralen Hüllproteinen in *Surface Plasmon Resonance* Untersuchungen analysiert werden. Es soll untersucht werden, ob HOCl-modifiziertes HSA direkt mit den Hüllproteinen von Viren interagiert. Dazu stehen HIV-1 Hüllproteine und die B-Domäne des West-Nil E-Proteins in gereinigter Form zur Verfügung. Die Interaktion mit dem gp120 des HIV-1 soll detailliert untersucht werden und der Einfluss von Glycosylierungsstellen im gp120 auf die Interaktion soll mit Hilfe von HIV-1-Varianten, die sich nur durch die Glycosylierung des gp120 unterscheiden, analysiert werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Life Technologies (Karlsruhe)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Dimethylsulfoxid	Merck (Darmstadt)
DMEM	Life Technologies (Karlsruhe)
Dithiotreitol	Sigma (Deisenhofen)
Empigen	Calbiochem (Schwalbach)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Formamid	Sigma (Deisenhofen)
Fötales Kälberserum	Biochrom (Gründau)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
HEPES	Biomol (Hamburg)
Hygromycin B	Life Technologies (Karlsruhe)
Leibovitz L-15	Life Technologies (Karlsruhe)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriumhypochlorit	Roth (Karlsruhe)
p24 Antigen Standard	Medical Research Council (London, UK)
Penicillin	Life Technologies (Karlsruhe)
Puromycin	Sigma (Deisenhofen)
Streptomycin	Life Technologies (Karlsruhe)

Substanz	Bezugsquelle
Trypsin/EDTA	Life Technologies (Karlsruhe)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Tween 20	Serva (Heidelberg)
X-Gal	Applichem (Darmstadt)

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Biacore 1000	Biacore (Freiburg)
Elektrophoreseanlage Mini	BioRad (München)
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss (Jena)
Laborwaage	Satorius (Göttingen)
Lichtmikroskop	Leitz (Wetzlar)
Neubauer-Zählkammer	Brand (Wertheim)
pH-Meter	Schott (Mainz)
Photometer Lambda E	MWG-Biotech (Ebersberg)
Quarzküvetten	Hellma (Jena)
Spektrophotometer UV-160A	Shimadzu (Hamburg)
UV-Geldokumentationsanlage	Kodak Deutschland
Videodokumentation UP-895 CE	Sony Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Superfuge 22	Heraeus (Hanau)

2.3 Zelllinien, Virus- und Bakterienstämme

Zelllinien:

HeLa P4	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie, bezogen von M. Dittmar (Heidelberg)
HeLa TZM-bl	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie, bezogen von M. Dittmar (Heidelberg)
Vero B4	Affennierenzelllinie (african green monkey kidney), bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Nummer ACC 33

Bakterienstämme:

<i>E.coli XL-1 Blue</i>	Stratagene (Heidelberg)
-------------------------	-------------------------

Viren:

Hantaan Virus	Stamm 76-118, Genbank-Accession Nummern: M14626 (S-Segment), M14627 (M-Segment), NC 005222 (L-Segment)
Gelbfieber	Impfstamm 17D (Theiler & Smith, 1937)
West-Nil Virus	Stamm Wengler, SwissProt P06935, Genbank-Accession Nummer M12294
Dengue-2	Stamm New Guinea C, Genbank-Accession Nummer AF038403

2.4 Verbrauchsmaterial

Alle Plastikwaren und anderes Verbrauchsmaterial wurden von den Firmen Millipore (Eschborn), Biozym (Hess. Oldendorf), Greiner (Solingen), Roth (Karlsruhe), Nunc (Wiesbaden), und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.5 Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pNL4-3	Svenja Polzer, Bernhard-Nocht-Institut
pNL4-3(-13/15/17)	Svenja Polzer, Bernhard-Nocht-Institut
pNL918	Svenja Polzer, Bernhard-Nocht-Institut
pNL930	Svenja Polzer, Bernhard-Nocht-Institut
pNL952	Svenja Polzer, Bernhard-Nocht-Institut
pNL952(-15)	Svenja Polzer, Bernhard-Nocht-Institut
pET22b _{B-Domäne}	Diana Ludolfs, Bernhard-Nocht-Institut

Die oben aufgeführten pNL-Plasmide dienen zur Herstellung rekombinanter HIV-1 Viruspartikel. Plasmid pNL4-3 codiert den HIV-1 Stamm NL4-3, ein X4-troper Laborstamm. Bei den anderen pNL-Plasmiden wurde die V3-Schleife von NL4-3 gegen die eines entsprechenden Patientenisolates (PI) ausgetauscht, wodurch auch der Tropismus des jeweiligen Isolates übernommen wird. Bei PI 918 handelt es sich um ein R5-tropes, bei PI 930 um ein X4-tropes und bei PI 952 um ein dualtropes HI-Virus. Die Zahlen in Klammern zeigen die Deletion der jeweiligen Glycosylierungsstelle durch Punktmutation des Glycosylierungsmotivs vom HIV-1-NL4-3 gp120 N-Terminus aus gezählt an. Die Deletion der Glycosylierungsstelle 15 bei pNL952(-15) bewirkt eine Veränderung des Tropismus des Virus von dualtrop zu X4-monotrop.

Das Plasmid pET22b_{B-Domäne} codiert für die B-Domäne des West-Nil E-Proteins. Am C-Terminus des Proteins ist ein His-Tag angehängt zur affinitätschromatographischen Aufreinigung des Proteins.

2.6 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-West-Nil E-Protein (Maus)	Bernhard-Nocht-Institut
Anti-Dengue E-Protein, Serum (Human)	Bernhard-Nocht-Institut
Anti-Gelbfieber E-Protein (Maus) AK63	Robert-Koch-Institut, Berlin
Anti-Hanta G-Protein, Serum (Kaninchen)	Bernhard-Nocht-Institut
Anti-HIV-1-p24 (Kaninchen)	Prof. H. G. Kräusslich, Heidelberg
Anti-Kaninchen IgG, AP (Ziege)	Sigma-Aldrich (München)
Anti-Maus IgG, FITC	Sigma-Aldrich (München)
Anti-Human IgG, FITC	Sigma-Aldrich (München)
Anti-Kaninchen IgG, FITC	Sigma-Aldrich (München)

2.7 Verwendete Kits

Artikelbezeichnung	Hersteller
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit	Roche (Mannheim)
BCA Protein Assay	Pierce (Rockford, IL, USA)
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden in Zellkulturschalen und -flaschen (Greiner) kultiviert. Als Wachstumsmedium für die HeLa- und TZM-bl-Zellen wurde DMEM (Life Technologies) verwendet, welches mit 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin sowie 5 % FCS supplementiert war. Diese Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Vero B4-Zellen wurden in L15-Medium mit 5 % FCS bei 37 °C ohne CO₂ kultiviert.

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und mit Trypsin/EDTA (Life Technologies) von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst (5 min 37 °C). Es wurden ca 5-10 ml Kulturmedium hinzugegeben, 1/20 der Suspension wurde zurückbehalten und mit frischem Medium in die Zellkulturflasche zurückgegeben.

3.1.2 Einfrieren von Zellen

Konfluent gewachsene Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Medium aufgenommen und bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen einer Flasche in 500 µl FCS resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt, mit dem gleichen Volumen 20 % DMSO-Lösung in PBS versetzt und für 10 min bei 0 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Kryoröhrchen über Nacht bei –80 °C eingefroren und am nächsten Tag in ein Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff überführt und dort gelagert.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Die in Kryoröhrchen gelagerten Zellen wurden in 15 ml Medium aufgetaut. Zur Entfernung des DMSO wurden die Zellen mit PBS gewaschen, bei 500 g sedimentiert, wieder in 15 ml Medium aufgenommen und in Gewebekulturflaschen überführt.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl und des Kulturzustandes

Um Anzahl und Zustand von Zellen in einer Suspension zu ermitteln, wurde ein Teil der Zellsuspension in Trypanblau 1:5-1:20 verdünnt. Durch den Einbau von Trypanblau in die Membran abgestorbener Zellen konnte das Verhältnis lebender Zellen zu toten Zellen ermittelt werden und so der Zustand der Kultur kontrolliert werden. Die Anzahl der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop mittels einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Hierbei wurden in der Kammer eingravierte Zählfelder zur Hilfe genommen, deren Volumen jeweils 0,1 µl betrug.

3.1.5 Apoptose-Test

Der Apoptose-Test wurde mit dem *in situ cell death detection kit* der Firma Boehringer (Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch diesen Test werden apoptotische Zellen fluoreszenzmarkiert und können im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden.

3.1.6 ³H-Thymidin Test

Mit Hilfe des ³H-Thymidin Tests wurde die Toxizität von VEBP ermittelt. Der verringerte Einbau von Tritium-markiertem Thymidin bei Anwesenheit von modifiziertem HSA deutet auf einen negativen Einfluss des oxidierten Proteins auf den Zellstoffwechsel und damit auf eine toxische Wirkung hin.

Zunächst wurden die Zellen durch 20-stündige Inkubation bei 37 ° C in FCS-freiem Medium synchronisiert. Daraufhin wurden die Zellen in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten ausgesät (15000 pro Kavität) und für 20 Stunden in Vollmedium bei 37 °C inkubiert. Nach einer weiteren Synchronisation für 20 Stunden wie oben beschrieben wurden die Zellen für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen VEBP in 200 µl Vollmedium pro Kavität inkubiert. Dann wurde zu jeder Kavität 10 µl einer 1 µCi ³H-Thymidin enthaltenden Mediumlösung gegeben. Weitere 16 h später wurde die Zellkulturplatte bis zur Auswertung des Tests eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen jeder Kavität mit Hilfe einer Saugapparatur auf eine Cellulose-Membran übertragen. Nicht eingebautes ³H-Thymidin wurde dabei weggespült. Die Membran

wurde in einer Mikrowelle getrocknet. Es wurde Szintillationsflüssigkeit auf die Membran gegeben und diese in Plastikfolie eingeschweißt. Die Membran konnte dann im β -Counter ausgewertet werden.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Bakterienkulturen wurden aus Einzelkolonien gewonnen. Dazu wurde eine flüssige Bakterienkultur in Form eines Vereinzlungsausstriches auf eine LB-Agarplatte verteilt und 12-16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit sind aus den vereinzelt Bakterien Kolonien entstanden. Die Platte konnte für einen begrenzten Zeitraum mit Parafilm verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Für eine langfristige Lagerung wurde eine Glycerol-Gefrierkultur angelegt. Dafür wurde eine einzelne Bakterienkolonie in LB-Medium für 12-16 h bei 37 °C im Bakterienrührer inkubiert. In einem sterilen Einfrierröhrchen wurden 0,5 ml der Flüssigkultur mit 0,5 ml sterilem Glycerol vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kultur wurde daraufhin bei -70 °C gelagert.

3.2.2 Herstellung von kompetenten Bakterien

Die kompetenten Bakterien wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt. Von einer am Vortag ausgestrichenen XL-1 Bakterienkultur wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium suspendiert und über Nacht bei 37 °C im Bakterienrührer inkubiert. Mit 2,5 ml dieser Vorkultur wurde eine 250 ml Kultur in SOB Medium angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37 °C im Bakterienrührer inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in vorgekühlten Zentrifugenbechern sedimentiert (2500 x g, 10 min, 4 °C, Heraeus Sepatech Suprafuge 22), direkt im Anschluss vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2500 x g, 10 min, 4 °C Heraeus Sepatech Suprafuge 22) wurden die Bakterien in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % zugegeben. Nach

10 min Inkubation auf Eis wurde die Bakteriensuspension in sterile, vorgekühlte 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.3 Restriktion von DNA

Das Schneiden der DNA (Sambrook *et al.*, 1989) erfolgte mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen. Die enzymatischen Reaktionen wurden in den für die jeweiligen Enzyme vom Hersteller vorgegebenen Puffern durchgeführt.

Für einen 10µl Ansatz wurden

1 µl	10 x Puffer
1-2 µg	DNA
2 U	Restriktionsenzym/µgDNA
ad 10 µl	H ₂ O ad inject.

zugegeben.

Der Ansatz wurde bei der jeweils optimalen Reaktionstemperatur 15-60 min inkubiert. Die geschnittene DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.2.4 Ligation von DNA

Bei der Ligation (Bolivar *et al.*, 1977) katalysiert die T4-Ligase die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat- und einer benachbarten 3'-Hydroxylgruppe, wodurch DNA-Fragmente mit glatten oder überstehenden Enden miteinander verknüpft werden können.

Die Ligation des linearisierten Vektors mit dem entsprechenden DNA Fragment wurde in einem 10 µl Ansatz durchgeführt: Hierzu wurden

1 µl	10x Ligase Puffer
1 µl	T4 Ligase
2 µl	linearisierter Vektor(100 ng/µl)
3 µl	DNA Fragment
ad 10 µl	H ₂ O ad inject.

Das molare Verhältnis von Fragment zu Vektor betrug 1:3 bis 1:5. Der Ansatz wurde über Nacht bei 8 °C im Kühlschrank inkubiert und in die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

3.2.5 Transformation von *E. Coli*

Für die Transformation von *E. coli* (Hanahan, 1983) wurden pro Transformationsansatz 100 µl kompetente Bakterien aufgetaut, zu der Plasmid-DNA (0,1 – 100 ng) gegeben, 30 min auf Eis und danach 90 s bei 42 °C inkubiert. Die Transformationsansätze wurden mit 500 µl LB-Medium versetzt und für 1 h in ein 37 °C Wasserbad gegeben, um die Expression des Resistenzgenproduktes zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurden die LB-Amp-Platten ohne Deckel in den 37 °C-Brutschrank gestellt, um die Oberfläche des Agars auszutrocknen. Die gesamten Transformationsansätze wurden auf den so vorbereiteten LB-Amp-Platten ausgestrichen und die Platten mit der Bakterienseite nach unten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.6 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Verfahren der alkalischen Lyse. Es wurden das Plasmid-Aufreinigungs-Kit „NucleoSpin Plasmid“ der Firma Macherey & Nagel nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.7 Reinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Reaktionen wurde mit Produkten der Firmen Macherey & Nagel sowie Roche nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.8 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch über die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ bestimmt (Sambrook *et al.*, 1989). Zusätzlich wurde die Reinheit der aufgereinigten Plasmid-DNA über die Bestimmung des Quotienten $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ geprüft.

Die DNA-Lösung wurde hierzu 1:100 in Wasser verdünnt und die Extinktion bei den beiden Wellenlängen in einer Quarzküvette im UV-Spektrometer (Shimazu-160A) gemessen.

3.2.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden nach dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierung wurde mit dem „CEQ 2000 DTCS QuickstartKit“ nach Herstellerangaben durchgeführt und mit dem *CEQ 2000 DNA Analysis System* von Beckman Coulter analysiert.

3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größenauftrennung von DNA erfolgte über eine Agarose-Horizontal-Gelelektrophorese. Einer 0,7-2 %igen handwarmen TAE-Agaroselösung wurde 2 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Lösung wurde in eine vorbereitete Gelkammer mit aufgesetztem Kamm gegossen. Nach Erstarren der Agaroselösung wurde der Kamm entfernt und das Gel in einer mit TAE-Puffer gefüllten Flachbettkammer beladen, wobei die Proben zuvor mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt wurden. Zur Größenbestimmung der DNA wurden jeweils 3 µl eines Molekulargewichtsmarkers aufgetragen.

Es wurde eine Spannung von 60-90 Volt angelegt, was etwa 10 Volt pro cm Gellänge entsprach. Nach der Elektrophorese konnte die DNA durch Interkalation des Ethidiumbromids auf einem UV-Durchlichttisch (Kodak, Deutschland) bei $\lambda=254$ nm als orange Bande sichtbar gemacht werden und mit einer Videodokumentationsanlage (Sony, Deutschland) dokumentiert werden. Alternativ konnte die gewünschte DNA-Bande auch mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Die DNA wurde dann aus dem Gel extrahiert.

3.3 Proteinanalytische Methoden

3.3.1 BCA-Assay

Der BCA-Assay (Davis & Radke, 1987) wurde mittels eines BCA-Assay-Kits nach Anweisungen des Herstellers (Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Nach Mischung von 50 Teilen Lösung A mit 1 Teil Lösung B wurden 1 ml dieser Mischung zu 50 µl der zu untersuchenden Proteinlösung oder zu 50 µl des BSA-Proteinstandards gegeben. Die Ansätze wurden anschließend für 30 min auf 60 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurden die Extinktionen der Proben in Mikroküvetten bei 562 nm im Photometer bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Vergleich der Meßwerte der Proben mit denen der Eichlösungen.

3.3.2 SDS-PAGE

Zur SDS-PAGE wurde das Minigel-System der Firma BioRad eingesetzt. Die Gele hatten eine Trenngelgröße von 70 x 90 x 1 mm und wurden in folgender Zusammensetzung entsprechend den Herstellerangaben gegossen:

Sammelgel:	6 % (w/v)	Acrylamid
	125 mM	Tris/HCl pH 6,8
	0,1 % (w/v)	SDS
	10 % (v/v)	Glycerin
	0,03 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
	0,24 % (v/v)	TEMED

Trenngel:	15 % (w/v)	Acrylamid
	750 mM	Tris/HCl pH 9,3
	0,1 % (w/v)	SDS
	10 % (v/v)	Glycerin
	0,03 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
	0,14 % (v/v)	TEMED

2x Probenpuffer: 55 mM Tris/HCl pH 6,8
 4 % (w/v) SDS
 40 % (v/v) Glycerin
 4,3 % (v/v) β -Mercaptoethanol
 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Laufpuffer: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0,1 % (w/v) SDS

Die zu untersuchenden Proben wurden mit der gleichen Menge Probenpuffer versetzt, 3 min aufgekocht, gekühlt und auf das Gel aufgetragen. Je nach Wahl des Kammes konnten zwischen 15 und 50 μ l aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 10 mA, bis die Proben etwa 1 cm ins Trenngel eingelaufen waren, dann wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht. Beim Austreten der Bromphenol-Bande aus dem Gel wurde die Elektrophorese beendet.

3.3.3 Proteinfärbungen

3.3.3.1 Coomassie-Färbung

Das zu färbende Gel wurde zunächst etwa 1 h lang unter leichtem Schwenken bei RT in Coomassie-Färbelösung (0,1 % (w/v) Serva Blue G, 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) inkubiert. Die Färbelösung wurde entfernt, das Gel 3x kurz mit Wasser gewaschen und danach durch 30 minütige Inkubation in etwa 200 ml SDS-Entfärber (7,5 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Ethanol) der überflüssige Farbstoff ausgewaschen. Gegebenenfalls wurde erneut mit SDS-Entfärber inkubiert, um den Kontrast zu vergrößern.

3.3.3.2 Silberfärbung

Die Silberfärbungen wurden nach Heukeshoven und Dernick (1985) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mindestens 1 h lang in 30 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure fixiert. Die Gele wurden dann mit Wasser gewaschen

(mindestens 2 h). Im Anschluß wurden die Gele 1 h in 30 % (v/v) Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5 % (w/v) Glutaraldehyd und 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat inkubiert. Die Gele wurden dann 3 x für 10 min mit Wasser gewaschen und 1 h mit 0,1 % (w/v) Silbernitrat und 0,01 % (w/v) Formaldehyd behandelt. Nach einem kurzen Waschschrift mit Wasser wurde die Entwicklung durch Zugabe von 2,5 % (w/v) Natriumcarbonat und 0,005 % (w/v) Formaldehyd gestartet. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Färbung durch Zugabe von 50 mM EDTA-Lösung gestoppt.

3.3.3.3 Kupferfärbung

Die Färbung wurde entsprechend der Vorschrift von Lee *et al.* (1987) durchgeführt. Nach der SDS-PAGE wird das Gel 3 x für 3 min in Wasser gewaschen. Dann wird das Gel für 5 min in der Kupfer-Färbelösung (0,3 M CuCl₂) inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit Wasser können die Gele auf einem schwarzen Untergrund betrachtet und dokumentiert werden. Die Proteinbanden sind ungefärbt, während der Rest des Gels weisslich trübe gefärbt ist.

3.3.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzen wurden in Deckgläschen mit acht Kavitäten der Firma Falcon durchgeführt. In jede der Kavitäten wurden 25000 Zellen ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde im Sicherheitslabor der Stufe 3 eine Suspension des jeweils zu untersuchenden Virus in Medium hergestellt, die 1000 TCID₅₀ des jeweiligen Virusüberstandes entsprach. Die Zellen wurden mit dieser Suspension für 1 h bei 37 °C inkubiert und daraufhin 2 x mit PBS gewaschen. Es wurde frisches Medium zugegeben und die Zellen wurden weitere 48 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Methanol für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden 3 x mit je 300 µl PBS pro Depot gewaschen und dann für 1-3 h mit dem primären Antikörper (in PBS mit 2 % (v/v) FCS entsprechend verdünnt) bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde mit dem sekundären Antikörper (in PBS mit 2 % (v/v) FCS verdünnt) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Wieder wurde 3 x mit PBS gewaschen und die Deckgläschen an der Luft getrocknet. Die Zellen wurden dann mit Vecta-shield (mit DAPI) überschichtet und mit einem Deckglas überlagert. Mit handelsüblichem Nagellack wurden die Ränder

des Deckglases versiegelt. In dieser Form konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und anschließend im Kühlschrank unter Lichtausschluß gelagert werden.

3.3.5 Surface Plasmon Resonance (SPR) Messungen

Das Phänomen der Surface Plasmon Resonance (SPR) wurde zuerst von Kretschmann und Raether (1967) beschrieben. An der Grenzfläche zweier transparenter Stoffe mit unterschiedlichen Brechungsindices wird Licht, das von der Seite des Stoffes mit dem höheren Brechungsindex eingestrahlt wird, teilweise reflektiert und teilweise gebrochen. Wird ein bestimmter, kritischer Einstrahlwinkel überschritten, tritt an dieser Grenze keine Lichtbrechung sondern nur noch Reflektion auf. Jedoch dringt bei dieser Reflektion eine Komponente des elektromagnetischen Feldes, die sogenannte instationäre Welle, in den Stoff mit geringerem Brechungsindex ein. Ist die Grenzfläche zwischen diesen beiden Stoffen mit einer dünnen Metallschicht überzogen und wird monochromatisches Licht eingestrahlt, so wird die Intensität des reflektierten Lichtes bei einem bestimmten Einstrahlwinkel (SPR-Winkel) deutlich herabgesetzt, was einen scharfen Schatten im Emissionsspektrum bewirkt. Der SPR-Winkel hängt unter anderem von dem Brechungsindex des Stoffes an der nicht beleuchteten Seite der Oberfläche ab, welcher wiederum durch die darin gelösten Bestandteile beeinflusst wird. Diese Abhängigkeit des SPR-Winkels kann dazu benutzt werden, Konzentrationsänderungen an der Oberfläche der nicht beleuchteten Seite zu messen.

SPR Untersuchungen zur Protein-Protein Wechselwirkung wurden mit dem Biacore 1000 Instrument (Biacore AB) durchgeführt wie vom Hersteller empfohlen. Die Meßzelle besteht aus einer Glasoberfläche, die mit einer dünnen Goldschicht überzogen ist, auf der eine Dextran-Matrix aufgebracht ist. Sie ist in vier Flußzellen unterteilt. Das Meßsignal wird in *resonance units* (RU; $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg/mm}^2$) angegeben.

Die Immobilisierung erfolgte auf einem CM5-Sensorchip (Biacore). Nach Aktivierung der Carboxylgruppen der Matrix durch die Injektion von EDC/NHS (BiaCore) für 6 min wurden die gewünschten Liganden kovalent gebunden. Hierzu muss das gewünschte Protein in gereinigter Form in einem amingruppenfreien Puffer vorliegen. Das Protein wurde in 10 mM Acetat-Puffer pH 4 verdünnt, so dass es in einer Endkonzentration von etwa 1 µg/ml vorlag. Diese Proteinlösung wurde für 6 min injiziert. Die danach noch vorliegenden aktivierten Carboxylgruppen wurden durch 6 minütige Injektion von Ethanolamin abgesättigt. Alle Schritte der Immobilisierung von Liganden wurden bei

einer Flussrate von 5 µl/min durchgeführt. Der so vorbereitete Sensorchip konnte dann für Interaktionsmessungen mit Proteinen und auch Virionen verwendet werden. Nach jeder Messung musste der Sensorchip regeneriert werden, um gebundene Proteine zu entfernen und dadurch weitere Messungen mit dem Sensorchip durchführen zu können. Dies wurde in der Regel durch mehrfache, 20 s dauernde Injektionen bei einer Flussrate von 100 µl/min mit 100 mM HCl erreicht.

3.3.6 HOCl-Modifikation von Proteinen

Für die Oxidation von humanem Serumalbumin (HSA) durch HOCl wurde zunächst die HOCl-Stammlösung 1:100 in PBS pH 7,4 verdünnt. Der pH Wert wurde auf pH 7,4 eingestellt und mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten für (OCl)⁻ bei 292 nm ($\epsilon_{292\text{nm}} = 350 \text{ l} \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) wurde die (OCl)⁻-Konzentration der Lösung im Photometer ermittelt. Daraufhin wurde eine Lösung von HSA (1 mg/ml in PBS pH 7,4) mit dem gewünschten molaren Überschuss an HOCl für 15 min auf Eis inkubiert. Das überschüssige HOCl wurde dann durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10 Säulen (Pharmacia) entsprechend den Angaben des Herstellers entfernt. Die Proteinfractionen aller Säulen wurde gesammelt. Die Proteinkonzentration wurde durch einen BCA-Assay (siehe 3.3.1) bestimmt und das modifizierte HSA wurde aliquotiert bei -20 °C gelagert.

3.4 Virologische Methoden

3.4.1 *Bluecell*-Infektionstest

TZM-BL 13 Indikatorzellen wurden in einer Zellkulturplatte mit 96 Kavitäten ausgesät (15000 pro Kavität) und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit unterschiedlichen HIV-1-Varianten in Anwesenheit verschiedener VEBP-Konzentrationen durch Zugabe von in Medium verdünntem infektiösem HIV-1-Überstand infiziert. Die Menge des zugegebenen HIV-1 Virusüberstandes wurde in vorherigen Versuchen titriert, so dass in Abwesenheit von VEBP etwa 500 Zellen pro Kavität infiziert wurden. Die Zellen wurden weitere 48 h bei

37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und dann mit 2 %iger Formaldehydlösung für 10 min fixiert. Nach einem kurzen Waschschrift mit PBS wurde in jede Kavität 100 µl X-Gal-Lösung (1 mg/ml X-Gal, 25 mM Kaliumferrocyanid, 25 mM Kaliumferricyanid, 2 mM Magnesiumchlorid in PBS) gegeben. Da die TZM-Zellen als Reportergen β -Galactosidase bei der Infektion mit HIV-1 exprimieren, wurden durch die Zugabe von X-Gal die infizierten Zellen blau angefärbt. Die Infektionsereignisse ließen sich so einfach unter dem Lichtmikroskop auszählen.

3.4.2 p24-Antigen-ELISA

Zunächst wurde der anti-p24 *Catching*-Antikörper (D7320, Biochrom) an eine MAXIsorp Platte (Nunc, USA) mit 96 Kavitäten gebunden. Der Antikörper wurde in *Coating*-Puffer in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. In jede Kavität wurden 100 µl der Antikörperlösung gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und nach der Bindung des *Catching*-Antikörpers sechsmal mit PBS/Tween gewaschen. Die Platte wurde getrocknet und mit 300 µl Blockpuffer pro Kavität für 1-2 Stunden inkubiert, um freie Bindungsstellen abzublocken und so unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nach der Inkubation wurde die Platte einmal gewaschen, getrocknet und 100 µl der zu untersuchenden Zellkulturüberstände je Kavität zugegeben. Die Bindung des p24-Antigens erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 8 °C. Nach der Antigen-Bindung wurde die Platte 6 x gewaschen und trocken geschlagen. Der zweite Antikörper, ein anti-HIV Kaninchenserum wurde in einer Verdünnung von 1:2000 auf die trockene Platte gebracht (100 µl je Kavität). Die Platte wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut sechsmal gewaschen und die Platte trocken geschlagen. Der dritte Antikörper (anti-Kaninchen-IgG, Alkalische Phosphatase gekoppelt, Sigma) wurde in einer Verdünnung von 1:2000 auf die trockene Platte aufgebracht (100 µl je Kavität). Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte wieder gewaschen und trocken geschlagen, jedoch wurde für die letzten drei Waschschriffe H₂O bidest. verwendet. Es wurden 100 µl p-Nitrophenylphosphat-Substratlösung (*Alkaline Phosphatase Substrate Kit*, BioRad), die zuvor nach Herstellerangaben angesetzt wurde, auf die trockene Platte gebracht. Die Reaktion wurde nach 5-10 min mit 100 µl 0,4 M NaOH gestoppt und die Enzym-Substratreaktion, die mit der Menge an p24-Antigen korreliert, mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei einer OD von 405 nm ausgewertet. Der p24-Gehalt

der Proben wurde anhand einer Standardkurve ermittelt. Diese ergab sich aus der Messung der OD_{405nm} einer halblogarithmischen Verdünnung von standardisiertem p24-Protein.

3.4.3 Bestimmung der TCID₅₀

Die TCID₅₀ (*tissue culture infective dose*) gibt an, welches Volumen eines Virusüberstandes benötigt wird, um mit 50 %iger Wahrscheinlichkeit eine Infektion einer Zellkultur zu verursachen. Die Bestimmung erfolgte für HIV über den Nachweis der Infektion im Bluecell-Infektionstest (siehe 3.4.1), bei den anderen Viren wurde die Infektion durch indirekte Immunfluoreszenz (siehe 3.3.4) detektiert.

Für jeden Virusüberstand wurde in einer sechsfachen Verdünnungsreihe die Verdünnung bestimmt, bei der eine Infektion der jeweiligen Zellkultur nach 48 h nachzuweisen war. Die Berechnung wird an folgendem Beispiel erläutert:

Ansatz	Verdünnung				
	5 ⁻⁴	5 ⁻⁵	5 ⁻⁶	5 ⁻⁷	5 ⁻⁸
1	x	x	x	-	-
2	x	x	x	-	-
3	x	x	x	x	-
4	x	x	x	x	-
5	x	x	x	-	-
6	x	x	x	-	-

X = Infektion; - = keine Infektion

Bis zu einer Verdünnung des Virusüberstandes von 5⁻⁶ ist in allen sechs Ansätzen eine Infektion zu detektieren, bei 5⁻⁷ nur noch bei zwei Ansätzen und bei 5⁻⁸ in keinem der Ansätze mehr. Die Berechnung der TCID₅₀ erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$$\log \text{TCID}_{50} = \log 1,0 - \log \text{int} * (\text{S}-0,5)$$

hierbei ist: log 1,0 = log der höchsten Verdünnung mit R = 1,0

R = Reaktionsrate

log int = log des Verdünnungsintervalls

S = Summe der Reaktionsraten

Die Reaktionsraten geben den Anteil der infizierten Ansätze einer Verdünnungsstufe von der Gesamtzahl der Ansätze an. In dem obigen Beispiel sind die Reaktionsraten $R = 1,0$ (6/6) für die Verdünnung 5^{-6} , $R = 0,67$ (4/6) für die Verdünnung 5^{-7} und $R = 0$ (0/6) für die Verdünnung 10^{-8} . Die Summe der Reaktionsraten S beträgt damit 1,67. Der Wert für $\log 1,0$ ist: $(\log 5^{-6}) = -4,19$, der Wert für $\log 0,67$ ist bei dem gewählten Verdünnungsfaktor $5 = \log 5 = 0,699$

Somit sind alle Unbekannten der obigen Gleichung bestimmt. Durch Einsetzen in die Formel erhält man:

$$\log \text{TCID}_{50} = -4,19 - 0,699 * (1,67 - 0,5)$$

$$\log \text{TCID}_{50} = -5,01$$

$$\text{TCID}_{50} = 9,8 * 10^{-6}$$

Die TCID_{50} des Virusüberstandes aus dem obigen Beispiel beträgt somit $9,8 * 10^{-6}$.

3.4.4 Herstellung infektiöser Virusüberstände

3.4.4.1 HIV-1

Um aus HIV-1 codierender DNA funktionelle Viren zu erhalten, wurden die pNL4-3 Vektoren in HeLa-Zellen transfiziert. Hierfür wurde das FuGene-Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben verwendet. In Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen pro Kavität ausgesät. Nach 16-20 h konnten die Zellen mit der Plasmid-DNA transfiziert werden. Dazu wurde zunächst 6 μl FuGene-Transfektionsreagenz in ca. 100 μl Medium ohne Zusätze gelöst. Zu dieser Lösung wurde 1 μg Plasmid-DNA gegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz in den vorbereiteten HeLa-Zellkulturen verteilt. Die Zellen wurden 3 Tage inkubiert (37 °C, 5 % CO_2). Nach dieser Zeit war in den Kulturen nach erfolgreicher Transfektion im Lichtmikroskop ausgeprägte Synzytienbildung zu sehen. Der virushaltige Kulturüberstand wurde abgenommen und Zellreste sedimentiert. Der virushaltige Überstand wurde in Einfrierröhrchen (Nunc, USA) aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.4.4.2 West-Nil Virus

Vero B4-Zellen wurden in einer 75 cm² Gewebekulturflasche ausgesät. Sobald die Kultur 50 % Konfluenz erreicht hatte, wurden 200 µl infektiöser West-Nil Virusüberstand vom Stamm Wengler hinzugegeben. Vier bis fünf Tage nach der Zugabe wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Zellreste wurden durch Sedimentation bei 2000 g für 5 min aus dem Überstand entfernt und der Überstand wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff gelagert. Die TCID₅₀ wurde anschließend durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt. Hierbei diente anti-West-Nil E-Protein (Maus) als erster Antikörper (1:1000), als zweiter Antikörper wurde FITC-markierter anti-Maus IgG-Antikörper (1:1000) verwendet.

3.4.4.3 Dengue-2 Virus

Vero B4-Zellen wurden in einer 75 cm² Gewebekulturflasche ausgesät. Sobald die Kultur 50 % Konfluenz erreicht hatte, wurden 200 µl infektiöser Dengue-2 Virusüberstand vom Stamm New Guinea C hinzugegeben. Zwei Tage nach der Zugabe wurden die Zellen passagiert und dabei auf 2 Gewebekulturflaschen verteilt. Weitere drei Tage später wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Zellreste wurden durch Sedimentation bei 2000 g für 5 min aus dem Überstand entfernt und der Überstand wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff gelagert. Die TCID₅₀ wurde anschließend durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt. Hierbei diente anti-Dengue E-Protein (Human) als erster Antikörper (1:200), als zweiter Antikörper wurde FITC-markierter anti-Human IgG-Antikörper (1:1000) verwendet.

3.4.4.4 Gelbfieber-Virus

Vero B4-Zellen wurden in einer 75 cm² Gewebekulturflasche ausgesät. Sobald die Kultur 50 % Konfluenz erreicht hatte, wurden 200 µl infektiöser Gelbfieber-Virusüberstand vom Impfstamm 17D hinzugegeben. Vier Tage nach der Zugabe wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Zellreste wurden durch Sedimentation bei 2000 g für 5 min aus dem Überstand entfernt und der Überstand wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff gelagert. Die TCID₅₀ wurde anschließend durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt. Hierbei diente anti-Gelbfieber E-Protein (Maus) als erster Antikörper

(1:1000), als zweiter Antikörper wurde FITC-markierter anti-Maus IgG-Antikörper (1:1000) verwendet.

3.4.4.5 Hantaan-Virus

Vero B4-Zellen wurden in einer 75 cm² Gewebekulturflasche ausgesät. Sobald die Kultur 50 % Konfluenz erreicht hatte, wurden 200 µl infektiöser Hantaan-Virusüberstand vom Stamm 76-118 hinzugegeben. Acht Tage nach der Zugabe wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Zellreste wurden durch Sedimentation bei 2000 g für 5 min aus dem Überstand entfernt und der Überstand wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff gelagert. Die TCID₅₀ wurde anschließend durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt. Hierbei diente anti-Hanta G-Protein (Kaninchen) als erster Antikörper (1:5000), als zweiter Antikörper wurde FITC-markierter anti-Kaninchen IgG-Antikörper (1:1000) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse von HOCl-modifiziertem HSA

4.1.1 SDS-PAGE von HSA und HOCl-modifiziertem HSA

Um erste Hinweise auf die Auswirkungen der Oxidation von HSA durch HOCl zu erhalten, wurde eine SDS-PAGE von HSA, das mit HOCl in verschiedenen molaren Verhältnissen umgesetzt wurde, durchgeführt.

Hierzu wurde zunächst HSA bei 0 °C mit HOCl in unterschiedlichen molaren Verhältnissen (ohne HOCl und mit HOCl in 20-, 100- und 500-fachem molaren Überschuss) für 15 min bei pH 7,4 oxidiert. Überschüssiges HOCl wurde danach durch Gelfiltration mit PD10-Säulen (Pharmacia) abgetrennt und die Reaktion dadurch gestoppt. Die Proteinmenge der nach der Filtration erhaltenen HOCl-freien Proteinfraction wurde mittels eines BCA-Assays bestimmt. Von dem auf verschiedene Weise umgesetzten HSA wurde jeweils 1 µg auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine durch eine Silberfärbung visualisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt.

Die mit M markierten Spuren zeigen die beiden unterschiedlichen Größenmarker. In Spur 1 wurde unmodifiziertes HSA aufgetragen, die Spuren 2 bis 4 zeigen HSA mit HOCl im molaren Verhältnis von 1 zu 20 (HSA zu HOCl, Spur 2), 1 zu 100 (Spur 3) und 1 zu 500 (Spur 4) umgesetzt.

Deutlich zu erkennen sind leichte Verunreinigungen in dem kommerziell erworbenen HSA. Neben der HSA-Bande bei 68 kDa sind weitere Proteinbanden zu erkennen. Bei der Umsetzung mit HSA im molaren Verhältnis von 1 zu 20 (Spur 2) treten neue Proteinbanden auf, die sowohl größer als auch kleiner als das ursprüngliche HSA sind. Bei weiterer Erhöhung des HOCl-Überschusses (100-fach, Spur 3) scheinen die Proteine keine distinkte Größe wie noch in Spur 2 zu haben, sondern es zeigt sich eine scheinbar kontinuierliche Größenverteilung von größer als 250 kDa bis zu etwa 20 kDa. Eine weitere Erhöhung des HOCl-Überschusses (Spur 4) bewirkt eine Verschiebung der Proteingrößen hin zu kleineren Proteinfragmenten von einer Größe zwischen 68 und etwa 15 kDa. Die Größenverteilung scheint wie schon in Spur 3 kontinuierlich innerhalb der angegebenen Größe zu sein.

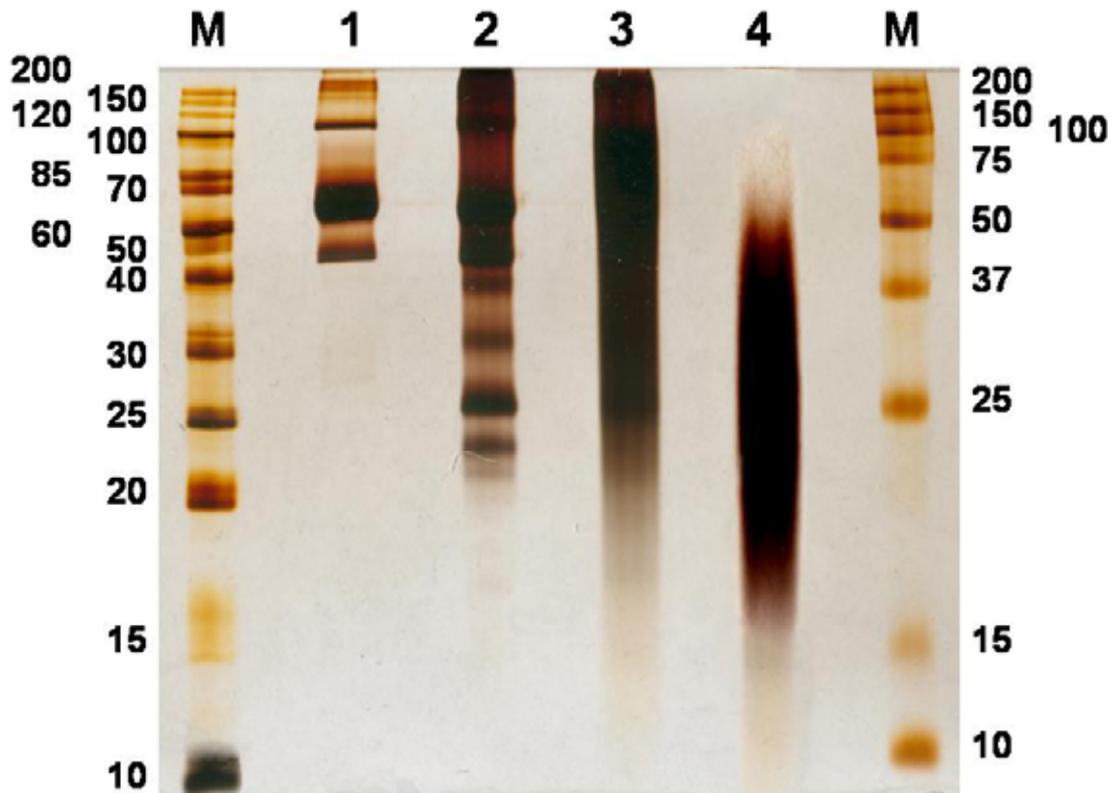


Abbildung 5: Silberfärbung einer SDS-PAGE von in unterschiedlichen molaren Verhältnissen mit HOCl umgesetzttem HSA.

M = Marker (Größe der Markerproteine in kDa an jeweiliger Seite angegeben)

1 = HSA

2 = HSA:HOCl 1:20

3 = HSA:HOCl 1:100

4 = HSA:HOCl 1:500

4.1.2 Nachweis von HSA und HOCl-modifiziertem HSA in der SDS-PAGE durch Kupfer-, Coomassie- und Silberfärbung

Um weitere Hinweise auf die Eigenschaften der in 4.1.1 beschriebenen, durch Oxidation mit HOCl in verschiedenen molaren Verhältnissen hergestellten Proteine zu erhalten, wurden diese nach der SDS-PAGE durch verschiedene Färbungen visualisiert. Hierzu wurden 3 identisch beladene SDS-Gele verwendet (Abbildung 6 A, B und C). Die mit M bezeichnete Spur zeigt jeweils den Marker, Spur 1 zeigt nicht modifiziertes HSA, Spur 2, 3 und 4 jeweils HSA, das mit HOCl im molaren Verhältnis von 1 zu 20, 1 zu 100 bzw. 1 zu 500 wie bereits in 4.1.1 beschrieben modifiziert wurde. In allen Spuren wurde jeweils 1 µg Protein aufgetragen. Die Proteine in Gel A wurden durch Coomassie-, in Gel B durch Kupfer- und in Gel C durch Silberfärbung visualisiert. Bei allen drei Färbungen ist in Spur 1 deutlich die HSA-Bande bei 68 kDa zu erkennen. Das 1 zu 20 mit HOCl modifizierte HSA in Spur 2 ist bei allen Färbungen ebenfalls ähnlich angefärbt, hier erkennt man jedoch deutlich, wie auch schon bei Spur 1, die höhere Sensitivität der Silberfärbung. In Spur 3 erkennt man, dass sich ein Großteil der Proteine weder durch Coomassie- noch durch Kupferfärbung visualisieren lassen, während diese bei der Silberfärbung deutlich zu sehen sind. Dies gilt vor allem für Proteine, die eine von 68 kDa deutlich verschiedene Größe haben. In Spur 4 lassen sich die aufgetragenen Proteine nur noch durch eine Silberfärbung sichtbar machen, sowohl bei Coomassie- als auch bei Kupferfärbung sind keine Proteinbanden zu erkennen, obwohl die Silberfärbung des identischen Gels eindeutig Proteine mit einer Größe zwischen 68 und kleiner 20 kDa anfärbt.

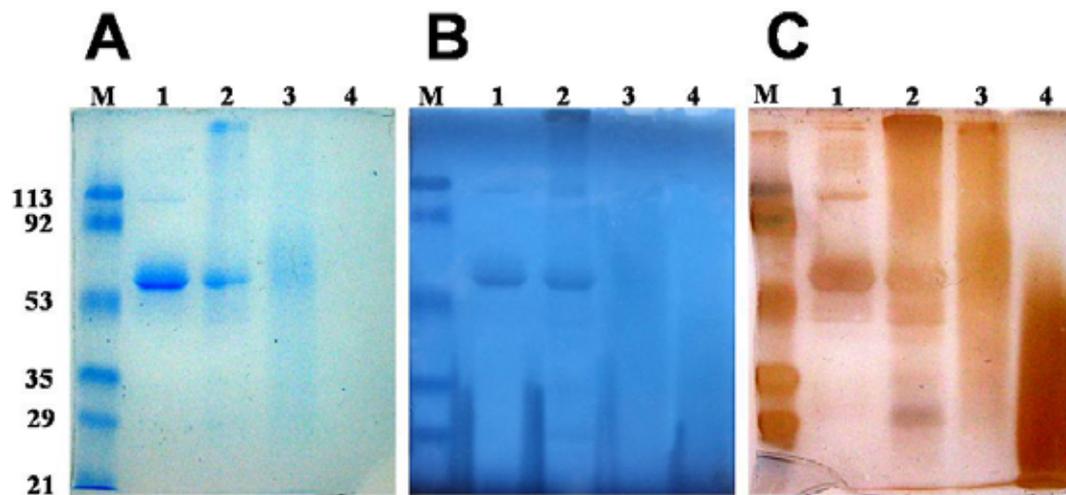


Abbildung 6: Coomassie- (A), Kupfer- (B) und Silberfärbung (C) einer SDS-PAGE von in unterschiedlichen molaren Verhältnissen mit HOCl umgesetzttem HSA.

Die Spurbelegung ist in allen drei Gelen gleich:

M = Marker (Größe der Proteine in kDa auf der linken Seite angegeben)

1 = HSA

2 = HSA:HOCl 1:20

3 = HSA:HOCl 1:100

4 = HSA:HOCl 1:500

Die drei Gele zeigen, dass die Detektion von modifiziertem HSA mittels Kupfer- und Coomassie-Färbung behindert wird, während die Silberfärbung verstärkt wird.

4.1.3 Anlagerung von HSA und HOCl-modifiziertem HSA an Dextran

Voraussetzung für die kovalente Kopplung von Proteinen an die Dextranoberfläche eines CM5 Sensorchips ist die räumliche Nähe des Proteins zur Dextranoberfläche. Dies wird in der Regel durch Verdünnen des Proteins vor der Injektion (Injektion: die Zugabe der jeweiligen Lösung über den Injektionsport des Biacore1000-Gerätes, über den die Lösung vom Gerät in die Flusszelle geleitet wird) in 10 mM Acetat-Puffer pH 4 erreicht. Durch den niedrigen pH-Wert erhält das Protein eine positive Gesamtnettoladung und lagert sich an der negativ geladenen Dextranoberfläche an. Dies ist jedoch nur möglich, wenn der isoelektrische Punkt des Proteins bei einem pH-Wert von etwa 5 oder darüber liegt. Bei Proteinen mit einem unbekanntem isoelektrischen Punkt wird deswegen in der Regel zunächst die Anlagerungsfähigkeit an die Dextranmatrix mit einer zuvor nicht durch EDC/NHS-Injektion aktivierten Chipoberfläche getestet, um nicht unnötig Sensorchips zu vergeuden. Genau dieser Test wurde im folgenden mit HSA und mit HOCl im molaren Verhältnis von 1:500 (HSA:HOCl) modifiziertem HSA durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Lösungen von HSA und modifiziertem HSA (je 1 mg/ml in PBS pH 7,4) 1:200 in 10 mM Acetat-Puffer pH 4 verdünnt. Diese Proteinverdünnungen wurden daraufhin für je 20 min bei einer Flussrate von 10 µl/min auf die unbehandelte Oberfläche eines CM5-Sensorchips injiziert. Die erhaltenen Sensorgramme sind zum Vergleich in Abbildung 7 überlagert dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass HSA stark auf der Dextranoberfläche akkumuliert. Nach 20 Minuten Injektion haben sich etwa 16400 RU HSA auf dem Sensorchip angelagert. Da eine kovalente Kopplung von HSA aufgrund der fehlenden vorhergehenden Aktivierung der Sensorchipoberfläche nicht erfolgte, wird das angelagerte HSA vom Laufpuffer (HBS-EP) nach der Injektion wieder gewaschen. Bei der Injektion von modifiziertem HSA dagegen sieht man überhaupt keine Akkumulation an der Sensorchipoberfläche. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass modifiziertes HSA im Gegensatz zu HSA eine stark veränderte Gesamtnettoladung aufweisen könnte. Im Biacore-Verfahren können stark negativ geladene Proteine nicht an CM5-Sensorchips gekoppelt werden, da sie sich an die negativ geladene Dextranoberfläche nicht anlagern. Aus diesem Grund werden Sensorchips mit einer HOCl-modifizierten HSA-Oberfläche wie im folgenden Punkt (siehe 4.1.4) beschrieben hergestellt.

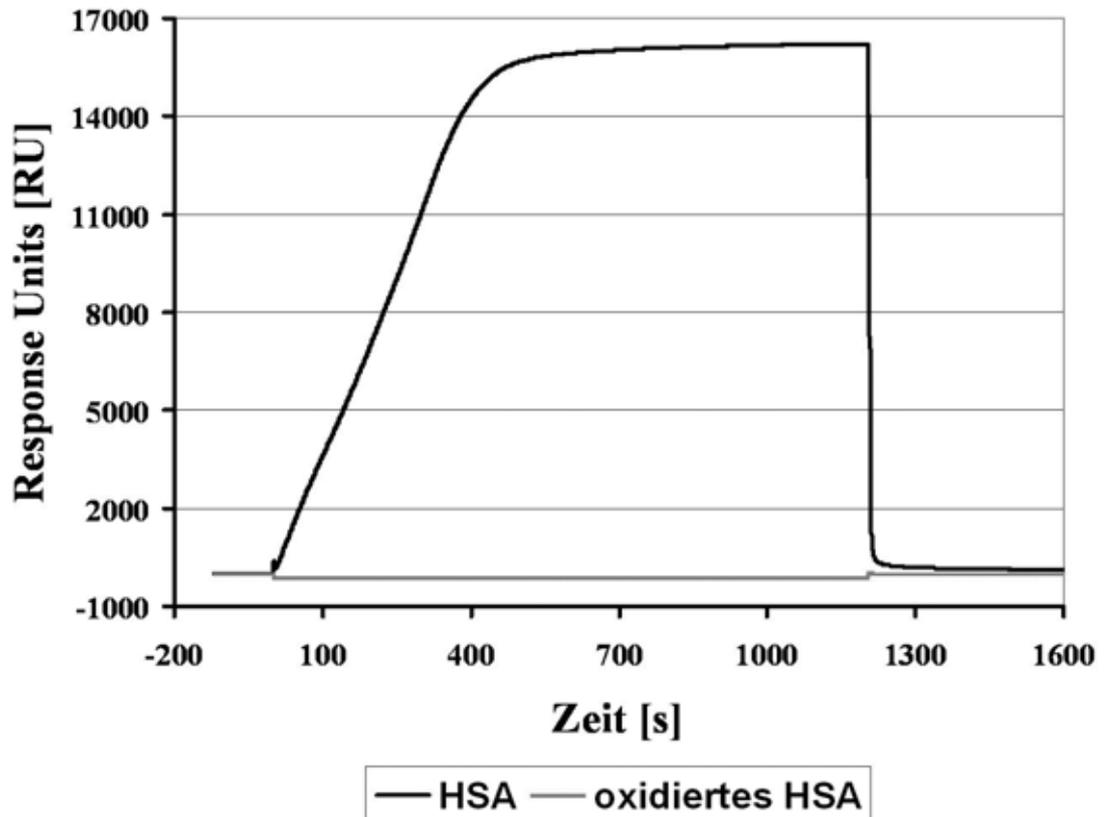


Abbildung 7: Überlagerung von Sensorgrammen, die die Anlagerung von HSA bzw. modifiziertem HSA an die Dextranoberfläche eines CM5-Sensorchips zeigen.

HSA bzw. im molaren Verhältnis von 1:500 (HSA:HOCl) mit HOCl modifiziertes HSA (je 1 mg/ml in PBS) wurden je 1:200 in 10 mM Acetatpuffer pH 4 verdünnt und für 20 min bei einer Flussrate von 10 μ l/min auf eine unbehandelte CM5-Sensorchipoberfläche injiziert.

Die Abbildung zeigt, dass sich das HOCl-modifizierte HSA nicht an die Oberfläche eines CM5-Sensorchips anlagert. Dagegen beobachtete man eine Anlagerung von HSA im Bereich von etwa 15000 RU.

4.1.4 Massendifferenz von immobilisiertem HSA vor und nach der Modifikation mit HOCl

Zunächst wurde HSA an die Oberfläche eines CM5 Sensorchips kovalent gekoppelt. Hierzu wurde die Sensorchipoberfläche durch die 10 minütige Injektion von EDC/NHS aktiviert (Teil A in Abbildung 8). Die kovalente Kopplung von HSA erfolgte durch die Injektion (10 min) einer 1 zu 100 Verdünnung von HSA (1 mg/ml in PBS) in 10 mM Acetat-Puffer pH 4 (B). Die nach der kovalenten Kopplung von HSA nicht benutzten Bindungsstellen der Chipoberfläche wurden durch Injektion von Ethanolamin (10 min) abgesättigt (C). Es wurden etwa 6800 RU HSA gekoppelt (D). Daraufhin wurde der Sensorchip aus dem Gerät entfernt und das an die Sensorchipoberfläche gekoppelte HSA wurde durch die Zugabe von HOCl-haltigem PBS pH 7,4 für 15 min bei 0 °C im molaren Verhältnis (HSA:HOCl) von 1:500 oxidiert. Der Sensorchip wurde wieder in das Biacore-Gerät eingesteckt und es wurde für 15 Minuten Ethanolamin injiziert, um nicht kovalent gebundene Proteinreste zu entfernen (E). Nach der Modifikation waren noch etwa 3400 RU Protein auf dem Sensorchip immobilisiert (F), also noch etwa 50 % der Proteinmenge, die vor der HOCl-Oxidation immobilisiert war.

Daher ist davon auszugehen, dass die Behandlung des gekoppelten HSA mit hohen HOCl-Konzentrationen auf dem Sensorchip zu Proteinablösungen oder auch Proteindegradation führt. Trotzdem wurden Oberflächen erhalten, die für weitere Interaktionsmessungen sehr gut geeignet waren. Weitere Proteinablösung oder Degradation wurde nicht beobachtet. Die Menge des gekoppelten, modifizierten HSA entsprach mit 3400 RU der von der Firma Biacore für Interaktionsmessungen zwischen Proteinen empfohlenen Menge.

Die so hergestellten Sensorchips wurden in weiteren Studien für die Messung der Interaktion des modifizierten HSA mit HIV gp120, mit der West-Nil B-Domäne sowie mit HI-Viruspartikeln eingesetzt.

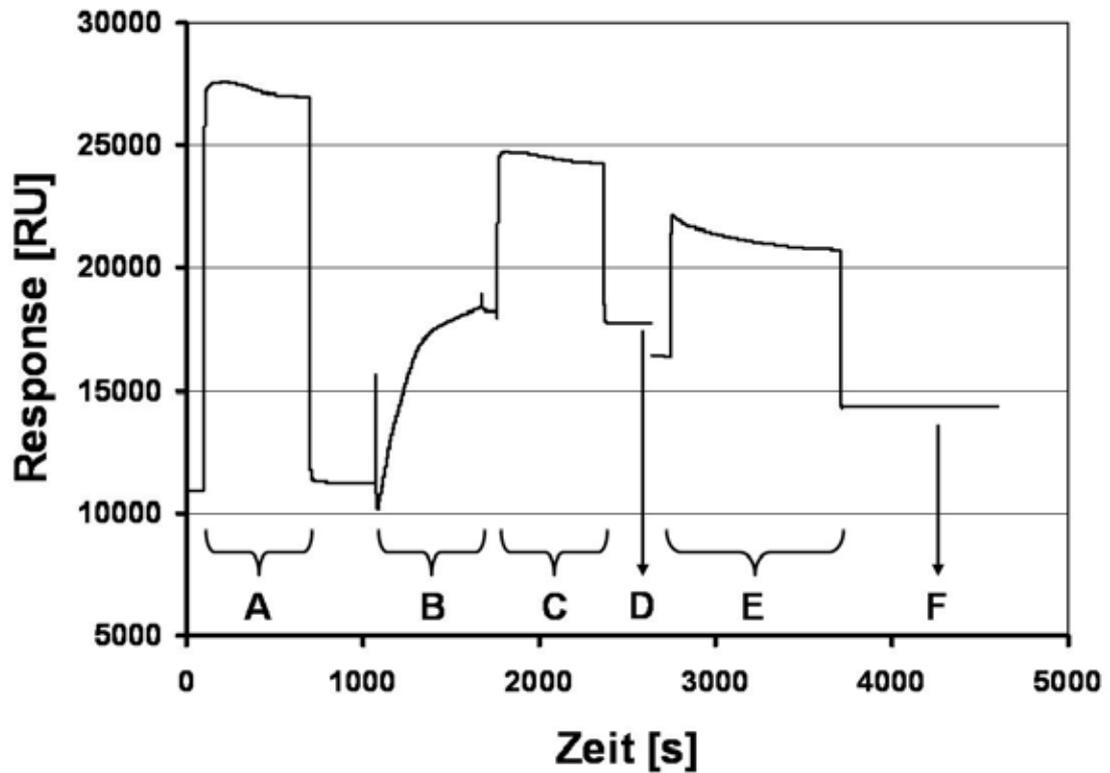


Abbildung 8: Sensorgramm der Kopplung von HSA an einen CM5-Sensorchip mit anschließender HOCl-Modifikation.

(A): Aktivierung der Dextranmatrix durch Injektion von EDC/NHS (10 min)

(B): Kovalente Kopplung durch Injektion von HSA (10 min)

(C): Inaktivierung unbenutzter Kopplungsstellen durch Injektion von Ethanolamin (10 min)

(D) Kovalent gekoppeltes HSA: 6783 RU; (E) Inaktivierung durch Injektion von Ethanolamin (15 min) nach externer HOCl-Modifikation

(F): Kovalent gekoppeltes VEBP: 3401 RU.

4.1.5 Interaktionsmessungen zwischen HIV gp120 und HOCl-modifiziertem HSA

Hierzu wurde gp120 IIIB auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Zunächst wurde für 10 min EDC/NHS-Lösung injiziert. Die kovalente Kopplung des gp120 erfolgte anschliessend durch 10 minütige Injektion einer 1:100 Verdünnung von gp120 (0,5 mg/ml in PBS) in 10 mM Acetat pH 4. Im Anschluss an die Kopplung wurden die nicht verwendeten Bindungsstellen auf der Sensorchipoberfläche durch Injektion (10 min) von 0,5 M Ethanolamin pH 8,5 abgesättigt. Auf diese Weise wurden 3000 RU gp120 IIIB auf dem Sensorchip immobilisiert. Als Referenzoberfläche zur Messung der unspezifischen Hintergrund-Interaktion von modifiziertem HSA wurde auf einer anderen Flusszelle des Sensorchips eine äquimolare Menge BSA (5800 RU) auf die oben beschriebene Weise immobilisiert. Mit dem so vorbereiteten Sensorchip wurden die Messungen durchgeführt. Die Injektion von HOCl-modifiziertem HSA erfolgte für jeweils 330s. Die Messungen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml modifiziertes HSA in PBS pH 7,4) jeweils auf der gp120-Oberfläche als auch auf der Kontrolloberfläche (BSA) durchgeführt. Mit Hilfe der Bia-Evaluation-Software konnten die erhaltenen Sensorgramme der Referenzoberfläche von den Sensorgrammen der gp120-Oberfläche abgezogen werden, so dass zum besseren Vergleich die bereits referenzsubtrahierten Sensorgramme in Abbildung 9 übereinander gelagert dargestellt werden konnten.

Man kann deutlich eine konzentrationsabhängige Interaktion des modifiziertem HSA mit gp120 IIIB erkennen. Zwei Minuten nach Ende der Injektion von modifiziertem HSA (bei 450 s in Abbildung 9) sind bei einer Konzentration von 50 µg/ml modifiziertem HSA noch etwa 92 RU gebunden, während bei geringeren Konzentrationen auch jeweils weniger modifiziertes HSA gebunden bleibt (25 µg/ml: 66 RU; 10 µg/ml: 30 RU; 5 µg/ml: 14 RU; 1 µg/ml: -1 RU). Dies belegt eindeutig eine Bindung von modifiziertem HSA an gp120 IIIB. Es war auch möglich, aus den SPR-Daten die Bindungskonstante K_D für die Bindung von gp120 an VEBP zu bestimmen. Hierzu wurde das Molekulargewicht des modifizierten HSA anhand der SDS-PAGE in Abbildung 5 mit 30 kDa angenommen. Es ergab sich eine $K_D = 3 \cdot 10^{-8}$ M. Damit ist die Stärke der VEBP-gp120 Interaktion in etwa vergleichbar mit der Stärke von Antikörper-Antigen-Interaktionen.

Weil mit HOCl modifiziertes HSA an gp120 bindet, wurde das durch die Oxidation entstandene Protein mit der Abkürzung VEBP (für *virus envelope binding protein*) bezeichnet. Der von nun an in dieser Dissertation benutzte Begriff VEBP bezieht sich immer auf im 500-fachen molaren Überschuss mit HOCl modifiziertes HSA.

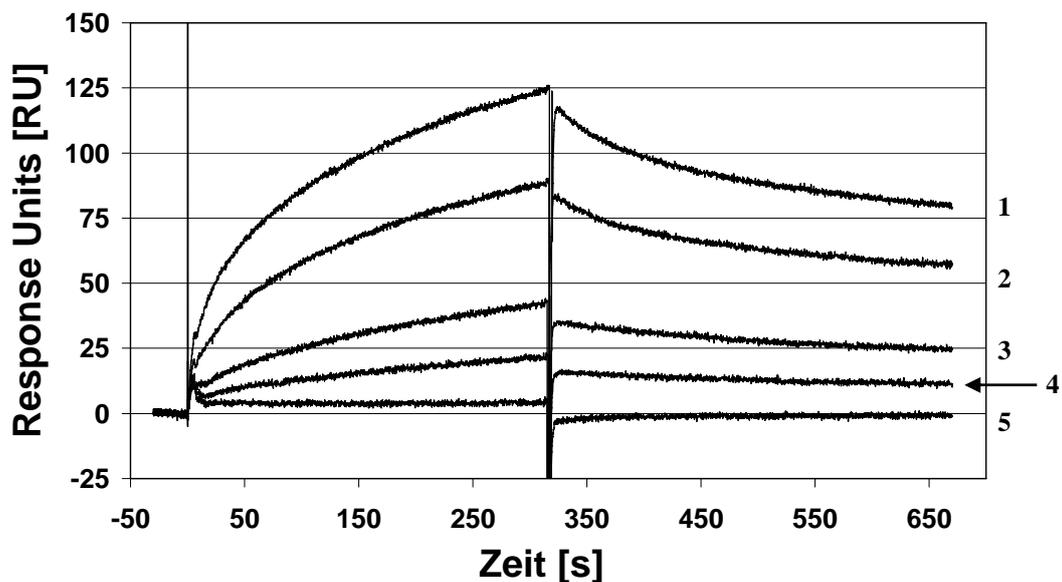


Abbildung 9: Überlagerung von mehreren referenzsubstrahierten Sensorgrammen von der Bindung unterschiedlicher Konzentrationen von modifiziertem HSA an immobilisiertes gp120 III B. 3000 RU HIV gp120 III B wurden auf einem CM5-Sensorchip (Biacore) immobilisiert. Als Referenzoberfläche diente immobilisiertes BSA (5800 RU). Unterschiedliche Konzentrationen von modifiziertem HSA wurden für 330 s injiziert. Zwei Minuten nach Injektionsende wurden für die eingesetzten VEBP-Konzentrationen folgende Bindungswerte erhalten (jeweils in Klammern):

Sensorgramm 1: 50 $\mu\text{g/ml}$ VEBP (92 RU)

Sensorgramm 2: 25 $\mu\text{g/ml}$ VEBP (66 RU)

Sensorgramm 3: 10 $\mu\text{g/ml}$ VEBP (30 RU)

Sensorgramm 4: 5 $\mu\text{g/ml}$ VEBP (14 RU)

Sensorgramm 5: 1 $\mu\text{g/ml}$ VEBP (-1 RU)

Aufgrund der hier dargestellten Bindung von HOCl-modifiziertem HSA an gp120 wird das modifizierte HSA mit dem Begriff VEBP (für *virus envelope binding protein*) bezeichnet.

4.2 Inhibition der HIV-1-Infektion

Nachdem die Bindung von VEBP an gp120 IIIB durch SPR-Messungen nachgewiesen wurde, sollte nun untersucht werden, ob das Protein HIV neutralisiert.

4.2.1 Neutralisation der HIV-1-Infektion von TZM-bl-Zellen

Es wurde zunächst VEBP durch 15 minütige Inkubation von HSA mit 500-fachem molaren Überschuss von HOCl bei 0 °C hergestellt. Überschüssiges HOCl wurde durch Gelfiltration mit PD10 Säulen abgetrennt, die VEBP-Konzentration der Proteinfraktion wurde durch einen BCA-Assay bestimmt. Als Virus für die Inhibitionsversuche wurde der HIV-Laborstamm NL4-3 ausgewählt, da die Aminosäuresequenz des gp120 dieses Stammes mit der Aminosäuresequenz des in den SPR-Messungen verwendeten gp120 IIIB identisch ist. Infektiöse Viren wurden durch Transfektion von HeLa-Zellen mit dem Expressionsplasmid pNL4-3 erzeugt. Nach der Transfektion (48 h) wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände geerntet und die TCID₅₀ des Virusüberstandes wurde bestimmt. Für die Inhibitionsversuche wurden TZM-bl-Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten ausgesät und 24 h später in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen VEBP infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert, infizierte Zellen konnten durch X-Gal-Färbung nachgewiesen und ausgezählt werden. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Anzahl infizierter Zellen in Abwesenheit von VEBP wurde als 100 % definiert, die Anzahl der infizierten Zellen in Anwesenheit von VEBP entsprechend auf diesen Wert normiert.

Man sieht deutlich den inhibitorischen Effekt von VEBP. Schon bei 2 µg/ml VEBP sind 50 % weniger Zellen infiziert als in Abwesenheit von VEBP. Ab einer VEBP-Konzentration von 16 µg/ml kann eine Infektion der Zellen durch das HI-Virus NL4-3 nicht mehr nachgewiesen werden.

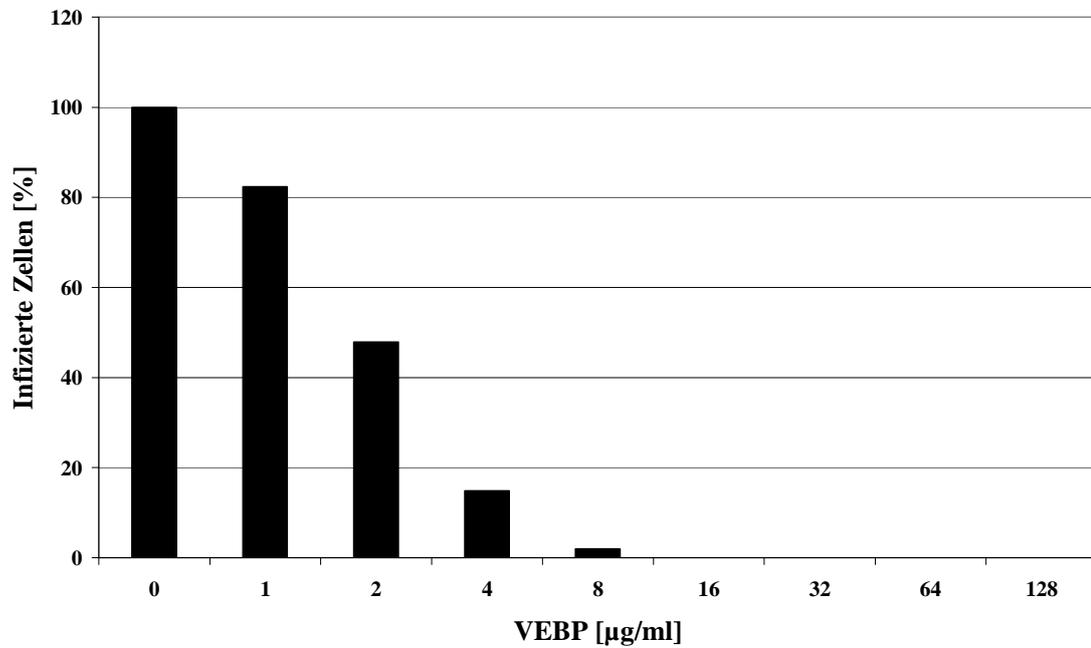


Abbildung 10: Inhibition der HIV-NL4-3-Infektion von TZM-bl-Zellen durch VEBP. TZM-bl-Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten ausgesät und 24 h später in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen VEBP infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert, infizierte Zellen konnten durch Färbung mit X-Gal nachgewiesen und ausgezählt werden. In der Abbildung ist zu sehen, dass die Infektion von Zellen mit HIV-1 neutralisiert wird. Die EC_{50} für VEBP beträgt 2 µg/ml.

4.2.2 Vitalität von TZM-bl-Zellen

Aufgrund der beobachteten Interaktion des VEBP mit HIV-1 gp120 liegt die Vermutung nahe, dass durch diese Interaktion der gp120-vermittelte Eintritt des Virus in die Zielzelle gestört wird. Es wäre jedoch auch denkbar, dass die Virusreplikation durch eine unspezifische, VEBP-vermittelte Hemmung des Zellstoffwechsels behindert wird. Daher wurden verschiedene Vitalitätstests mit VEBP und TZM-bl-Zellen durchgeführt.

4.2.2.1 Lichtmikroskopische Beobachtungen

TZM-bl-Zellen wurden auf Objektträger mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität). Nach 24 Stunden wurde das Medium durch VEBP-enthaltendes Medium unterschiedlicher Konzentration (zwischen 0 und 600 µg VEBP/ml) ausgetauscht und für weitere 48 h inkubiert. Die Zellen wurden dann unter dem Lichtmikroskop fotografiert, die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Bilder zeigen Zellen mit folgender VEBP-Konzentration: (A) ohne VEBP; (B) mit 600 µg/ml HSA (Kontrolle); (C) mit 50 µg/ml VEBP; (D) mit 100 µg/ml VEBP; (E) mit 150 µg/ml VEBP; (F) mit 200 µg/ml VEBP; (G) mit 300 µg/ml VEBP; (H) mit 400 µg/ml VEBP; (I) mit 600 µg/ml VEBP.

Man kann bis zu einer VEBP-Konzentration von 200 µg/ml (Bild F) keine negativen Auswirkungen auf Wachstum und Phänotyp von TZM-bl-Zellen feststellen. Erst dann sieht man leichte Auswirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit, die Zellen sind nicht mehr so dicht gewachsen wie in Bild A. Der Effekt wird mit steigender VEBP-Konzentration immer deutlicher, sehr ausgeprägt ist er aber erst in Bild I bei 600 µg/ml VEBP zu sehen. Hier ist dann auch zu sehen, dass die Zellen nicht nur langsamer wachsen, sondern auch in ihrem Phänotyp beeinflusst werden. Die Zellen erscheinen kugelig und nicht so vital wie in Bild A. Der Effekt ist auch bereits andeutungsweise in den Bildern G (300 µg/ml VEBP) und H (400 µg/ml VEBP) zu sehen. Bei den Konzentrationen, bei denen die antivirale Wirkung von VEBP beobachtet wurde (völlige Inhibition der Infektion bei 16 µg/ml VEBP) ist jedoch kein negativer Einfluss auf die Zellvitalität auszumachen.

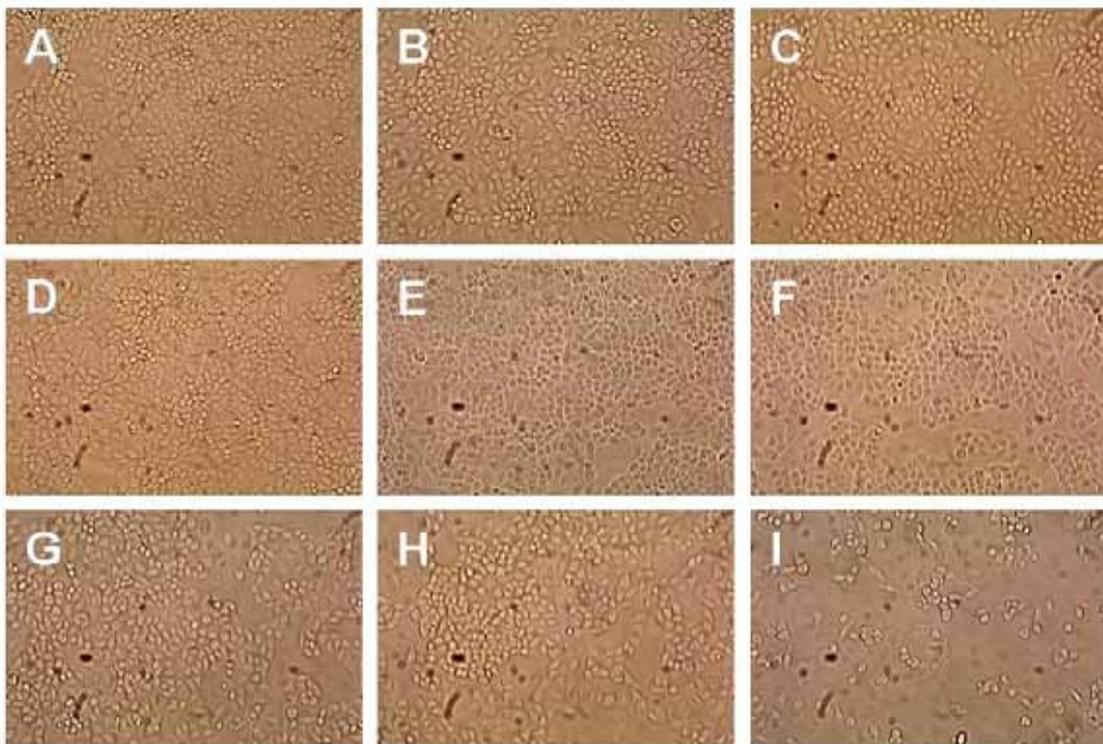


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von TZM-bl-Zellen. TZM-bl-Zellen wurden in einer Zellkulturplatte mit 96 Kavitäten ausgesät (15000 pro Kavität). Nach 16 h wurde das Medium gegen Medium mit verschiedenen Konzentrationen VEBP getauscht. Die Zellen wurden weitere 48 h bei 37 °C inkubiert und dann fotografiert. Das Medium der Ansätze A bis I enthielt folgende Zusätze:

- (A): kein Zusatz
- (B): 600 µg/ml HSA
- (C): 50 µg/ml VEBP
- (D): 100 µg/ml VEBP
- (E): 150 µg/ml VEBP
- (F): 200 µg/ml VEBP
- (G) 300 µg/ml VEBP
- (H): 400 µg/ml VEBP
- (I): 600 µg/ml VEBP

Bei Zugabe von 600 µg/ml ist zu erkennen, dass das Wachstum der TZM-Zellen eingeschränkt ist. Die Zellen erscheinen auch nicht so vital wie in Bild A. Bei den Konzentrationen, bei denen die Neutralisation von HIV-1 durch VEBP beobachtet wurde, ist kein negativer Einfluss von VEBP auf die Zellen zu erkennen.

4.2.2.2 ³H-Thymidintest

Die in Abbildung 11 gezeigten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen bei hohen VEBP-Konzentrationen einen Effekt auf das Wachstum von TZM-bl-Zellen. Deswegen wurde ein ³H-Thymidintest mit TZM-bl-Zellen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen VEBP durchgeführt. Bei diesem Test wird der Einbau von Tritium-markiertem Thymidin während der DNA-Neusynthese gemessen. Ein verminderter Einbau ist ein Zeichen für ein reduziertes Zellwachstum.

Zunächst wurden TZM-bl-Zellen durch Austausch des Zellkulturmediums gegen FCS-freies Medium für 24 h synchronisiert. Die synchronisierten Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten ausgesät, wiederum synchronisiert und dann für 24 h mit VEBP-haltigem Medium unterschiedlicher Konzentration (0, 50, 100, 150, 200, 300, 400 und 600 µg VEBP/ml) inkubiert. Daraufhin wurde in jede Kavität 0,2 µCi ³H-Thymidin gegeben. Nach weiteren 16 Stunden wurde der Versuch durch Einfrieren der Zellen und anschließende Auswertung des ³H-Thymidin-Einbaus im Tritium-Counter gestoppt. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 dargestellt.

Der Test zeigt, dass der Tritium-Einbau bei Zugabe von 50, 100, 150 und 200 µg VEBP/ml in etwa gleich stark auf einen Wert von jeweils etwa 90 % gegenüber den ohne VEBP wachsenden Zellen abfällt. Erst danach verstärkt sich der Abfall des Tritium-Einbaus sehr stark auf nur noch etwa 15 % bei 300 µg/ml VEBP und schließlich auf 6 % bzw. 2 % bei 400 und 600 µg VEBP/ml. Beim Kontrollversuch mit der Zugabe von 600 µg/ml HSA zum Kulturmedium ist kein Effekt zu erkennen.

In dem Bereich, in dem die antivirale Aktivität des VEBP gemessen wird (vollständige Neutralisation der HIV-Infektion bei Zugabe von 16 µg/ml VEBP), ist keine Schädigung der Zellen im ³H-Thymidintest nachzuweisen.

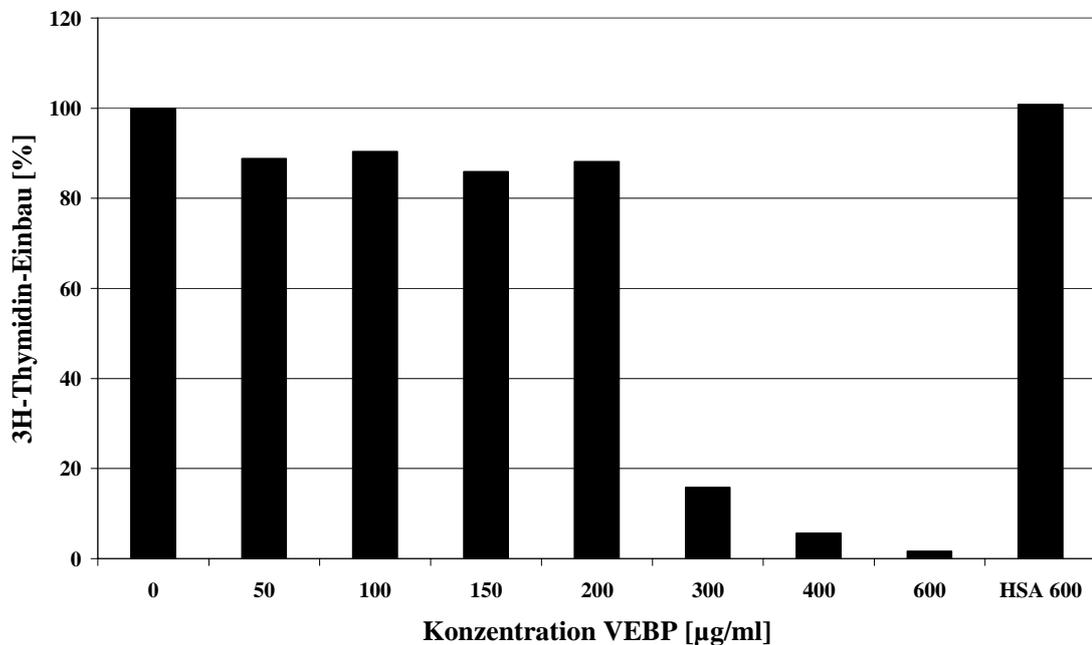


Abbildung 12: ³H-Thymidin-Test von TZM-bl-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen VEBP-Konzentrationen. TZM-bl-Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten ausgesät (15000/Kavität). Nach 12 Stunden wurden die Zellen durch einen Mediumwechsel auf FCS-freies Medium für 20 Stunden synchronisiert. Nach 6-stündiger Inkubation in FCS-haltigem Medium wurden die Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen VEBP inkubiert. Dann wurde in jede Kavität 0,2 µCi ³H-Thymidin gegeben. Weitere 16 Stunden später wurde der Test gestoppt und der ³H-Thymidin-Einbau gemessen.

Das Ergebnis des Tests zeigt, dass bei den antiviral wirksamen VEBP-Konzentrationen ($EC_{50} = 2 \mu\text{g/ml VEBP}$) keine Schädigung der Zellen beobachtet werden konnte.

4.2.2.3 Apoptose-Test

Mit den durchgeführten Apoptose-Tests sollte untersucht werden, ob durch die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von VEBP der Anteil der apoptotischen Zellen erhöht wird. Hierzu wurden TZM-bl-Zellen synchronisiert, auf Deckgläser mit acht Kavitäten ausgesät, wiederum synchronisiert und dann für 48 h in Anwesenheit unterschiedlicher VEBP-Konzentrationen im Kulturmedium (0, 100, 200, 300 und 600 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden dann fixiert und apoptotische Zellen konnten mit Hilfe des *In Situ* Cell Death Detection kits entsprechend den Angaben des Herstellers fluoreszenzmarkiert werden. Als Positivkontrolle wurden Zellen benutzt, deren Kern-DNA mit DNase I für 15 Minuten vor der Fluoreszenzmarkierung verdaut wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Im jeweils linken Bild ist die Kernfärbung dargestellt, durch die alle Zellen gefärbt sind und die dadurch zur Ermittlung der Gesamtzahl der Zellen benutzt wurde. Das mittlere Bild zeigt die fluoreszenzmarkierten apoptotischen Zellen. Eine Überlagerung beider Bilder ist im rechten Bild dargestellt.

Man erkennt, daß auch ohne VEBP im Kulturmedium (Bilderreihe A) apoptotische Zellen nachzuweisen sind. Durch die Zugabe von 100 µg/ml VEBP (Bilderreihe B) wird der Anteil dieser Zellen nicht beeinflusst. Auch die Erhöhung der VEBP-Konzentration im Kulturmedium auf 200 bzw. 300 µg/ml hat keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate. Erst bei Erhöhung der VEBP-Konzentration auf 600 µg/ml ist ein Effekt zu sehen, hier sind deutlich mehr Zellen apoptotisch als bei dem Versuchsansatz ohne VEBP.

Auch dieser Test zeigt deutlich, wie auch die vorhergehenden Untersuchungen, dass bei den antiviral wirksamen VEBP-Konzentrationen keine negativen Auswirkungen von VEBP auf die Zellvitalität zu beobachten sind.

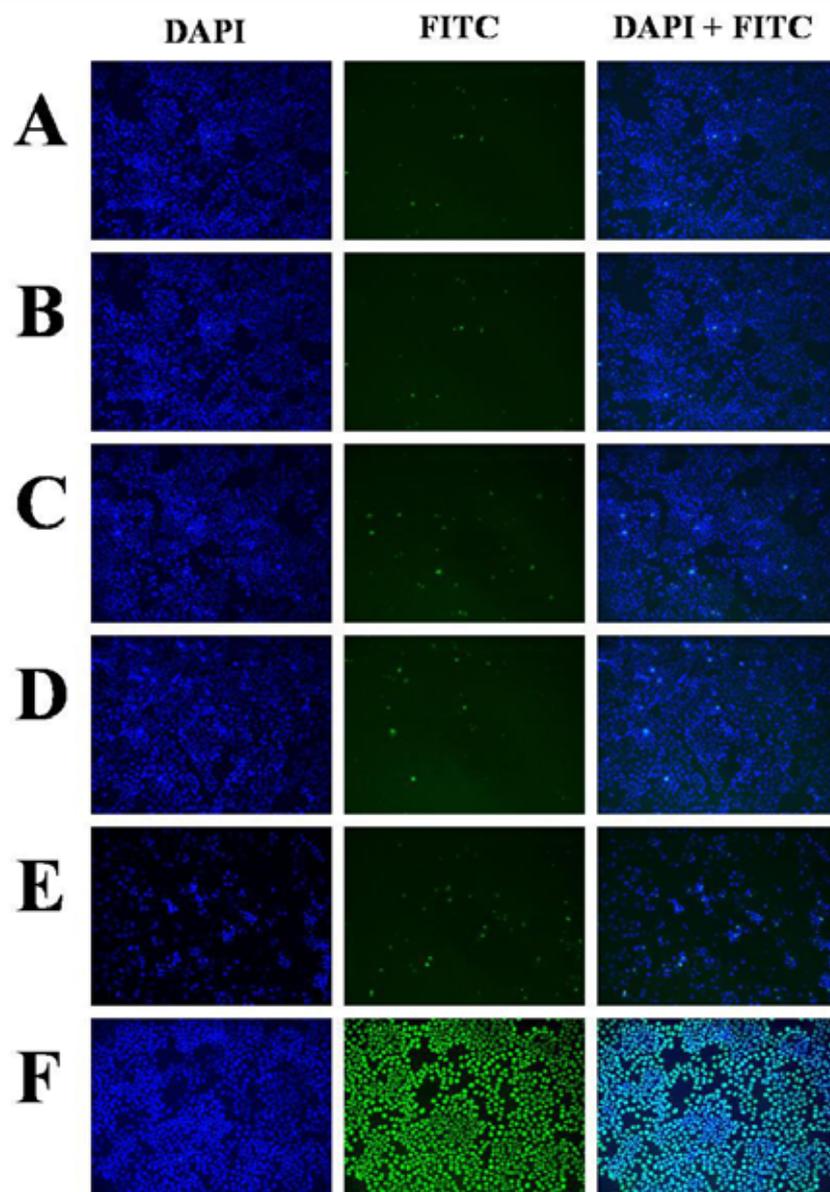


Abbildung 13: Apoptose-Test von TZM-bl-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen VEBP-Konzentrationen. TZM-bl-Zellen wurden synchronisiert, auf Deckgläser mit acht Kavitäten ausgesät, wiederum synchronisiert und dann für 48 h in Anwesenheit unterschiedlicher VEBP-Konzentrationen im Kulturmedium (A = 0, B = 100, C = 200, D = 300 und E = 600 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden dann fixiert und apoptotische Zellen konnten mit Hilfe des nach Methode 3.1.5 fluoreszenzmarkiert werden. Als Positivkontrolle (F) wurden Zellen benutzt, deren Kern-DNA mit DNase I für 15 Minuten vor der Fluoreszenzmarkierung verdaut wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Es wurde kein negativer Einfluss von VEBP auf die Apoptoserate festgestellt.

4.2.3 Infektionsversuche mit anderen Viren

In den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass VEBP die Infektion von Zellen mit HIV-1 *in vitro* unterbinden kann. Aufgrund der Ergebnisse der Vitalitätsmessungen mit TZM-bl-Zellen kann davon ausgegangen werden, dass eine Störung des Zellstoffwechsels und damit eine Störung der Replikation von HIV-1 nicht für den inhibitorischen Effekt von VEBP auf die Infektion von TZM-bl-Zellen mit HIV-1 verantwortlich ist. Wenn die Ursache für die beobachteten antiviralen Eigenschaften von VEBP tatsächlich die spezifische Interaktion mit HIV-1 gp120 ist, dann dürfte die Infektion von Zellen mit anderen Viren und deren Replikation nicht durch die Anwesenheit von VEBP beeinflusst werden. Dies soll in den folgenden Infektionsexperimenten mit Dengue-2- und Gelbfieber-Viren überprüft werden.

4.2.3.1 Infektion mit Gelbfieber-Virus

Es wurden Vero B4-Zellen in Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität) und nach 24 Stunden mit 1000 TCID₅₀ Gelbfieber-Virus in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen VEBP (von 0 bis 160 µg/ml) infiziert (1h). Dann wurde das Medium gegen virusfreies Medium mit VEBP-Konzentrationen von 0 bis 160 µg/ml gewechselt. Nach 60 Stunden wurden die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mit einem anti-YF-E-Protein sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, um die Gesamtzahl der Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Im jeweils linken Bild ist die DAPI-Kernfärbung zu sehen, das mittlere Bild zeigt die infizierten, mit FITC gefärbten Zellen. Rechts ist eine Überlagerung der beiden anderen Bilder dargestellt.

Die Bilder zeigen, dass sich die Infektion von Zellen mit Gelbfieber-Virus durch VEBP nicht inhibieren lässt. In Bilderreihe A sind keine infizierten Zellen zu sehen, hier wurde zu den Zellen auch kein Virus zugegeben. In Bilderreihe B wurde Gelbfieber-Virus eingesetzt, jedoch ohne die Anwesenheit von VEBP. Die Zellen sind zu 100 % infiziert. Wird nun VEBP während der Infektion und nach dem Mediumwechsel zugesetzt (Bilderreihen C bis G), so ist keine signifikante Änderung zu beobachten. Auch in Bilderreihe G, bei der der Zellkultur 160 µg/ml VEBP zugesetzt war, sind immer noch nahezu 100 % der Zellen mit Gelbfieber-Virus infiziert.

Dies bedeutet, dass selbst bei hohen VEBP-Konzentrationen die Vermehrung der Gelbfieber-Viren nicht beeinträchtigt wird. Auch in diesen Untersuchungen ist damit ein negativer Einfluss von VEBP auf die Zellen nicht zu erkennen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Neutralisation der HIV-Infektion spezifisch auf die Interaktion von VEBP mit dem viralen Glycoprotein gp120 zurückzuführen ist.

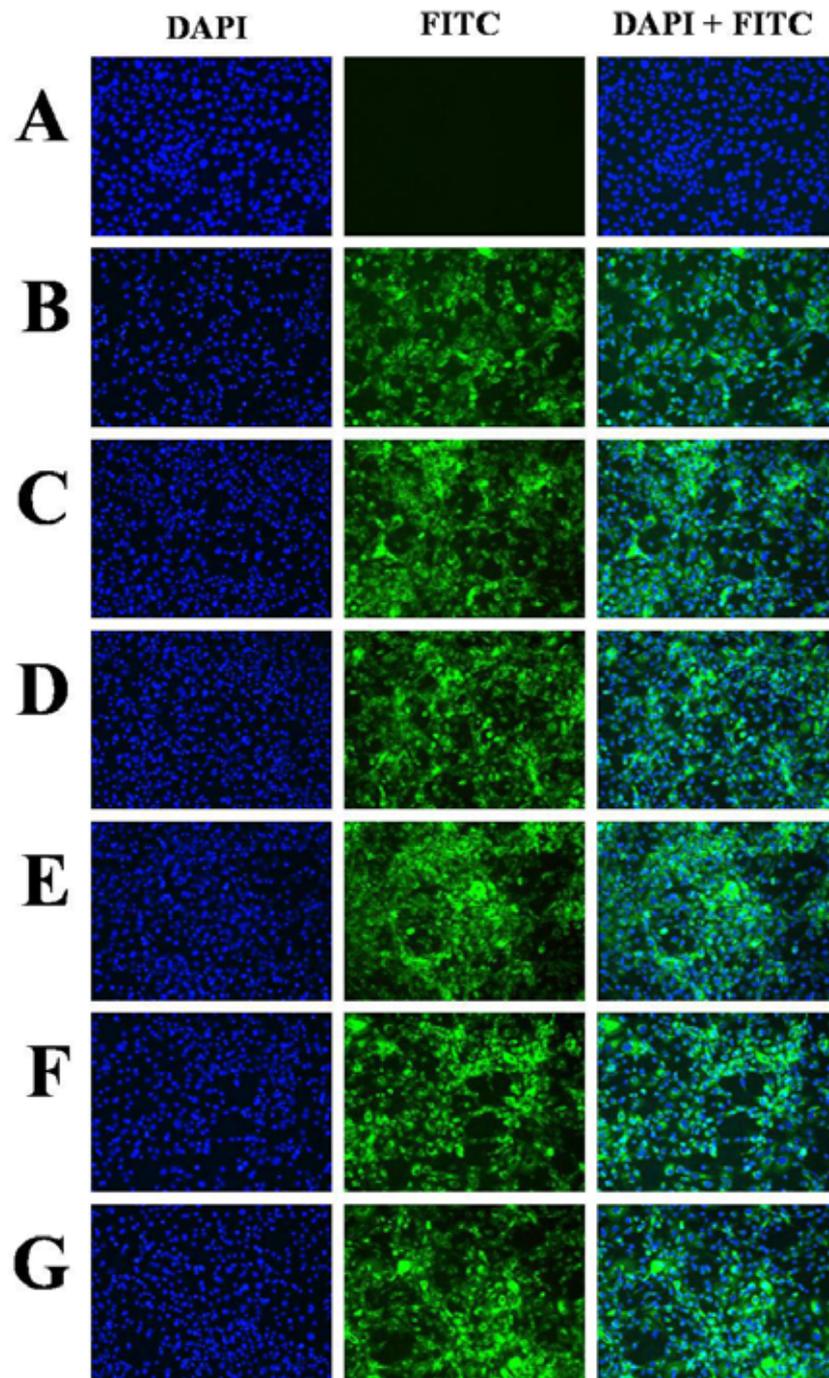


Abbildung 14: Immunfluoreszenzoptischer Nachweis der Inhibition der Gelbfieber-Infektion durch VEBP. Vero B4-Zellen wurden in Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität) und nach 24 h mit 1000 TCID₅₀ Gelbfieber-Virus in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen VEBP infiziert (1 h). Dann wurde das Medium gegen virusfreies mit entsprechender VEBP-Konzentration gewechselt. Nach 60 h wurden die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mit einem anti-Gelbfieber-E-Protein sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Dargestellt in (A) bis (G) sind die Ergebnisse mit verschiedenen VEBP-Konzentrationen: (A) = mock-Infektion, (B) = 0 µg/ml, (C) = 10 µg/ml, (D) = 20 µg/ml, (E) = 40 µg/ml, (F) = 80 µg/ml, (G) = 160 µg/ml. Es ist kein Effekt von VEBP auf die Infektion von Zellen mit Gelbfieber-Virus zu erkennen.

4.2.3.2 Infektion mit Dengue-2-Virus

Dengue-2-Viren gehören ebenso wie Gelbfieber-Viren zur Familie der Flaviviren. Es soll untersucht werden, ob VEBP einen inhibitorischen Einfluss auf die Infektion von Zellen mit Dengue-Viren hat.

Vero B4-Zellen wurden in Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität) und nach 24 Stunden mit Dengue-2-Virus (1000 TCID₅₀) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen VEBP infiziert (1h). Dann wurde das Medium gegen virusfreies mit entsprechender VEBP-Konzentration gewechselt. Nach 60 Stunden wurden die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mit einem humanem Dengue-Positivserum sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Im jeweils linken Bild ist die DAPI-Kernfärbung zu sehen, das mittlere Bild zeigt die infizierten, mit FITC gefärbten Zellen. Rechts ist eine Überlagerung der beiden anderen Bilder dargestellt.

Wie auch schon für Gelbfieber-Viren gezeigt, ist auch bei der Infektion von Zellen mit Dengue-2-Viren kein inhibitorischer Einfluss von VEBP festzustellen. In Bilderreihe A sind keine infizierten Zellen zu sehen, hier wurde zu den Zellen auch kein Virus zugegeben. In Bilderreihe B wurde Dengue-2-Virus eingesetzt, jedoch ohne die Anwesenheit von VEBP. Die Zellen sind zu nahezu 100 % infiziert. Wird nun VEBP während der Infektion und nach dem Mediumwechsel zugesetzt (Bilderreihen C bis G), so ist keine signifikante Änderung der Infektionsrate zu beobachten. Auch in Bilderreihe G, bei der der Zellkultur 160 µg/ml VEBP zugesetzt war, sind immer noch nahezu 100 % der Zellen mit Dengue-2-Viren infiziert.

Dies bedeutet, dass auch bei hohen VEBP-Konzentrationen die Infektion von Zellen mit Dengue-2-Virus nicht behindert wird. Damit wird auch hier, wie schon zuvor für die Infektion von Zellen mit Gelbfieber-Virus, gezeigt, dass auch hohe VEBP-Konzentrationen die Zellvitalität nicht negativ beeinflussen und damit die Infektion von Zellen beeinträchtigen. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die Neutralisation der HIV-1 Infektion auf die spezifische Interaktion von VEBP mit gp120 zurückzuführen ist.

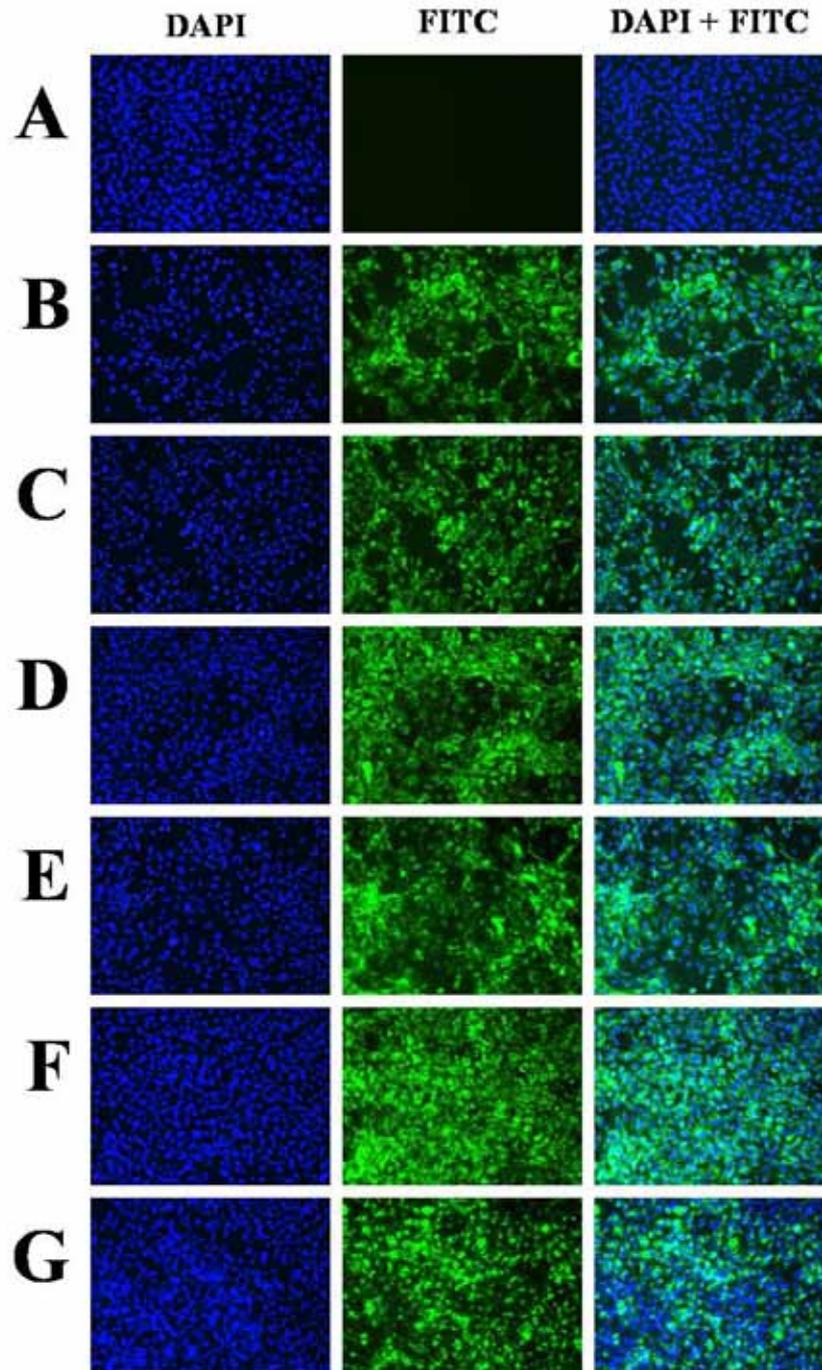


Abbildung 15: Immunfluoreszenzoptischer Nachweis der Inhibition der Dengue-2-Infektion durch VEBP. Vero B4-Zellen wurden in Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität) und nach 24 h mit 1000 TCID₅₀ Dengue-2-Virus in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen VEBP infiziert (1 h). Dann wurde das Medium gegen virusfreies mit Medium+ VEBP gewechselt. Nach 60 h wurden die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mit einem humanen Dengue-Positivserum sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Dargestellt in (A) bis (G) sind die Ergebnisse mit verschiedenen VEBP-Konzentrationen: (A) = kein Zusatz, (B) = 0 µg/ml, (C) = 10 µg/ml, (D) = 20 µg/ml, (E) = 40 µg/ml, (F) = 80 µg/ml, (G) = 160 µg/ml. Es ist kein Effekt von VEBP auf die Infektion von Zellen mit Dengue-2-Virus zu erkennen.

4.2.4 Vitalität von Vero B4-Zellen

Die zuvor (siehe 4.2.2) durchgeführten Experimente zur Vitalität von TZM-bl-Zellen wurden auch für die in den Infektionsexperimenten mit Dengue-2- und Gelbfieber-Viren eingesetzten Vero B4-Zellen durchgeführt.

4.2.4.1 Lichtmikroskopische Beobachtungen

Vero B4-Zellen wurden auf Objektträger mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität). Nach 24 Stunden wurde das Medium durch VEBP-enthaltendes Medium unterschiedlicher Konzentration (zwischen 0 und 600 µg VEBP/ml) ausgetauscht und für weitere 48 h inkubiert. Die Zellen wurden dann unter dem Lichtmikroskop fotografiert, die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Bilder zeigen Zellen mit folgender VEBP-Konzentration: (A) ohne VEBP; (B) mit 600 µg/ml HSA (Kontrolle); (C) mit 50 µg/ml VEBP; (D) mit 100 µg/ml VEBP; (E) mit 150 µg/ml VEBP; (F) mit 200 µg/ml VEBP; (G) mit 300 µg/ml VEBP; (H) mit 400 µg/ml VEBP; (I) mit 600 µg/ml VEBP.

Die Bilder zeigen, dass sich Form und Aussehen der Zellen durch den VEBP-Zusatz nicht verändern. Auch bei Zugabe von 600 µg/ml VEBP (Bild I) sehen die Zellen noch vital aus und zeigen keine Anzeichen von Stress. Auffällig ist lediglich, dass das Zellwachstum offensichtlich durch VEBP gehemmt wird. Während die Zellen in Bild A bis E ähnlich dicht gewachsen sind (bis 150 µg/ml VEBP, Bild E), lässt sich ab der Zugabe von 200 µg/ml VEBP (Bild F) beobachten, dass der Zellrasen nicht so dicht bewachsen ist wie ohne VEBP-Zusatz (Bild A). Mit weiterer Erhöhung der Konzentration von VEBP verstärkt sich der Effekt, bis er in Bild I bei 600 µg/ml VEBP sehr deutlich zu Tage tritt. Beim Kontrollansatz mit der Zugabe von 600 µg/ml HSA in Bild B ist kein Effekt zu beobachten.

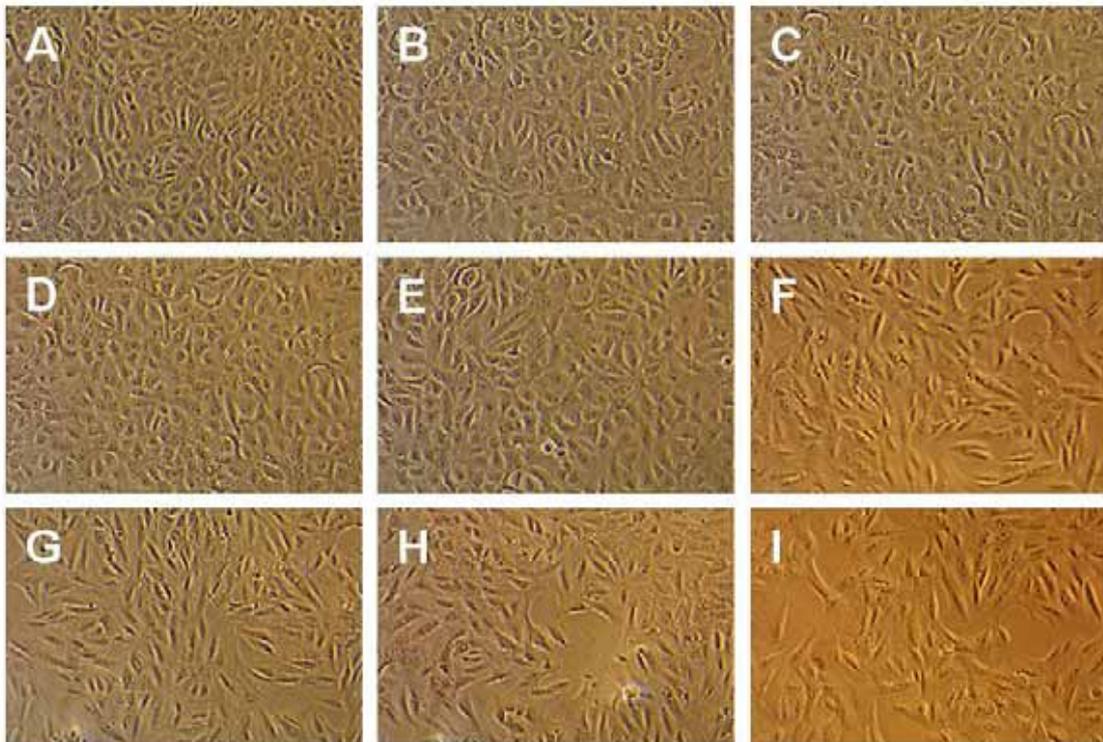


Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Vero B4-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von VEBP. Vero B4-Zellen wurden in einer Zellkulturplatte mit 96 Kavitäten ausgesät (15000 pro Kavität). Nach 16 h wurde das Medium gegen Medium mit verschiedenen Konzentrationen VEBP getauscht. Die Zellen wurden weitere 48 h bei 37 °C inkubiert und dann fotografiert. Das Medium der Ansätze A bis I enthielt folgende Zusätze:

- (A): kein Zusatz;
- (B): 600 µg/ml HSA;
- (C): 50 µg/ml VEBP;
- (D): 100 µg/ml VEBP;
- (E): 150 µg/ml VEBP;
- (F): 200 µg/ml VEBP;
- (G) 300 µg/ml VEBP;
- (H): 400 µg/ml VEBP;
- (I): 600 µg/ml VEBP.

Die Vitalität der Vero B4-Zellen scheint durch VEBP nicht beeinträchtigt zu werden. Bei Zugabe von 600 µg/ml VEBP (Bild I) ist die Zelldichte nicht mehr so hoch wie in Bild A.

4.2.4.2 ³H-Thymidintest

Die in Abbildung 16 gezeigten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen einen Effekt von VEBP auf das Wachstum von Vero B4-Zellen. Deswegen wurde ein ³H-Thymidintest mit Vero B4-Zellen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen VEBP durchgeführt. Bei diesem Test wird der Einbau von Tritium-markiertem Thymidin gemessen, wodurch sich das Zellwachstum quantifizieren lässt.

Zunächst wurden TZM-bl-Zellen durch Austausch des Zellkulturmediums gegen FCS-freies Medium für 24 h synchronisiert. Die synchronisierten Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten ausgesät, wiederum synchronisiert und dann für 24 h mit VEBP-haltigem Medium unterschiedlicher Konzentration (0, 50, 100, 150, 200, 300, 400 und 600 µg VEBP/ml) inkubiert. Daraufhin wurde in jede Kavität 0,2 µCi ³H-Thymidin gegeben. Nach weiteren 16 Stunden wurde der Versuch durch Einfrieren der Zellen und anschließende Auswertung des ³H-Thymidin-Einbaus im Tritium-Counter gestoppt. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt.

Die Abbildung zeigt deutlich den Einfluss von VEBP auf den Einbau von ³H-Thymidin. Bei Zugabe von 50 µg/ml VEBP ist noch kein Effekt zu sehen, jedoch sinkt der Einbau bei Zugabe von 100 µg/ml VEBP auf etwa 78 % ab. Mit Erhöhung der VEBP-Konzentration verstärkt sich der Effekt, bei Zugabe von 600 µg/ml verringert sich der Einbau von ³H-Thymidin um etwa 94 %. Bei der Kontroll-Zugabe von 600 µg/ml HSA ist kein nennenswerter Effekt auszumachen.

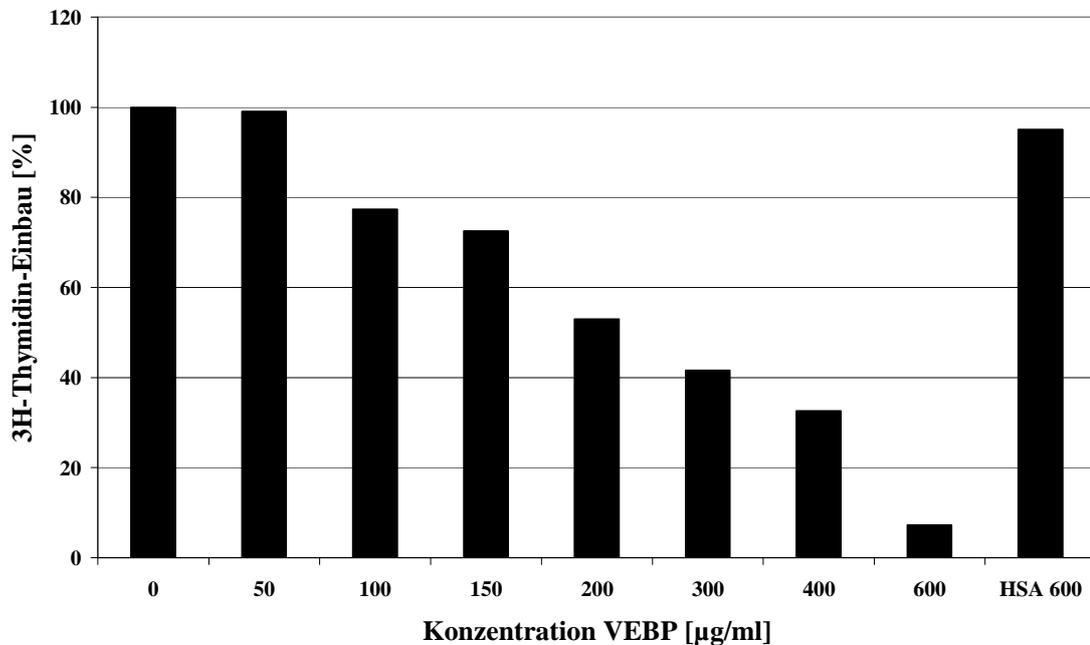


Abbildung 17: ³H-Thymidin-Tests von Vero B4-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen VEBP-Konzentrationen. Vero B4-Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten ausgesät (15000/Kavität). Nach 12 h wurden die Zellen durch einen Mediumwechsel auf FCS-freies Medium für 20 Stunden synchronisiert. Nach 6-stündiger Inkubation in FCS-haltigem Medium wurden die Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen VEBP inkubiert. Dann wurde in jede Kavität 0,2 µCi ³H-Thymidin gegeben. Weitere 16 Stunden später wurde der Test gestoppt und der ³H-Thymidin-Einbau gemessen. Der Einbau von ³H-Thymidin verringert sich mit Erhöhung der VEBP-Konzentration. Eine 50 %ige Verringerung des Einbaus von ³H-Thymidin ist bei einer VEBP-Konzentration von etwa 200 µg/ml zu sehen.

4.2.4.3 Apoptose-Test

Durch die mit Vero B4-Zellen durchgeführten Apoptose-Tests sollte untersucht werden, ob durch die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von VEBP der Anteil der apoptotischen Zellen erhöht wird. Hierzu wurden Vero B4-Zellen synchronisiert, auf Deckgläser mit acht Kavitäten ausgesät, wiederum synchronisiert und dann für 48 h in Anwesenheit unterschiedlicher VEBP-Konzentrationen im Kulturmedium (0, 300 und 600 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden dann fixiert und apoptotische Zellen konnten mit Hilfe des *In Situ* Cell Death Detection kits fluoreszenzmarkiert werden. Als Positivkontrolle wurden Zellen benutzt, deren Kern-DNA mit DNase I für 15 Minuten vor der Fluoreszenzmarkierung verdaut wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Im jeweils linken Bild ist die Kernfärbung dargestellt, durch die alle Zellen gefärbt sind und die dadurch zur Ermittlung der Gesamtzahl der Zellen benutzt wurde. Das mittlere Bild zeigt die fluoreszenzmarkierten apoptotischen Zellen. Eine Überlagerung beider Bilder ist im rechten Bild dargestellt.

Die Bilder zeigen sehr deutlich, dass durch VEBP keine Zunahme der Apoptose-Häufigkeit auszumachen ist. Ohne VEBP-Zusatz sind keine apoptotischen Zellen zu finden. Auch bei der Zugabe von 300 oder 600 µg/ml VEBP sind keine apoptotischen Zellen auszumachen. Bei der Positivkontrolle in der Bilderreihe D wird deutlich gezeigt, dass der Test richtige Ergebnisse liefert, hier sind alle Zellen fluoreszenzmarkiert.

Die durchgeführten Tests zur Vitalität von Vero B4-Zellen zeigen, dass VEBP keine toxische Wirkung auf die Zellen hat. Der 3H-Thymidin Test deutet auf einen negativen Einfluss von VEBP auf das Zellwachstum hin. Die ersten messbaren Effekte treten bei VEBP-Konzentrationen von 100 µg/ml auf. Dieser Effekt hatte aber keinen negativen Einfluss auf die Virusreplikation von Dengue-2 Viren und Gelbfieber-Viren, auch nicht bei Konzentrationen von 160 µg/ml VEBP.

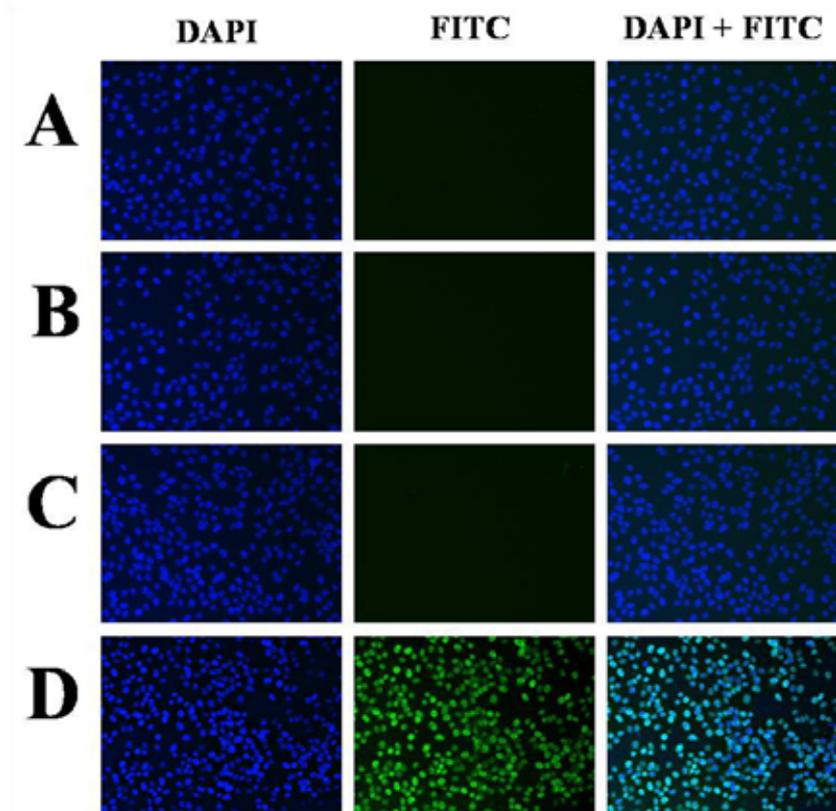


Abbildung 18: Apoptosetest von Vero B4-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen VEBP-Konzentrationen. Vero B4-Zellen wurden auf einem Deckglas mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität). Nach 12 Stunden wurden die Zellen durch einen Mediumwechsel auf FCS-freies Medium für 20 Stunden synchronisiert. Nach 6-stündiger Inkubation in FCS-haltigem Medium wurden die Zellen für 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen VEBP inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und apoptotische Zellen durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. VEBP-Konzentrationen:

(A): 0 $\mu\text{g/ml}$ VEBP

(B): 300 $\mu\text{g/ml}$ VEBP

(C): 600 $\mu\text{g/ml}$ VEBP

(D) zeigt die Positivkontrolle. Hier wurde die Zellkern-DNA durch DNase I verdaut und anschliessend wie in (A) bis (C) gefärbt.

Durch die Zugabe von VEBP konnte keine Erhöhung der Apoptose-Rate bei Vero B4-Zellen festgestellt werden.

4.2.5 SPR-Messungen der VEBP—gp120 Interaktion

Die bisherigen SPR-Untersuchungen wurden jeweils mit VEBP und gp120 IIIB durchgeführt. Beim HIV-Stamm IIIB handelt es sich um CXCR4-tropen Stamm, das heisst, Viren dieses Stammes können nur Zellen infizieren, die CXCR4 auf ihrer Oberfläche tragen. Gerade kurz nach der Infektion mit HIV können im Serum infizierter Personen jedoch nur Viren mit CCR5-Tropismus nachgewiesen werden. Viren mit unterschiedlichem Tropismus unterscheiden sich vor allem in ihrem gp120-Hüllprotein, und innerhalb des gp120 vor allen Dingen in der Sequenz und Gesamtnettoladung der V3-Schleife. CCR5-trope Viren haben in der Regel eine gp120-V3-Schleife mit einer Gesamtnettoladung von etwa +3, während CXCR4-trope Viren in der Regel eine gp120-V3-Schleife mit einer Gesamtnettoladung von etwa +7 aufweisen. Dualtrope Viren, die beide Corezeptoren nutzen können, haben in der Regel eine V3-Gesamtnettoladung von etwa +5. Die enorme Bedeutung der V3-Schleife für den Tropismus von HIV wird durch die Tatsache belegt, dass durch den alleinigen Austausch der V3-Schleife eines R5-tropen Virus gegen die V3-Schleife eines X4-tropen Virus der Tropismus des HI-Virus von R5 zu X4 verändert wird. In den weiteren Experimenten soll untersucht werden, ob der Tropismus des Virus eine Rolle für die Interaktion mit VEBP spielt.

Hierfür wurden äquimolare Mengen von 3 unterschiedlichen gp120 (Stamm IIIB, Stamm SF2 und Stamm MN) durch Aminkopplung auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Auf der Referenzoberfläche wurde eine äquimolare Menge HSA immobilisiert. Die Interaktion von gp120 mit VEBP wurde durch Injektion (6 min) unterschiedlicher VEBP-Konzentrationen auf die jeweilige gp120 sowie die Referenzoberfläche gemessen. Mit Hilfe der Bia-Evaluation Software wurden die Sensorgramme der Referenzoberfläche von den jeweiligen Sensorgrammen der gp120-Oberfläche abgezogen (gp120-Interaktion – HSA-Interaktion). Dargestellt in Abbildung 19 sind die gemessenen referenzsubtrahierten RU, die 120 s nach dem Injektionsende der jeweiligen Proteinlösung bestimmt wurden. Die Abbildung zeigt zur besseren Übersicht exemplarisch nur die Ergebnisse für die VEBP-Konzentration von 10 µg/ml. Bei allen anderen Konzentrationen waren die absoluten Werte zwar unterschiedlich, im Verhältnis zueinander jedoch sehr ähnlich wie in Abbildung 19 dargestellt (Daten nicht gezeigt).

Es ist ein deutlicher Unterschied in der Bindung von VEBP an die verschiedenen gp120 zu erkennen. Am stärksten ist die Interaktion mit dem X4-tropen gp120 IIIB. Die

V3-Schleife dieses gp120 weist mit +9 auch die höchste Gesamtnettoladung auf. Die Interaktion mit dem ebenfalls X4-tropen gp120 vom Stamm SF2 beträgt nur noch etwa 90 % der Intensität der Interaktion von VEBP mit gp120 IIIB. Die beiden Stämme unterscheiden sich zwar nicht in dem Tropismus, jedoch hat die V3-Schleife von gp120 SF2 mit +7 eine niedrigere Gesamtnettoladung. Am schwächsten ist die Interaktion von VEBP mit dem R5-tropen gp120 MN. Hierbei handelt es sich um einen R5-tropen HIV-Stamm mit einer Gesamtnettoladung der V3-Schleife von +3. Die Stärke der Interaktion entspricht in etwa nur noch 65 % der Interaktion zwischen VEBP und gp120 IIIB. Die Stärke der Interaktion von VEBP mit gp120 scheint also vom Tropismus und hierbei insbesondere von der Gesamtnettoladung der V3-Schleife abzuhängen.

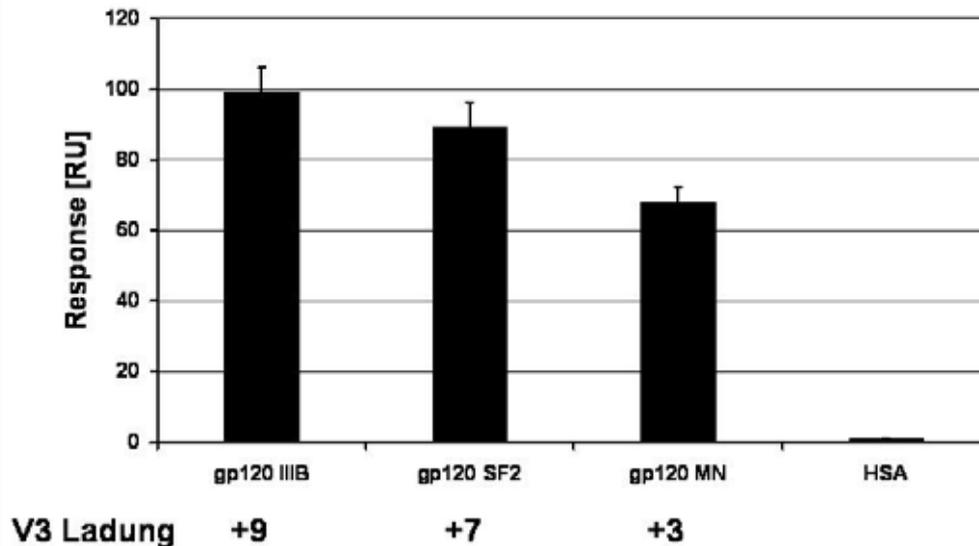


Abbildung 19: SPR-Bindungstest von verschiedenen HIV-gp120 mit VEBP. Äquimolare Mengen von 3 unterschiedlichen gp120 (Stamm IIB, Stamm SF2 und Stamm MN, dargestellt ist auch die Gesamtnettoladung der jeweiligen V3 Schleife) wurden durch Aminkopplung auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Auf der Referenzoberfläche wurde eine äquimolare Menge HSA immobilisiert. Durch Injektion (6 min bei 10 $\mu\text{l}/\text{min}$) von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VEBP auf die jeweilige gp120-Oberfläche sowie die Referenzoberfläche wurde die Interaktion gemessen. Mit Hilfe der Bia-Evaluation Software wurden die Sensorgramme der Referenzoberfläche von den jeweiligen Sensorgrammen der gp120-Oberfläche abgezogen. Dargestellt sind die gemessenen referenzsubtrahierten RU. Dies entspricht der VEBP-Menge, die 120 s nach Beginn der Dissoziationsphase an den Sensorchip gebunden war. Es ist zu sehen, dass die Bindung von VEBP an gp120 mit höherer positiver Gesamtnettoladung der V3 Schleife stärker wird.

4.2.6 Neutralisationstests verschiedener HI-Viren mit VEBP

Die in Abschnitt 4.2.5 aufgeführten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Neutralisationseffizienz von VEBP vom Tropismus des jeweiligen HI-Virus abhängt. Aus diesem Grund wurden Inhibitionsexperimente mit VEBP und unterschiedlichen HI-Viren durchgeführt. Es wurden hierbei die Viren NL918, NL930, NL952 und NL952-15 verwendet. Bei allen Viren handelt es sich um NL4-3-Viren, bei denen die V3-Schleife gegen die von HIV-1 Patientenisolaten ausgetauscht wurde. Bei NL952-15 ist die Glycosylierungsstelle g15 durch site-directed mutagenesis (Austausch des N-Codons gegen das von Q) mutiert. NL918 ist ein R5-tropes, NL930 ein X4-tropes und NL952 ein dualtropes Virus. Durch die Mutation der Glycosylierungsstelle g15 hat NL952-15 die Fähigkeit zur Nutzung von CCR5 als Corezeptor verloren und ist deswegen ein X4-monotropes Virus (eine Übersicht der verwendeten Viren findet sich in Abschnitt 2.5 auf Seite 20).

Die verwendeten virushaltigen Zellkulturüberstände wurden durch Transfektion von HeLa-Zellen mit den das jeweilige Virus codierenden pNL4-3-Plasmiden hergestellt. Die entsprechenden Plasmide waren in der Arbeitsgruppe durch die vorherige Arbeit von Svenja Polzer bereits vorhanden. Nach der Transfektion (48 h) wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände geerntet und die TCID₅₀ der Virusüberstände bestimmt. Für die Inhibitionsversuche wurden TZM-bl Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten ausgesät und 24 h später in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen VEBP mit den jeweiligen Viren infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert, infizierte Zellen konnten durch Färbung mit X-Gal nachgewiesen und ausgezählt werden. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 20 dargestellt. Die Anzahl infizierter Zellen in Abwesenheit von VEBP wurde als 100 % definiert, die Anzahl der infizierten Zellen in Anwesenheit von VEBP entsprechend auf diesen Wert normiert.

Man erkennt deutlich die je nach Tropismus des jeweiligen HI-Virus unterschiedliche Neutralisationsaktivität von VEBP. Das R5-trope Virus NL918 wird erst bei einer VEBP-Konzentration von 32 µg/ml zu 30 % neutralisiert und bei 64 µg/ml zu 65 %. Die EC₅₀ liegt also bei etwa 50 µg/ml. Eine vollständige Neutralisation ist auch bei der höchsten eingesetzten VEBP-Konzentration von 128 µg/ml nicht zu beobachten, wenn auch die Neutralisation hier auf 98 % ansteigt. Das X4-trope Virus NL930 dagegen wird schon bei 4 µg/ml VEBP zu etwa 50 % neutralisiert, die EC₅₀ liegt also bei etwa 4 µg/ml. Bei 32 µg/ml wird die Virusinfektion zu 99 % neutralisiert, bei höheren

VEBP-Konzentrationen (ab 64 µg/ml) sogar vollständig. Die Ergebnisse für das dualtrophe Virus NL952 zeigen eine 40 %ige Neutralisation der Infektion bei 16 µg/ml VEBP, bei 32 µg/ml steigt der Wert auf etwa 70 %. Die EC₅₀ liegt also etwa bei 20 µg/ml. Dieser Wert liegt zwischen den beiden beobachteten Werten für die monotropen X4- und R5-Viren. Eine vollständige Neutralisation ist wie schon bei NL918 auch bei der maximal eingesetzten VEBP-Konzentration von 128 µg/ml nicht zu beobachten, hier liegt der Neutralisationswert bei 99 %. Sehr interessant sind die Ergebnisse für das Virus NL952-15. Die Mutation der Glycosylierungsstelle g15 hat nicht nur einen veränderten Tropismus, sondern auch einen Einfluss auf die Neutralisation durch VEBP zur Folge. Die Virusinfektion wird bereits bei einer VEBP-Konzentration von 16 µg/ml zu etwa 90 % inhibiert, während die Infektion des voll glycosylierten NL952 bei dieser Konzentration nur zu etwa 40 % inhibiert wird. Bei 8 µg/ml VEBP wird die Infektion von NL952-15 bereits zu etwa 45 % inhibiert. Die EC₅₀ liegt also etwa bei 10 µg/ml VEBP. Eine vollständige Inhibition der Infektion von NL952-15 lässt sich bereits bei 32 µg/ml VEBP beobachten. Es lässt sich also feststellen, dass das Neutralisationsprofil des Virus typisch für das eines X4-tropen Virus wie NL930 ist. Dies wird durch eine einzelne Punktmutation in der Aminosäuresequenz der V3-Schleife, die die Deletion einer Glycosylierungsstelle, jedoch keine Veränderung in der Gesamtnettoladung zur Folge hat, hervorgerufen.

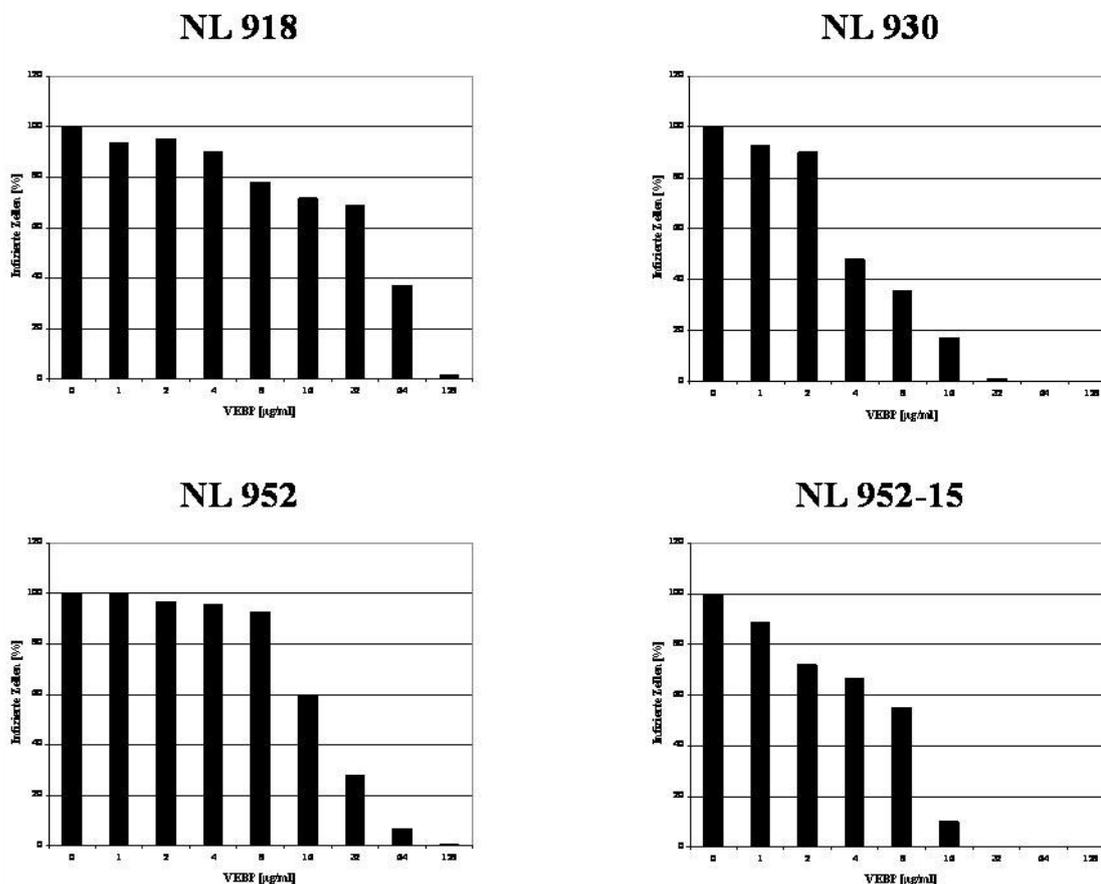


Abbildung 20: Neutralisationstests von verschiedenen HI-Viren mit VEBP. TZM-bl-Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten überführt (20000/Kavität). Nach 24 h wurden die Zellen mit den jeweiligen Viren bei unterschiedlichen VEBP-Konzentrationen infiziert. Weitere 48 h später wurden die Zellen fixiert, die infizierten Zellen mit X-Gal angefärbt und ausgezählt.

Es ergeben sich folgende EC_{50} -Werte: NL918: 50 µg/ml VEBP; NL930: 4 µg/ml VEBP; NL952: 20 µg/ml VEBP; NL952-15: 10 µg/ml VEBP.

4.2.7 Bindungsstudien mit intakten Virusmutanten

4.2.7.1 Etablierung der Testmethode

Die zuvor dargestellten Ergebnisse der unterschiedlich starken Neutralisation von HIV-1 Glycosylierungsmutanten durch VEBP weisen auf eine unterschiedliche Interaktion von VEBP mit den HIV-Mutanten hin. Um dies genauer zu untersuchen, sollte eine Methode entwickelt werden, mit der intakte Virusmutanten in einem SPR-Test eingesetzt werden können. Dieser Test hat den Vorteil, dass die Interaktion von VEBP mit gp120, welches in seiner natürlichen Umgebung in der Virusmembran vorliegt, untersucht werden kann.

Zunächst musste überprüft werden, ob aufgrund der im Vergleich zu Proteinen, die normalerweise in SPR-Experimenten als Analyt eingesetzt werden, sehr viel größeren Masse und Größe von kompletten HI-Virionen eine Interaktionsmessung mittels SPR überhaupt möglich ist. Hierzu wurde HSA mittels Aminkopplung auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Das kovalent gekoppelte HSA wurde dann ausserhalb des SPR-Gerätes für 15 min bei 0 °C mit dem 500 fachen molaren Überschuss HOCl zu VEBP modifiziert. Der Sensorchip wurde wieder eingesetzt und war nun für die Interaktionsmessungen mit HI-Virionen bereit. Die Viren wurden durch Transfektion von HeLa-Zellen mit den entsprechenden pNL4-3-Plasmiden generiert. 48 h nach Transfektion wurden die Virus enthaltenden Zellkulturüberstände geerntet. Die Viren wurden durch Zugabe von PEG6000 gefällt und sedimentiert, das Sediment wurde in PBS wieder aufgenommen und die Viruskonzentration der erhaltenen Suspension wurde mit einem p24-Antigen-ELISA bestimmt. Die Fällung und die dadurch erreichte Aufreinigung der Viren aus den Überständen war nötig, weil die unbehandelten virushaltigen Zellkulturüberstände für SPR-Interaktionsmessungen nicht geeignet waren. Die Virussuspension konnte nun auf den mit VEBP gekoppelten Sensorchip injiziert werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 21 dargestellt. Als Beispiel wurde hier die 6 minütige Injektion eines 30 ng/ml p24 enthaltenden NL4-3 Virusüberstandes gezeigt.

Man kann erkennen, dass es tatsächlich möglich ist, komplette HI-Virionen für SPR-Messungen einzusetzen. Die Abbildung zeigt ein sehr sauberes Sensorgramm, das für zu grosse Moleküle typische Flackern oder Wackeln des Signals während der Messung tritt nicht auf. Das Sensorgramm zeigt auch, dass tatsächlich eine Interaktion zwischen VEBP und dem Virus gemessen wird. Während der Injektion der

Virussuspension zwischen 0 und 360 s sieht man eine SPR-typische, sich immer langsamer einem Maximum nähernde Assoziationskurve, nach Ende der Injektion ab 360 s ist die typische, zunächst schnell, dann immer langsamer abfallende Dissoziationskurve zu sehen. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurden weitere Messungen mit unterschiedlich glycosylierten HI-Virionen unternommen.

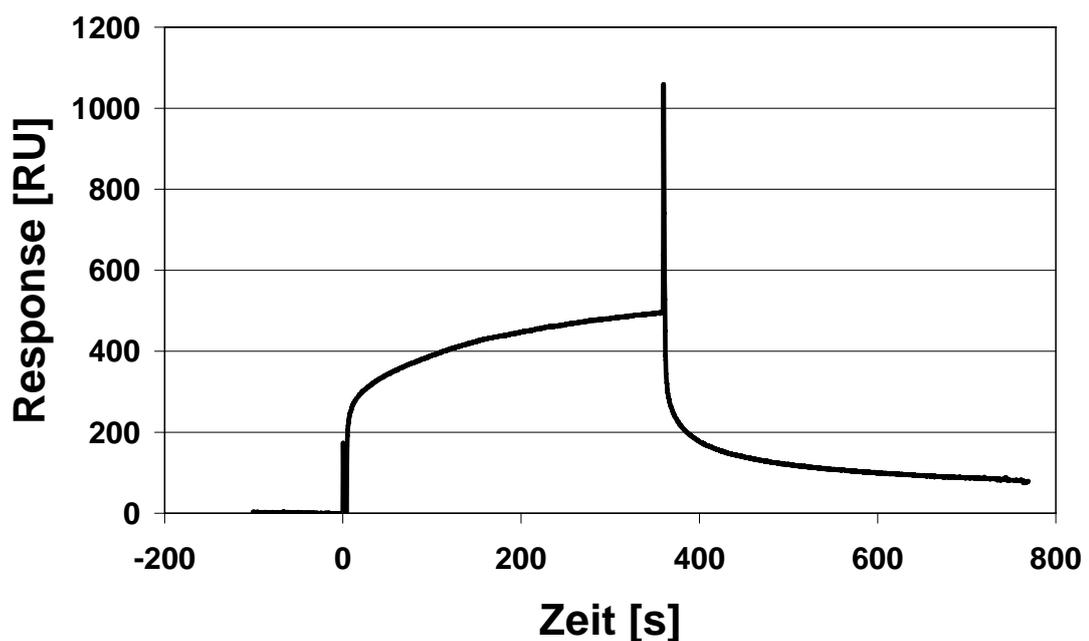


Abbildung 21: Darstellung einer SPR-Beispielmessung von HI-Viren (NL4-3 -13/15/17) mit VEBP. VEBP wurde auf einem CM5-Sensorchip mittels Aminkopplung immobilisiert. Auf diese Oberfläche wurde für 6 min ein PEG-gefällter NL4-3 Virusüberstand injiziert, der einer Konzentration von 30 ng/ml p24 entsprach.

4.2.7.2 SPR-Untersuchungen mit unterschiedlich glycosylierten HI-Viren

HSA wurde mittels Aminkopplung auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Das kovalent gekoppelte HSA wurde dann ausserhalb des SPR-Gerätes für 15 min bei 0 °C mit dem 500-fachen molaren Überschuss HOCl zu VEBP modifiziert. Der Sensorchip wurde wieder eingesetzt und war nun für die Interaktionsmessungen mit HI-Virionen bereit. Um zur Kontrolle auch die Interaktion der Viren mit CD4 messen zu können, wurde auf einer anderen Flusszelle des Sensorchips CD4 mittels Aminkopplung immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde auf einer dritten der vier Flusszellen des Sensorchips HSA immobilisiert. Die durch Injektion der Viren auf die HSA-Flusszelle erhaltenen Sensorgramme wurden von den Sensorgrammen der VEBP- bzw. CD4-Flusszelle mit Hilfe der Bia-Evaluation-Software abgezogen. Die Viren wurden durch Transfektion von HeLa-Zellen mit den entsprechenden pNL4-3-Plasmiden generiert. 48 h nach Transfektion wurden die Virus enthaltenden Zellkulturüberstände geerntet. Die Viren wurden durch Zugabe von PEG6000 gefällt und sedimentiert, das Sediment wurde in PBS wieder aufgenommen und die Viruskonzentration der erhaltenen Suspension wurde mit einem p24-Antigen-ELISA bestimmt. Die Virussuspension konnte nun für SPR-Messungen eingesetzt werden. Dargestellt in Abbildung 22 sind die referenzsubtrahierten RU-Werte 120 s nach Ende der Virusinjektion.

Man erkennt, dass HIV-NL4-3 konzentrationsabhängig mit VEBP wie auch mit CD4 interagiert. Bei Injektion einer Virussuspension mit einer Konzentration von 30 ng p24 binden etwa 65 RU an die VEBP-Zelle, während an die CD4-Zelle etwa 15 RU Virus binden. Bei Injektion von 60 ng p24 erhöhen sich die Werte auf 118 RU (VEBP) bzw. 28 RU (CD4). Die Verstärkung der Bindung bei Erhöhung der Viruskonzentration ist bei der CD4- als auch bei der VEBP-Flusszelle in etwa gleich stark, dies ist ein Zeichen für eine virusspezifische Interaktion.

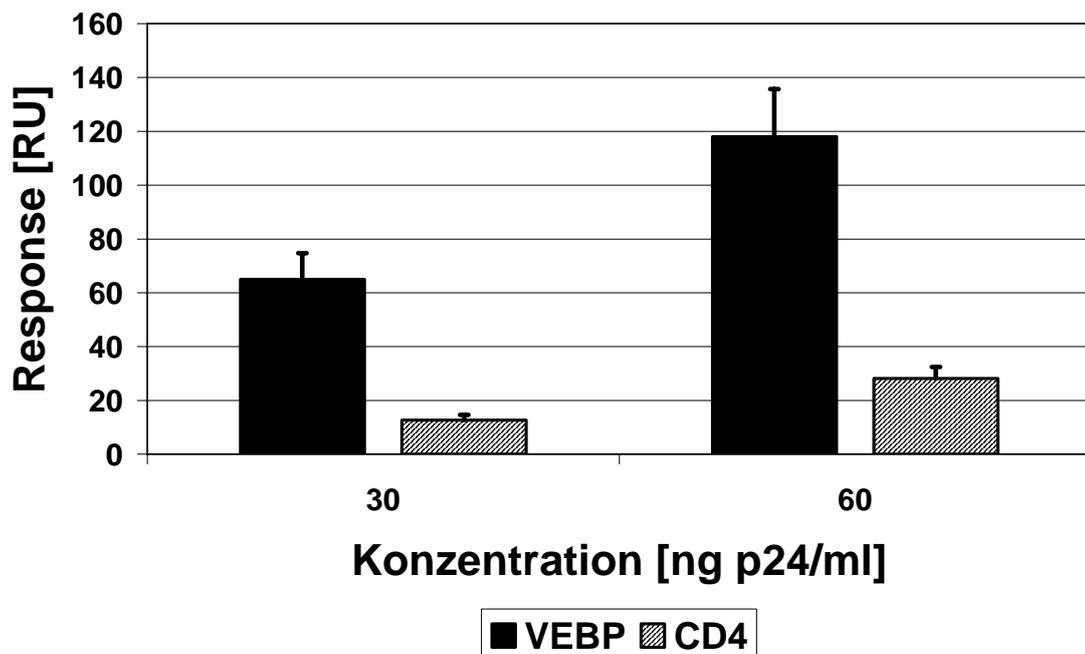


Abbildung 22: SPR-Bindungstests von HIV-NL4-3 mit immobilisiertem VEBP bzw. CD4. Äquimolare Mengen VEBP, CD4 sowie HSA (Referenzoberfläche) wurden auf 3 verschiedenen Flusszellen eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Auf jede der Flusszellen wurde für 6 min bei einer Flussrate von 10 μ l/min PEG-gefällter NL4-3 Virusüberstand in verschiedenen Konzentrationen (30 und 60 ng/ml p24) injiziert. Dargestellt sind die Bindungswerte in RU nach Abzug der Bindung des Virusüberstandes an die HSA-Referenzoberfläche.

In weiteren Versuchen wurde HSA mittels Aminkopplung auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Das kovalent gekoppelte HSA wurde dann ausserhalb des SPR-Gerätes für 15 min bei 0 °C mit dem 500 fachen molaren Überschuss HOCl zu VEBP modifiziert. Der Sensorchip wurde wieder eingesetzt und war nun für die Interaktionsmessungen mit HI-Virionen bereit. Als Negativkontrolle wurde auf einer anderen Flusszelle des Sensorchips HSA immobilisiert. Die durch Injektion der Viren auf die HSA-Flusszelle erhaltenen Sensorgramme wurden von den Sensorgrammen der VEBP-Flusszelle mit Hilfe der Bia-Evaluation-Software abgezogen. Die Viren wurden durch Transfektion von HeLa-Zellen mit den entsprechenden pNL4-3-Plasmiden generiert. 48 h nach Transfektion wurden die Virus enthaltenden Zellkulturüberstände geerntet. Die Viren wurden durch Zugabe von PEG6000 gefällt und sedimentiert, das Sediment wurde in PBS wieder aufgenommen und die Viruskonzentration der erhaltenen Suspension wurde mit einem p24-Antigen-ELISA bestimmt. Die Virussuspension konnte nun für SPR-Messungen eingesetzt werden. Dargestellt in Abbildung 23 sind die referenzsubstrahierten RU-Werte 120 s nach Ende der Virusinjektion.

Bei beiden untersuchten Virusmutanten ist eine konzentrationsabhängige Interaktion mit VEBP zu sehen. Die Interaktion mit VEBP des weniger glycosylierten NL4-3-13/15/17 ist bei allen eingesetzten Konzentrationen in etwa 10 mal höher als die VEBP-Interaktion des voll glycosylierten NL4-3, obwohl die Gesamtnettoladung der V3-Schleife bei beiden Viren identisch ist. Dies ist ein weiterer Hinweis zur Stützung der Hypothese, dass die Zuckerreste der V3-Region durch Interaktion mit positiven Aminosäuren deren Ladungen abschirmen können und die V3-Region dadurch weniger positiv geladen erscheinen lassen. Durch dieses Modell lässt sich der Einfluss der Glycane der V3-Region auf den Corezeptortropismus erklären.

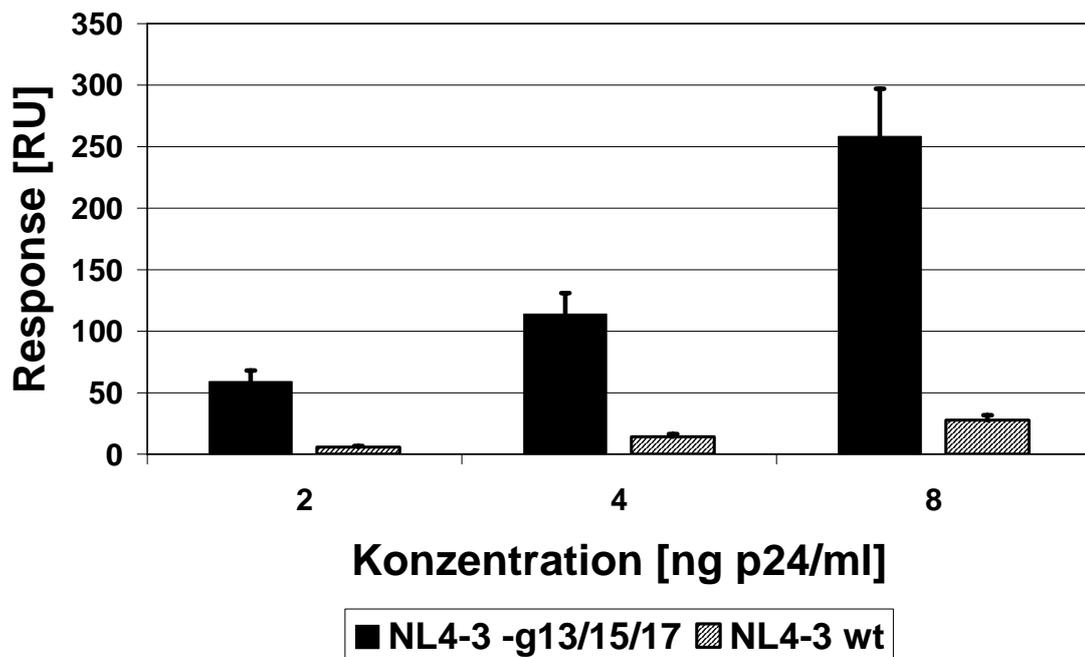


Abbildung 23: SPR-Bindungstests von verschieden glycosylierten HI-Viren mit VEBP. Äquimolare Mengen VEBP und HSA (Referenzoberfläche) wurden auf 2 verschiedenen Flusszellen eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Auf jede der Flusszellen wurde für 6 min bei einer Flussrate von 10 μ l/min PEG-gefällter NL4-3 Virusüberstand und NL4-3 -g13/15/17 Virusüberstand in verschiedenen Konzentrationen (2, 4 und 8 ng/ml p24) injiziert. Dargestellt sind die Bindungswerte in RU nach Abzug der Bindung des Virusüberstandes an die HSA-Referenzoberfläche.

4.3 Inhibition der West-Nil Virus-Infektion durch VEBP

In den bisherigen Versuchen mit HIV-1 hat sich gezeigt, dass VEBP antivirale Eigenschaften gegen das HIV-1 besitzt. In den folgenden Versuchen soll nun untersucht werden, ob sich die antiviralen Eigenschaften auf die HIV-Infektion beschränken oder ob auch eine inhibierende Wirkung auf die Infektion von Zellen mit anderen Viren zu beobachten ist. Hierzu sollte nun zunächst in SPR-Messungen die Interaktion von VEBP mit der B-Domäne des West-Nil Virus E-Proteins untersucht werden.

4.3.1 Expression und Aufreinigung der West-Nil B-Domäne

Die B-Domäne (Domäne III) des West-Nil Virus E-Proteins wurde von Diana Ludolfs als gereinigtes His-Tag Fusionsprotein zur Verfügung gestellt. Die Reinheit des aufgereinigten Proteins wurde durch eine SDS-PAGE überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 24 A dargestellt. Teil B der Abbildung zeigt die Aminosäuresequenz der B-Domäne.

Anhand der Gelauftragung erkennt man, dass das Protein eine sehr hohe Reinheit aufweist. Oberhalb der Proteinbande bei 13 kDa sind nur leichte Spuren von Verunreinigungen zu erkennen. Mit diesem hochrein aufgereinigten Protein wurden die weiteren SPR-Interaktionsmessungen durchgeführt.

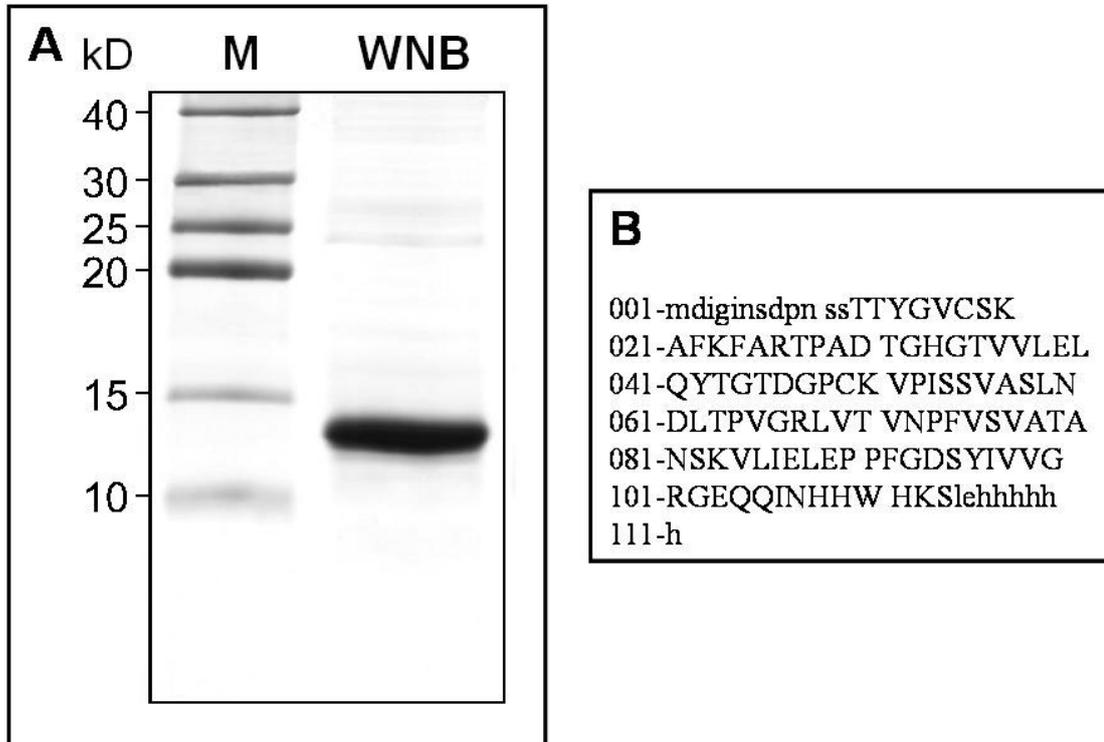


Abbildung 24: Expression und Aufreinigung der West-Nil B-Domäne.

(A): SDS-PAGE von His-Tag affinitätsgereinigtem WNB-Protein. Das Protein hat die erwartete Grösse von etwa 13 kDa. Man erkennt die sehr saubere Aufarbeitung des Proteins.

(B): Sequenz des aufgereinigten B-Domänen-Proteins. Die Aminosäuresequenz der B-Domäne ist gross geschrieben.

4.3.2 SPR-Untersuchungen der B-Domäne mit VEBP

Mit der aufgereinigten West-Nil B-Domäne (siehe 4.3.1) wurden Interaktionsmessungen mit VEBP durchgeführt. Die B-Domäne eignet sich insofern sehr gut für diese Messungen, da ein Grossteil der neutralisierenden Antikörper bei einer West-Nil Virus Infektion gegen diese Domäne gerichtet ist. Sie scheint also für die Infektion eine wichtige Rolle zu spielen. Wenn eine Interaktion von VEBP mit dieser Domäne zu messen ist, kann dies als ein Hinweis auf eine mögliche West-Nil neutralisierende Eigenschaft von VEBP gedeutet werden. Für die Interaktionsmessungen wurde zunächst die B-Domäne durch Aminkopplung auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Auf einer anderen Flusszelle des Sensorchips wurde ebenfalls mittels Aminkopplung HSA immobilisiert. Das kovalent gekoppelte HSA wurde dann ausserhalb des SPR-Gerätes für 15 min bei 0 °C mit dem 500-fachen molaren Überschuss an HOCl zu VEBP modifiziert. Die Interaktionsmessungen wurden also sowohl mit immobilisiertem VEBP als auch immobilisierter West-Nil B-Domäne durchgeführt. Als Negativkontrolle für alle Messungen wurde auf einer weiteren Flusszelle des Sensorchips reines HSA immobilisiert. Die durch Injektion von VEBP bzw. West-Nil B-Domäne auf die HSA-Flusszelle erhaltenen Sensorgramme wurden von den Sensorgrammen der B-Domänen- bzw. VEBP-Flusszelle mit Hilfe der Bia-Evaluation-Software abgezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt. In den Teilen A und B der Abbildung sind die Ergebnisse der Interaktionsmessungen mit immobilisiertem VEBP dargestellt. Teil A zeigt die referenzsubtrahierten Sensorgramme der Injektion von 2, 10 und 50 µg/ml der West-Nil B-Domäne. Es ist deutlich eine konzentrationsabhängige Interaktion mit VEBP zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist bei den Kontrollinjektionen (2, 10 und 50 und 250 µg/ml) von HSA, die in Teil B dargestellt sind, keine Interaktion zu sehen. Diese Ergebnisse sind in Teil E der Abbildung noch einmal in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Die dargestellten RU-Werte entsprechen den jeweiligen Werten 120 s nach Ende der Injektion. Die gleichen Ergebnisse zeigen sich, wenn die B-Domäne auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert und VEBP bzw. HSA als Analyten benutzt werden (Teile C und D in Abbildung 25). Auch hier sieht man in den referenzsubtrahierten Sensorgrammen eine konzentrationsabhängige Interaktion zwischen VEBP und B-Domäne (Teil C, VEBP-Konzentration 2, 10 und 50 µg/ml), jedoch nicht bei Injektion von HSA (Teil D, 2, 10, 50 und 250 µg/ml). Auch diese Ergebnisse sind zur besseren Übersicht in Teil F der Abbildung noch einmal zusammengefasst.

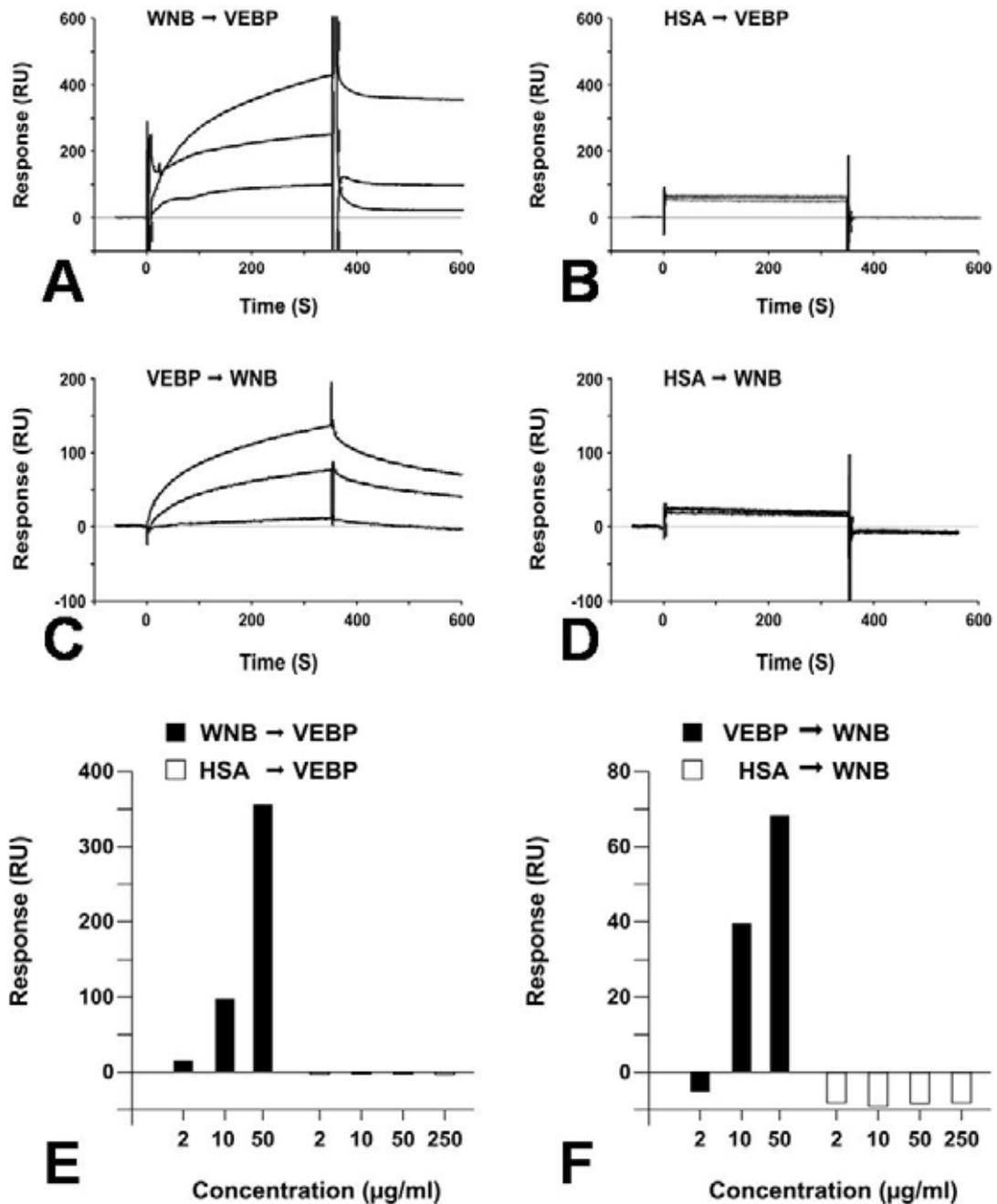


Abbildung 25: Darstellung der SPR-Bindungsdaten der West-Nil B-Domäne mit VEBP.

Teil A und B: VEBP wurde auf einem CM5-Sensorchip mittels Aminkopplung immobilisiert. Die West-Nil B-Domäne (A, Konzentrationen von oben nach unten: 50 µg/ml, 10 µg/ml und 2 µg/ml) bzw. HSA (B, Konzentrationen 2, 10, 50 und 250 µg/ml) wurden für 6 min injiziert. Die Ergebnisse sind in Teil E zusammengefasst.

Teil C und D: West-Nil B-Domäne wurde auf einem CM5-Sensorchip mittels Aminkopplung immobilisiert. VEBP (C, Konzentrationen von oben nach unten: 50 µg/ml, 10 µg/ml und 2 µg/ml VEBP) bzw. HSA (D, Konzentrationen 2, 10, 50 und 250 µg/ml) wurden für 6 min injiziert. Die Ergebnisse sind in Teil F zusammengefasst.

4.3.3 Inhibition der West-Nil Virus Infektion durch VEBP

Nachdem in den SPR-Experimenten eine Interaktion zwischen VEBP und der B-Domäne des E-Proteins von West-Nil Virus nachgewiesen werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob diese Interaktion auch Auswirkungen auf die Infektion von Zellen durch das Virus hat. Hierzu wurden Vero B4-Zellen in Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität). Nach 24 h wurden diese mit 6000 TCID₅₀ West-Nil Virus in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen VEBP infiziert (1 h). Das Medium wurde gegen virusfreies mit entsprechender VEBP-Konzentration gewechselt und die Zellen nach weiteren 60 h mit Methanol fixiert. Die infizierten Zellen liessen sich mit einem anti-West-Nil-E-Protein sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper anfärben. Um alle Zellen, auch die nicht infizierten, im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt. Im jeweils linken Bild ist die Kernfärbung zu sehen, durch die alle Zellen gefärbt sind und die dadurch zur Ermittlung der Gesamtzahl der Zellen benutzt wurde. Das mittlere Bild zeigt die FITC-markierten infizierten Zellen. Eine Überlagerung beider Bilder ist im rechten Bild dargestellt. Die Bilderreihe A zeigt die Negativkontrolle mit nicht infizierten Zellen, in B bis G sind infizierte Zellen in Anwesenheit verschiedener VEBP-Konzentrationen (B: 0 µg/ml, C: 10 µg/ml, D: 20 µg/ml, E: 40 µg/ml, F: 80 µg/ml, G: 160 µg/ml) dargestellt.

Anhand der Fluoreszenzaufnahmen ist deutlich der inhibitorische Effekt von VEBP auf die Infektion von Zellen mit West-Nil Virus zu sehen. Eine genaue Auswertung der Gesamtzahl sowie der Zahl der infizierten Zellen für die Bilderreihen von Abbildung 26 ist in Tabelle 1 dargestellt. Während in Abwesenheit von VEBP 98,5 % der Zellen infiziert sind, ist ab einer VEBP-Konzentration von 80 µg/ml eine vollständige Inhibition der Infektion zu beobachten. Bei geringeren VEBP-Konzentrationen nimmt der Anteil der infizierten Zellen zu, je weniger VEBP eingesetzt wurde. Die EC₅₀ liegt bei etwa 15 µg/ml (bei 10 µg/ml VEBP sind 53,3 % der Zellen infiziert, bei 20 µg/ml VEBP sind 47,7 % der Zellen infiziert).

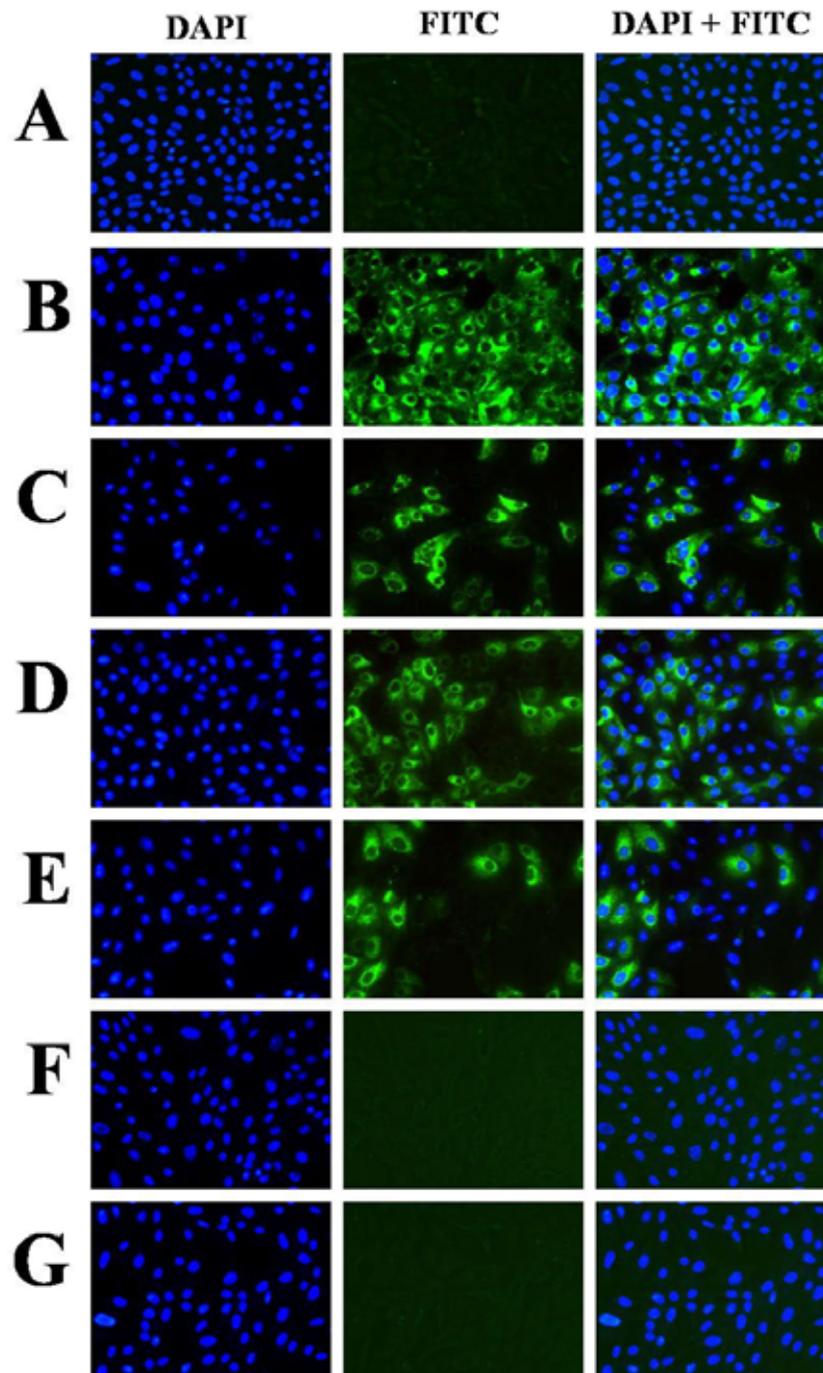


Abbildung 26: Immunfluoreszenzoptischer Nachweis der Inhibition der West-Nil Virus Infektion durch VEBP. Vero B4-Zellen wurden in Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität) und nach 24 h mit 6000 TCID₅₀ West-Nil Virus in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen VEBP infiziert (1 h). Dann wurde das Medium gegen virusfreies mit entsprechender VEBP-Konzentration gewechselt. Nach 60 h wurden die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mit einem anti-WN-E-Protein sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Dargestellt in (A) bis (G) sind die Ergebnisse mit verschiedenen VEBP-Konzentrationen: (A) = mock-Infektion, (B) = 0 µg/ml, (C) = 10 µg/ml, (D) = 20 µg/ml, (E) = 40 µg/ml, (F) = 80 µg/ml, (G) = 160 µg/ml. Bei VEBP-Konzentrationen >40 µg/ml wird das West-Nil Virus vollständig neutralisiert.

[VEBP] [$\mu\text{g/ml}$]	# Zellen	davon infiziert	Anteil
0	67	66	98,5 %
10	49	26	53,1 %
20	111	53	47,7 %
40	59	20	33,9 %
80	88	0	0 %
160	86	0	0 %

Tabelle 1: Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 26. # = Anzahl.

4.3.4 Inhibition der West-Nil Infektion bei Zugabe von VEBP zu verschiedenen Zeitpunkten

In den SPR-Untersuchungen mit der B-Domäne des E-Proteins von West-Nil Virus mit VEBP konnte die Interaktion zwischen beiden Proteinen nachgewiesen werden. Die darauf folgenden Inhibitionsversuche zur Infektion von Zellen mit West-Nil Virus legen den Schluss nahe, dass die Infektion mit West-Nil Virus aufgrund der Interaktion von E-Protein und VEBP erfolgt und damit das Eindringen des Virus in die Zielzellen verhindert wird. Dies soll in den folgenden Versuchen weiter untersucht werden. Wenn durch VEBP tatsächlich das Eindringen unterbunden wird, dann müssten bei Zugabe von VEBP kurz nach dem Eindringen der Viren in die Zellen zwar nicht diese initialen

Infektionen, jedoch die folgenden, durch Virusproduktion in den infizierten Zellen verursachten Infektionen verhindert werden. Um dies zu untersuchen wurden zunächst Vero B4-Zellen auf Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität). Nach 24 h wurden die Zellen mit einer 1000 TCID₅₀ entsprechenden Virusmenge infiziert. 1 h später wurde das Kulturmedium gegen virusfreies Medium gewechselt. Weitere 60 h später wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die infizierten Zellen mit einem Antikörper gegen das E-Protein von West-Nil Virus sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, um die Gesamtzahl der Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Die DAPI-Färbung ist jeweils in der linken Spalte gezeigt, die FITC-Fluoreszenz ist auf den jeweils mittleren Bildern dargestellt. Die rechte Spalte zeigt eine Überlagerung der DAPI- und FITC-Färbungen. In der Bilderreihe A sind nicht infizierte Zellen zu sehen, B zeigt die Infektion der Zellen in Abwesenheit von VEBP. In Teil C der Abbildung war dem Kulturmedium während der Infektion kein VEBP zugesetzt, danach enthielt das Medium 80 µg/ml VEBP. Bei dem in D dargestellten Versuch waren dem Kulturmedium während der Infektion und auch danach 80 µg/ml VEBP zugesetzt. Die in den Bildern dargestellten Ergebnisse sind in Tabelle 2 noch einmal genauer ausgewertet.

Die Bilder zeigen, dass der inhibierende Einfluss von VEBP auf die Infektion von Zellen mit West-Nil Virus auf die Störung des Virusentry zurückzuführen ist. Wie in Tabelle 2 zu sehen, sind ohne die Anwesenheit von VEBP im Kulturmedium während und nach der Infektion der Zellen mit West-Nil Virus etwa 63 % der Zellen infiziert (siehe auch Bilderreihe B in Abbildung 27). Wenn erst nach der einstündigen Infektionsphase VEBP zugegeben wird (80 µg/ml, Bilderreihe C) können die bereits in die Zellen eingedrungenen Viren nicht mehr an der Replikation gehindert werden, die von diesen Zellen produzierten neuen Viren können jedoch keine weiteren Zellen infizieren, deshalb sinkt der Anteil der infizierten Zellen in diesen Versuchen auf 22 %. Wenn während und nach der einstündigen Infektionsphase VEBP im Medium enthalten ist (jeweils 80 µg/ml), können die Zellen gar nicht mehr durch West-Nil Viren infiziert werden (Bilderreihe D). Eine völlige Verhinderung der Infektion kann auch bereits durch Zugabe von VEBP zum Kulturmedium (80 µg/ml) nur während der Infektionsphase erreicht werden (Bilderreihe E). Dies ist der wohl deutlichste Beleg dafür, dass das Eindringen von West-Nil Viren in die Zellen durch VEBP unterbunden wird

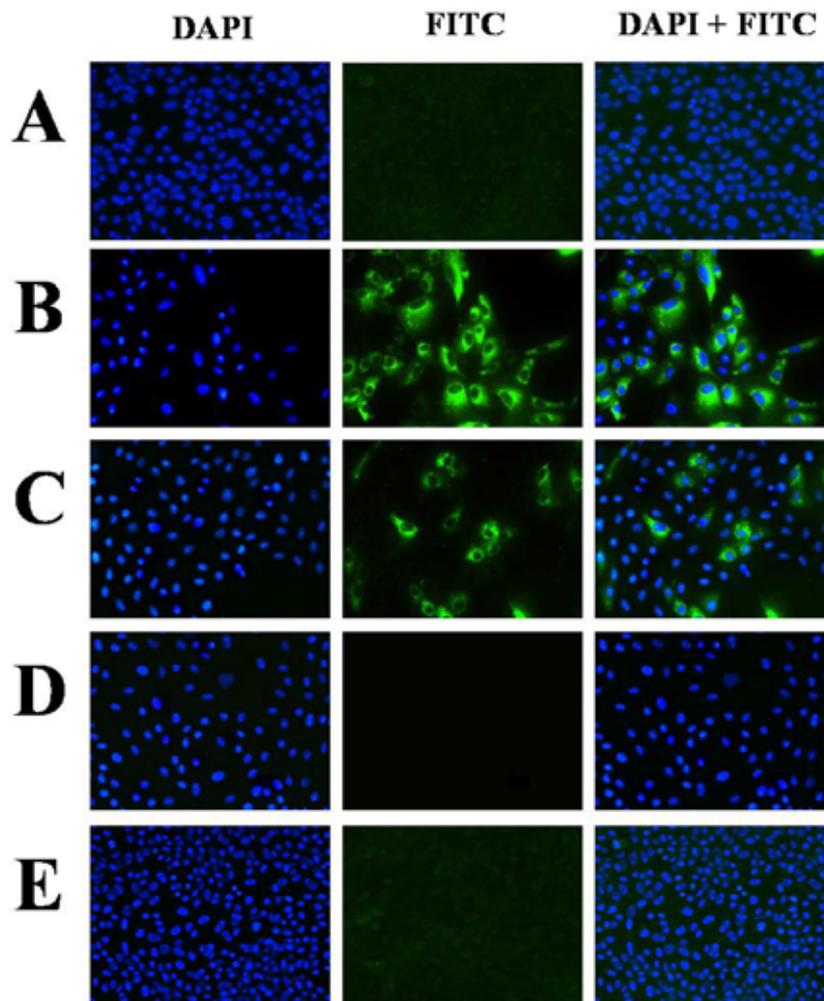


Abbildung 27: Inhibition der West-Nil Virus Infektion von Vero B4-Zellen durch Zugabe von VEBP zu verschiedenen Zeitpunkten. Vero B4-Zellen wurden in Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität) und nach 24 Stunden mit 1000 TCID₅₀ West-Nil Virus infiziert (1h). Dann wurde das Medium gegen virusfreies gewechselt. Nach 60 Stunden wurden die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mit einem anti-WN-E-Protein sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

(A): kein Virus zugesetzt

(B) Während der Infektion und auch nach Mediumwechsel kein VEBP zugesetzt

(C) Während Infektion kein VEBP, nach Mediumwechsel 80 µg/ml VEBP zugesetzt

(D): Während Infektion sowie nach Mediumwechsel 80 µg/ml VEBP zugesetzt

(E) Nur während der Infektion 80 µg/ml VEBP zugesetzt

[VEBP] [$\mu\text{g/ml}$] bei Infektion/danach	# Zellen	davon infiziert	Anteil
0 / 0 (B)	49	31	63,3 %
0 / 80 (C)	91	20	22 %
80 / 80 (D)	101	0	0 %
80 / 0 (E)	289	0	0 %

Tabelle 2: Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 27. # = Anzahl.

4.4 Inhibition der Hantaan-Virus-Infektion durch VEBP

Hantaan-Viren gehören zur Familie der Bunyaviridae. Im Folgenden soll untersucht werden, ob VEBP einen inhibitorischen Einfluss auf die Infektion von Zellen mit Hantaan-Viren hat. Hierzu wurden Vero B4-Zellen in Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität) und nach 24 Stunden mit 1000 TCID₅₀ Hantaan-Viren in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen VEBP infiziert (1h). Dann wurde das Medium gegen virusfreies mit entsprechender VEBP-Konzentration gewechselt. Nach 60 Stunden wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die infizierten Zellen mit einem anti-Hantaan-G-Protein sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, um die Gesamtzahl der Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Im jeweils linken Bild ist die DAPI-Kernfärbung zu sehen, das mittlere Bild zeigt die infizierten, mit FITC gefärbten Zellen. Rechts ist eine Überlagerung der beiden anderen Bilder dargestellt. Der Anteil der in der Abbildung gezeigten infizierten Zellen an der Gesamtzahl der Zellen jeder Bilderreihe ist zur besseren Übersicht in Tabelle 3 noch einmal zusammengefasst.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Infektion von Zellen mit Hantaan-Viren durch VEBP inhibiert wird. In (A) sind keine infizierten Zellen zu sehen, da auch kein Virus eingesetzt wurde (Mock-Infektion). In (B) dagegen beträgt der Anteil der infizierten Zellen ohne Zugabe von VEBP etwa 96 %. Schon bei Zugabe einer VEBP-Konzentration von 1,25 µg/ml (C) sinkt der Anteil auf etwa 90 % ab. Wird die VEBP-Konzentration weiter erhöht, verringert sich der Anteil der infizierten Zellen stetig weiter, bis bei 15 µg/ml VEBP nur noch etwa 14 % der Zellen infiziert sind. Die EC₅₀ beträgt somit in etwa 12 µg/ml VEBP. Ab der Zugabe von 20 µg/ml VEBP (H) ist eine deutliche Abschwächung der VEBP-Wirkung zu beobachten. Der Anteil der infizierten Zellen sinkt zwar stetig mit Erhöhung der VEBP-Konzentration, jedoch deutlich langsamer als im Bereich zwischen 1,25 und 15 µg/ml VEBP. Erstaunlich ist, dass trotz der schon bei geringen VEBP-Konzentrationen gefundenen guten inhibitorischen Wirkung keine völlige Verhinderung der Infektion von Zellen mit Hantaan-Viren selbst bei VEBP-Konzentrationen von 200 µg/ml (M) nachgewiesen werden kann.

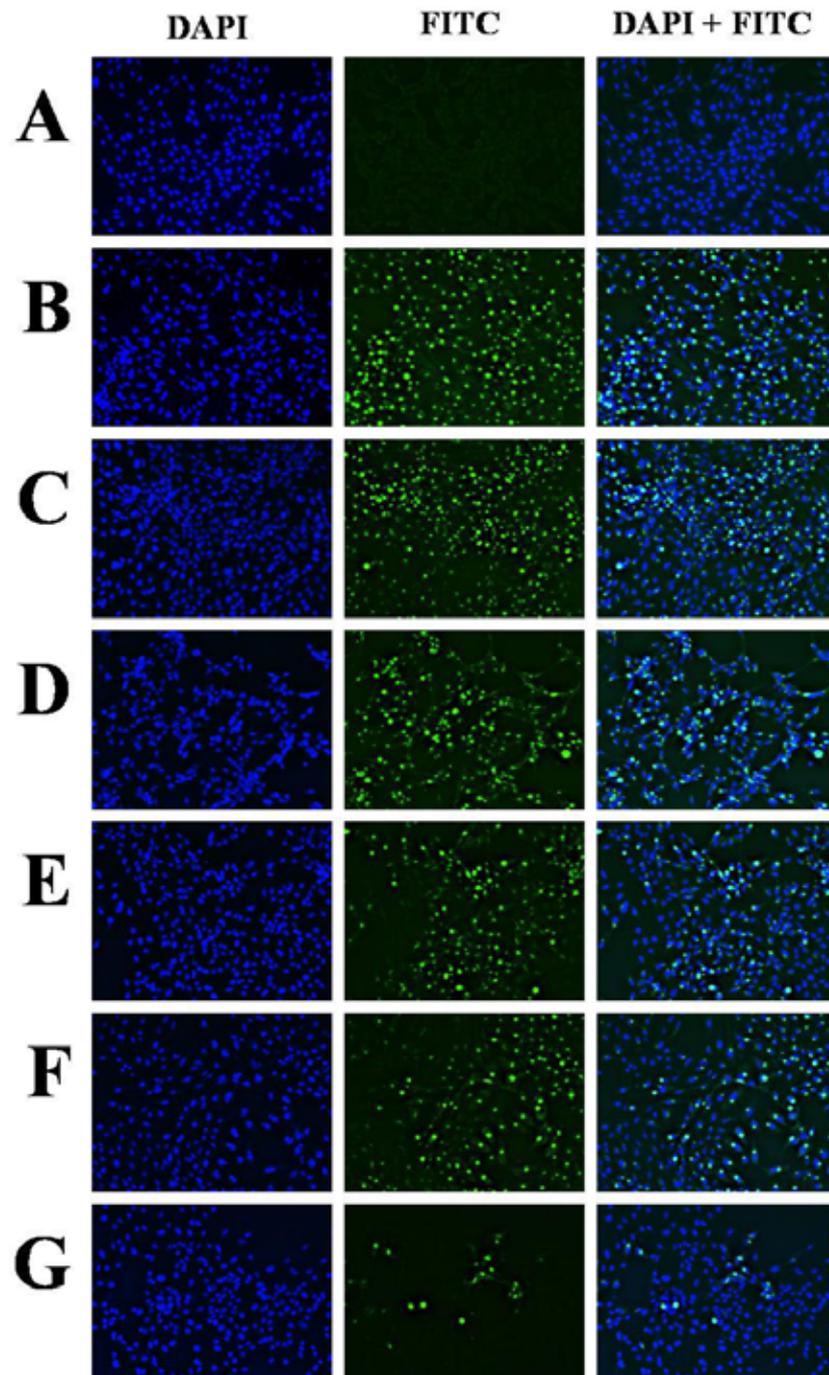


Abbildung 28: Inhibition des Hantaan-Virus durch VEHP. Vero B4-Zellen wurden in Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität) und nach 24 h mit 1000 TCID₅₀ Hantaan-Viren in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen VEHP infiziert (1 h). Dann wurde das Medium gegen virusfreies mit entsprechender VEHP-Konzentration gewechselt. Nach 60 h wurden die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mit einem anti-Hantaan-G-Protein sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Dargestellt in (A) bis (G) sind die Ergebnisse mit verschiedenen VEHP-Konzentrationen: (A) = mock-Infektion, (B) = 0 µg/ml, (C) = 1,25 µg/ml, (D) = 2,5 µg/ml, (E) = 5 µg/ml, (F) = 10 µg/ml, (G) = 15 µg/ml. Weitere Ergebnisse sind auf der nächsten Seite dargestellt.

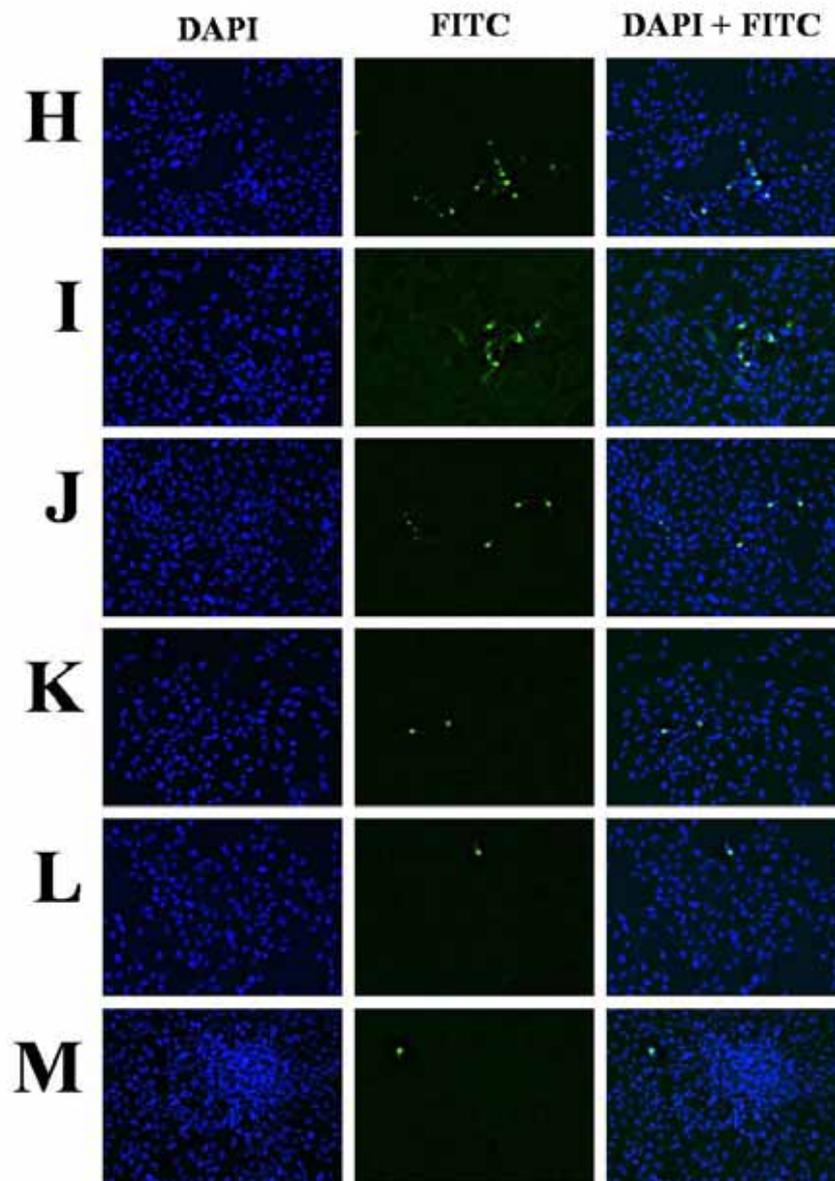


Abbildung 29: Inhibition des Hantaan-Virus durch VEBP. Vero B4-Zellen wurden in Deckgläser mit 8 Kavitäten ausgesät (25000/Kavität) und nach 24 h mit 1000 TCID₅₀ Hantaan-Viren in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen VEBP infiziert (1 h). Dann wurde das Medium gegen virusfreies mit entsprechender VEBP-Konzentration gewechselt. Nach 60 h wurden die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mit einem anti-Hantaan-G-Protein sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Dargestellt in (H) bis (M) sind die Ergebnisse mit verschiedenen VEBP-Konzentrationen: (H) = 20 µg/ml, (I) = 40 µg/ml, (J) = 80 µg/ml, (K) = 120 µg/ml, (L) = 160 µg/ml, (M) = 200 µg/ml.

In den Abbildungen ist zu sehen, dass Hantaan-Virus durch VEBP neutralisiert wird. Die EC₅₀ beträgt etwa 12 µg/ml VEBP. Eine vollständige Neutralisation ist jedoch auch bei einer VEBP-Konzentration von 200 µg/ml nicht zu erreichen.

[VEBP] [$\mu\text{g/ml}$]	# Zellen	davon infiziert	Anteil
0 (B)	330	318	96,4 %
1,25 (C)	418	378	90,4 %
2,5 (D)	289	255	88,2 %
5 (E)	343	258	75,2 %
10 (F)	247	170	68,8 %
15 (G)	268	38	14,2 %
20 (H)	264	34	12,9 %
40 (I)	269	12	4,5 %
80 (J)	305	7	2,3 %
120 (K)	181	2	1,1 %
160 (L)	190	1	0,5 %
200 (M)	452	1	0,2 %

Tabelle 3: Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 28 und Abbildung 29. # = Anzahl. Die Buchstaben in Klammern in der linken Spalte beziehen sich auf die Versuchsansätze B bis M aus Abbildung 28 und Abbildung 29.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine effiziente Neutralisation von unterschiedlichen Viren durch VEBP vermittelt wird. Trotz der Wirksamkeit gegen unterschiedliche Viren ist die Neutralisation spezifisch, da die Infektion von Zellen mit Gelbfieber-Virus als auch mit Dengue-2 Virus durch VEBP nicht beeinflusst wurde. Die oben dargestellte Neutralisation von Hantaan Virus zeigt, dass sich auch Viren, die zwei voneinander unabhängige Rezeptoren benutzen, von VEBP neutralisieren lassen.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde humanes Serumalbumin (HSA) mit Hilfe des Oxidationsmittels Hypochlorit in ein antivirales Protein transformiert. Die Transformation des HSA hat zur Folge, dass verschiedene HIV-1 Typen, das West-Nil Virus und das Hantaan Virus durch dieses modifizierte Protein an der Infektion von Zellen gehindert werden. Da das HOCl-modifizierte Protein an HIV-1 gp120 und die West-Nil B Domäne bindet, wurde ihm in dieser Arbeit der Name *Virus Envelope Binding Protein* (VEBP) gegeben.

5.1 Vom HSA zum VEBP

5.1.1 Hypochlorit induzierte HSA Veränderungen

Normalerweise begegnet einem Hypochlorit im alltäglichen Umgang als Desinfektionsmittel im Sanitärbereich oder man riecht freigesetztes Chlorgas, welches aus HOCl-haltigem Wasser freigesetzt wird, z.B. im Schwimmbad. Aber auch im menschlichen Körper wird freies HOCl produziert. Dies geschieht durch das Enzym Myeloperoxidase (MPO). Durch die MPO wird im Körper die Reaktion von H_2O_2 und Cl^- zu HOCl katalysiert. Gerade in der Entzündungsreaktion werden Zellen angezogen, die grosse Mengen an MPO ausschütten. Dadurch wird HOCl am Ort der Entzündung produziert. Da HOCl ein starkes Oxidationsmittel ist, hat es „vor Ort“ antivirale und antibakterielle Eigenschaften. Untersuchungen von Hazell *et al.* (1996) haben gezeigt, dass neben dem freien HOCl auch HOCl modifizierte Proteine im Körper nachweisbar sind. Malle *et al.* haben HOCl-modifizierte Proteine gereinigt und gegen diese Proteine monoklonale Antikörper produziert. Mit diesen Antikörpern lassen sich in verschiedenen Geweben HOCl-modifizierte Proteine nachweisen (Hazell *et al.*, 1996). Nun stellte sich die Frage, was für eine Bedeutung diese veränderten Proteine im Rahmen der Infektabwehr haben könnten. Die viralen Zellkultursysteme bieten eine einfache experimentelle Grundlage, um zu überprüfen, ob solche veränderten Proteine z.B. antivirale Eigenschaften bekommen haben.

Es gab mehrere Gründe, sich für HSA als Modellprotein für die Untersuchung der HOCl-Oxidation von Proteinen und die darauffolgende Untersuchung der antiviralen Eigenschaften des entstandenen VEBP zu entscheiden:

- HSA ist ein im Serum sehr häufig vorkommendes Protein. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Oxidation von HSA durch HOCl auch *in vivo* stattfindet, ist demnach sehr groß.
- Es gibt bereits Untersuchungen, bei denen chemisch modifiziertes (z. B. durch Succinylierung) HSA als Inhibitor von viralen Infektionen eingesetzt wurde. Dieses chemisch modifizierte HSA zeigte keine toxischen Eigenschaften, weswegen davon ausgegangen werden konnte, dass mit HOCl modifiziertes HSA ebenfalls keine toxischen Eigenschaften hat.
- Gereinigtes HSA ist in großen Mengen zu günstigen Preisen im Chemikalienhandel zu beziehen.

Normalerweise verhält sich das Serumalbumin des Menschen oder anderer Organismen in viralen Zellkultursystemen indifferent und zeigt keinerlei antivirale Eigenschaften. Auch eine Interaktion mit viralen Hüllproteinen ist unbekannt. Da es aber im Organismus in hohen Konzentrationen vorkommt, sollte hier nun untersucht werden, ob es sich derart verändern lässt, dass es antiviral wirkt. Die Strategie war, das Protein direkt mit dem Oxidationsmittel HOCl umzusetzen und dann zu testen. Als erstes wurden allgemeine Untersuchungen, wie z.B. die Gelelektrophorese und verschiedene Färbemethoden, eingesetzt, um Veränderungen des HSA zu analysieren. Es zeigte sich, dass das Protein durch die Behandlung mit HOCl degradiert wurde und sich stark veränderte. Dies zeigte sich in der Aufspaltung der Proteinbande des HSA. Reines HSA zeigt eine definierte Bande im Polyacrylamidgel bei 68 kDa, wohingegen VEBP eine breite Bande zeigt, die sich über den Bereich von 20-60 kDa ausdehnt. Gleiche Ergebnisse hatten Hawkins & Davies (1998, 1999), die ebenfalls HOCl-modifiziertes Serumalbumin mit Hilfe der Gelelektrophorese analysierten. Die Autoren argumentieren, dass die Veränderungen im Laufverhalten durch eine starke Fragmentierung des HSA hervorgerufen werden könnte. In Versuchen von M. van Yperen (Arbeitsgruppe Schreiber) wurde gezeigt, dass ab einer Konzentration von HSA:HOCl von 1:100 keine Molekülpeaks in der massenspektroskopischen Analyse (Maldi-Tof) nachweisbar waren. Nur VEBP Präparationen mit geringerem

Oxidationsgrad zeigten Signale in der Maldi-Tof Analyse. Auch Versuche im massenspektroskopischen Labor im Forschungsinstitut Borstel haben bestätigt, dass sich VEBP der massenspektroskopischen Analyse entzieht. Die starke Oxidation des HSA hat wahrscheinlich zur Folge, dass das Protein stark fragmentiert wird oder so verändert wird, dass es in der Massenspektroskopie nicht analysierbar ist..

In der Literatur sind ausser der zitierten Gelelektrophorese keine weiteren Experimente dokumentiert, die zeigen, welche Massenveränderungen durch hohe HOCl-Konzentrationen hervorgerufen werden. Die eigenen Arbeiten zeigen ausserdem, dass VEBP so verändert wird, dass es sich auch der Comassie und Kupferfärbung entzieht. Nur in einem mit Silber gefärbten Gel sind die Proteinbanden des VEBP nach der Gelelektrophorese sichtbar. Daher vermuten wir, dass sich das Protein durch Bildung von Chloraminen und deren anschliessender Hydrolyse zur Aldehydfunktion verändert. Diese Veränderung erfolgt bevorzugt an den Lysinresten des Proteingerüsts. Wird durch weitere Oxidation die entstandene Aldehydfunktion zur Carbonsäure oxidiert, so würde sich die intensive Färbung durch Silber erklären. Ausserdem würde es erklären warum bei niedrigeren HOCl Konzentrationen HSA „Multimere“ detektiert werden, die dann bei höheren HOCl Konzentrationen wieder zerfallen.

Anhand verschieden gefärbter SDS-Gele lassen sich prinzipiell Rückschlüsse auf die Ladung der oxidierten Proteine ziehen. In der Abbildung 6 auf Seite 41 sind drei identisch beladene Polyacrylamid-Gele dargestellt, die auf unterschiedliche Weise gefärbt wurden. Die Gele sind jeweils mit HSA sowie mit HSA, das in den molaren Verhältnissen (HSA:HOCl) von 1:20, 1:100 sowie 1:500 mit HOCl oxidiert wurde, beladen. Deutlich zu erkennen ist: je größer das Verhältnis von HOCl zu HSA bei der Oxidation ist, desto schwächer ist die Proteinfärbung bei der Coomassie- und Kupferfärbung, bis schließlich in Spur 4 keine Färbung mehr zu erkennen ist. Bei dem silbergefärbten SDS-Gel scheint sich die Färbung dagegen sogar zu intensivieren, wenn mehr HOCl bei der Oxidation eingesetzt wurde. Dies lässt sich mit den verschiedenen Mechanismen erklären, die für die jeweilige Färbung verantwortlich sind und die deswegen kurz diskutiert werden:

- Die Coomassie-Färbung beruht auf der unspezifischen Bindung des Coomassie-Farbstoffes an die kationisch geladenen Aminosäurereste des Proteins (de Moreno *et al.*, 1986).

- Die Kupfer-Färbung ist eine negativ-Färbung, d. h. es wird nicht das Protein, sondern das Gel durch die Präzipitation eines Tris-SDS-Cu²⁺-Komplexes gefärbt. In dem Bereich der Protein-Banden wird angenommen, dass die Proteine ebenfalls Komplexe mit Cu²⁺-Ionen bilden, die bei Abwesenheit von SDS – z. B. bei nativen Gelen – ebenfalls präzipitieren. Bei Anwesenheit von SDS jedoch verhindert das SDS die Präzipitation der Protein-Cu²⁺-Komplexe und das Gel wird an diesen Stellen nicht gefärbt (Lee *et al.*, 1987).
- Die Silber-Färbung beruht auf der Komplexbildung von Ag⁺-Ionen mit den anionischen Seitenketten von Glutamat- und Aspartat der Proteine, alkalisches Formaldehyd reduziert dann das Ag⁺ der Komplexe zu Ag.

Eine Erklärung für die in Abbildung 6 beobachteten Effekte ist die, dass die Ladung des modifizierten HSA mit zunehmendem HOCl-Überschuss während der Reaktion immer weiter abnimmt und HSA zu einem stark negativ geladenen Protein wird. Eine Färbung mit Coomassie ist dann aufgrund des oben beschriebenen Mechanismus der Färbung nicht mehr möglich. Die Färbung mit Silber wird in diesem Fall sogar begünstigt, da mehr negative Gruppen zur Komplexierung der Silber-Ionen vorhanden sind. Dies ist auch auf dem Gel zu erkennen, die Färbung von Spur 4 (HOCl:HSA = 500:1) ist deutlich intensiver als die Färbung der anderen Spuren, obwohl überall die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde. Dieser Effekt findet sich auch bereits sehr deutlich in Abbildung 5. Bei dem Kupfer-gefärbten Gel ist die Spur mit dem am stärksten oxidierten HSA (Spur 4) gleichmäßig gefärbt, es sind keine Proteinbanden mehr zu erkennen. Dies lässt sich ebenfalls durch die Erzeugung eines stark negativen Proteins erklären: das negative Protein komplexiert nicht mehr mit dem ebenfalls negativ geladenen SDS. Dadurch wird die Präzipitation des Protein-Kupfer-Komplexes durch SDS nicht mehr verhindert, der Komplex fällt ebenso aus wie die Tris-SDS-Kupfer-Komplexe im restlichen Gel. Man erhält das dargestellte Ergebnis, ein gleichmäßig gefärbtes Polyacrylamid-Gel.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen mit Hilfe der Oberflächen Plasmonen Resonanz (SPR) Spektroskopie zeigen ebenfalls wie die Gelelektrophorese, dass durch die HOCl-Behandlung eine Veränderung des Molekulargewichts des HSA beobachtet wird. Die Oxidation des HSA direkt auf dem Sensorchip zeigt, dass sich die nachweisbare Menge an Protein auf dem Sensorchip stark verändert. Von der Oberfläche des Sensorchips werden im Verlauf der Oxidation ca. 50% der Masse an

gebundenem HSA abgelöst. Dies deutet auf eine Fragmentierung des HSA hin. Auch ist vorstellbar, dass HOCl das Dextrangerüst des Biosensors schädigt. Würde HSA allerdings in eine Vielzahl kleinster Bestandteile zerfallen, würde sich ein viel stärkerer Masseverlust in der SPR Analyse zeigen. Trotz Masseverlust und Fragmentierung des Proteins befinden sich nach der HOCl-Oxidation auf dem Sensorchip etwa 3400 Response Units (RU). Damit befindet sich der VEBP beschichtete Sensorchip im optimalen Messbereich des Geräts. Wird im umgekehrten Falle freies VEBP in der SPR untersucht, zeigt sich folgendes: VEBP lagert sich nicht an der Oberfläche des Sensorchips an. Normalerweise beobachtet man eine Massezunahme am Sensorchip, die auf Anlagerung während der Assoziationsphase beruht. VEBP zeigte keinerlei Anlagerung in der Assoziationsphase (Abb. 7). Dies deutet ebenfalls auf starke Veränderungen des Proteins hin. Eine erhöhte negative Ladung des Proteins würde die Anlagerung erschweren und im Falle sehr starker negativer Ladung bei pH 4,0 unmöglich machen. Daher glauben wir, dass die SPR-Anlagerungsexperimente ein Hinweis für die Veränderung der Nettoladung des Proteins hin zu einem negativ geladenen polyanionischen Protein sind.

Die Arbeit hat sich im weiteren und hauptsächlich auf die Analyse der antiviralen Eigenschaften des Proteins konzentriert. Weitere Untersuchungen zu den HOCl-induzierten biochemischen Veränderungen des HSA wurden nicht durchgeführt. Die ersten analytischen Daten über HOCl-modifiziertes HSA sind Anstoss für eine neue Doktorarbeit geworden, die den Wirkungsmechanismus des VEBP untersucht.

5.1.2 VEBP Interaktion mit viralen Hüllproteinen

Wie schon im Vorwort dieser Diskussion gesagt, wurde das HOCl-modifizierte HSA mit der Bezeichnung VEBP (*virus envelope binding protein*) versehen. Dieser Name wurde vergeben, da das modifizierte HSA an gp120 und die WNV B Domäne bindet.

Für die Untersuchungen wurde gereinigtes HIV-1 gp120 von drei verschiedenen Virustypen (IIIB, SF2 und MN, AIDS Reagent Programm) verwendet. Diese drei Hüllproteine unterscheiden sich in der Nettoladung der V3 Schleife (+9, +7, +3) und somit auch im Tropismus (X4 bzw R5). Sie repräsentieren daher sowohl HIV-1 Varianten vom CXCR4- als auch vom CCR5-Corezeptor nutzenden Typ. In den vorgestellten Untersuchungen zeigten alle drei Hüllproteine spezifische Bindung an VEBP. Als Vergleich für die Interaktion mit gp120 wurde die CD4—gp120 Interaktion

herangezogen. Die besondere Stärke der VEBP—gp120 Bindung zeigt sich daran, dass VEBP deutlich höhere Signale im Vergleich zur gp120—CD4 SPR-Messung zeigt.

Da VEBP als Hüllprotein bindendes Protein eine neue Entdeckung darstellt, ist es in der Literatur nicht beschrieben und es gibt daher auch keine vergleichenden Daten zur VEBP—gp120 oder VEBP—WNV-B Interaktion. Aus den SPR-Messungen der VEBP—gp120 Bindung ergab sich nach Berechnungen eine Dissoziationskonstante von ca. 3×10^{-8} M. Damit ist die VEBP—gp120 Interaktion vergleichbar mit der Bindung eines neutralisierenden monoklonalen anti-gp120 Antikörpers (VanCott *et al.*, 1994).

Gerade die VEBP—gp120 Interaktion war weiteres Ziel der Untersuchungen, da es eine Vielzahl von HIV-1 Varianten gibt. Wenn man VEBP mit der Bindung neutralisierender Antikörper gegen gp120 vergleicht, so fällt auf, dass Antikörper zwar sehr gut neutralisieren, aber aufgrund ihrer Eigenschaften sehr spezifisch für das jeweilige gp120 sind. Dies ist eines der grossen Probleme in der AIDS Forschung. Das Virus entkommt ständig der humoralen Immunantwort, weil es seine antigenen Epitope variiert. Es treten immer wieder neue Virusvarianten auf, deren gp120 durch die Antikörper nicht mehr gut genug erkannt wird, um die Infektion von Zellen zu verhindern. Hier zeigte sich die eventuell grosse Bedeutung, die VEBP als gp120 bindendes Agens haben könnte. VEBP zeigte Bindung sowohl an X4-tropes sowie an R5-tropes gp120. Nun ist es keine einfache Sache, jedes beliebige gp120 in reiner Form darzustellen, um es an einen Biosensor zu koppeln. Die drei untersuchten gp120 Hüllproteine wurden glücklicherweise durch das AIDS Reagent Program zur Verfügung gestellt, aber andere Hüllproteine mit anderen V3 Schleifen und Aminosäuremotiven sind in reiner Form nicht erhältlich.

Daher wurde eine, unserer Meinung nach wichtige, weitere Methode zur Untersuchung von VEBP—Hüllprotein Interaktionen etabliert: Die SPR-Messung der direkten VEBP—Virus Interaktion. Dies wurde erst durch die Darstellung des VEBP auf Biosensoren möglich, da sich komplette Virionen nicht auf einen Biosensor koppeln lassen. Freies VEBP war chemisch inaktiv und konnte nicht durch die klassische EDC/NHS Kopplung an die CH-aktivierte Dextranmatrix der CM-5 Biosensorchips gekoppelt werden. Außerdem lagerte es sich nicht an der Sensorchip-Oberfläche an und entzog sich so einer chemischen Kopplung. Dadurch, dass sich die Oberfläche der Biosensoren als beständig gegen HOCl zeigte, konnte die Modifikation des HSA direkt auf dem Biosensor durchgeführt werden. Die mit HSA beschichteten Biosensoren wurden ausserhalb des SPR-Messgerätes mit HOCl behandelt und dann für die

Messungen eingesetzt. Mit Hilfe dieser im nachhinein als trivial erscheinenden Vorgehensweise war es möglich, VEBP-Bindungsanalysen mit intakten Viruspartikeln durchzuführen.

Durch die modernen molekularbiologischen Methoden lassen sich leicht die verschiedensten HIV-1 Varianten klonieren und rekombinante Viren für Untersuchungen generieren. Besonders die Klonierung von gp120 V3 Mutanten ist eine etablierte Methode in der Arbeitsgruppe. Daher stehen im Prinzip die verschiedensten HIV-Mutanten zur Verfügung, die sich in der V3 Schleife und der gp120 N-Glykosylierung unterscheiden. Solche rekombinanten Viren wurden nun gezüchtet, aufgereinigt und für SPR-Messungen eingesetzt. Die ersten Vorexperimente waren vielversprechend und die Bindung von intakten Viruspartikeln an immobilisiertes CD4 konnte in SPR-Messungen gezeigt werden. Wie in der Abb. 25 gezeigt wurde, binden intakte Viruspartikel an CD4, aber auch sehr stark an VEBP. Damit bestätigen sich die VEBP-gp120 Untersuchungen mit gereinigtem gp120 IIIB, SF2 und MN. Besonders wichtig schien uns, Messungen mit Viruspartikeln durchzuführen, die sich in der N-Glykosylierung der V3 Schleife unterscheiden. Die N-Glykane, besonders das N-Glykan g15 innerhalb der V3 Schleife, sind wichtig für die Blockade neutralisierender Antikörper. Auch VEBP wird durch diese komplexen Zuckerstrukturen an der Bindung gehindert. VEBP scheint also ebenfalls wie neutralisierende Antikörper an die entscheidenden Bereiche des gp120 zu binden. Der Vorteil des VEBP ist allerdings, dass es im Gegensatz zu Antikörpern keine Aminosäuresequenz-Spezifität im Sinne des *Schlüssel-Schloss* Prinzips zeigt. Dies zeigen besonders die Neutralisationsdaten in Abb 20. Hier zeigt sich das Potential von VEBP. VEBP inaktiviert HIV-1 Varianten jeden Types, jeder V3 Nettoladung und die Neutralisation von glycosylierten R5-tropen Viren ist ebenfalls möglich. Im Prinzip ist aber die Tatsache, dass sich intakte Viruspartikel für SPR-Messungen einsetzen lassen eine wichtige neue Methode für das Studium der Virus-Rezeptor Interaktion.

Da VEBP an CH-aktivierte Oberflächen angebracht werden kann, eröffnen sich nun auch neue Möglichkeiten für zukünftige Untersuchungen. Markierung und Detektion der viralen Hüllproteine ist eine Anwendung, aber auch die Suche von eventuellen Bindungspartnern in Genbibliotheken wäre eine Möglichkeit, die entscheidenden Faktoren auf Viren und Parasiten zu identifizieren, die für Interaktionen mit Zellen verantwortlich sind. Hätte man z.B. eine Expressionsbank des HIV-1 angelegt und

VEBP zur Suche von Bindungspartnern eingesetzt, man hätte auf alle Fälle gp120 gefunden. Bei WNV hätte es zur Identifikation der B-Domäne geführt.

5.2 VEBP neutralisiert HIV-1, WNV und HTNV

Nach den erfolgreichen SPR-Messungen, die eine Bindung des VEBP an HIV gp120 und die WNV B-Domäne zeigten, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit Versuche zur Virusneutralisation von HIV-1, WNV und Hantaan Virus durchgeführt.

In Abschnitt 4.2.1 dieser Arbeit wird die Neutralisation der HIV-1-Infektion von TZM-bl-Zellen durch VEBP gezeigt. Der ermittelte Wert für die EC₅₀ bei NL4-3 liegt bei 2 µg VEBP/ml und ab einer Konzentration von 16 µg/ml konnte keine Infektion der Zellen mit dem X4-monotropen NL4-3 Virus mehr nachgewiesen werden. Für das R5-monotrope Virus NL918 wurde der höchste EC₅₀ Wert von ca. 50 µg VEBP/ml ermittelt. Dies zeigt, dass sich die Viren mit der höchsten V3 Nettoladung (NL4-3, 9+) besser durch VEBP neutralisieren lassen als Viren mit nur einer wenig positiv geladenen V3 Schleife (NL918, 3+)

Der ermittelte Wert für die EC₅₀ von 2 µgVEBP/ml für NL4-3 liegt damit in etwa in der Größenordnung der Neutralisationseffizienz für das modifizierte Serumalbumin Suc-HSA. Für Suc-HSA wurde eine antivirale Aktivität für die EC₅₀ von 1 µg/ml festgestellt (Jansen *et al.*, 1993). Bei Suc-HSA handelt es sich um ein modifiziertes HSA, bei dem durch Succinylierung der Amino-Gruppen die Lysin-Seitengruppe verlängert und dadurch eine Carboxyl-Gruppe eingeführt wird. Dadurch wird ein stark negativ geladenes Protein erhalten, das zu den Polyanionen gezählt wird (Jansen *et al.*, 1993). Da sowohl Suc-HSA als auch VEBP durch die Modifikation von Humanem Serum Albumin erhalten werden und da es sich bei beiden Substanzen um stark negativ geladenene Proteine handelt, liegt aufgrund der ebenfalls ähnlichen EC₅₀-Werte die Vermutung nahe, dass auch der Mechanismus der Neutralisation für beide Proteine ähnlich sein könnte. Der Mechanismus der Inhibition des Eintritts von HIV-1 in Zellen

für Suc-HSA konnte aufgeklärt werden. Die Inhibition beruht auf der Interaktion des negativen Proteins mit der positiv geladenen V3 Schleife des viralen gp120 (Kuipers *et al.*, 1999), wodurch die Bindung von gp120 an den Corezeptor von HIV-1 verhindert wird. Die Neutralisationseffizienz von Suc-HSA korreliert mit der Ladung der V3-Schleife des viralen gp120. Je höher die Gesamtnettoladung der V3 Schleife ist, desto effektiver ist auch die Neutralisation, da die Interaktion zwischen dem negativ geladenen Protein und der positiv geladenen V3 Schleife stärker wird. Folgende Gründe sprechen für einen ähnlichen Mechanismus der Neutralisation der HIV-Infektion von VEBP wie bei Suc-HSA:

- Für VEBP konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass VEBP mit gp120 interagiert (siehe Abbildung 9 auf Seite 47).
- In SPR-Messungen mit unterschiedlichen gp120 Hüllproteinen, die sich im Tropismus und damit in der Ladung der V3 Schleife unterschieden, konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von VEBP mit gp120 mit steigender Gesamtnettoladung der V3 Schleife zunimmt (siehe Abbildung 19 auf Seite 69).
- Die Neutralisationseffizienz von VEBP steigt ebenfalls mit steigender V3-Gesamtnettoladung. (siehe Abbildung 20 auf Seite 72).

Ausser Suc-HSA gibt es gegen HIV-1 keine vergleichbaren Inhibitoren, die HIV-1 effizient neutralisieren und ebenfalls keine toxischen Reaktionen zeigen. Dies ist der wesentliche Unterschied zu den existierenden Studien mit polyanionischen Inhibitoren bei WNV. Gegen WNV Infektionen wurden die beiden Verbindungen Hypericin und Suramin getestet (Morrey *et al.*, 2002). Beide Substanzen zeigen eine EC_{50} von 10 bzw 80 $\mu\text{g/ml}$. Die IC_{50} ist aber gleich gross und damit beruht die Wirkung dieser Substanzen auf einer Schädigung der Zellen und nicht auf einer Inhibition des Virus „Entry“ durch Blockade einer Virus—Zell Interaktion. VEBP zeigt gegen WNV eine gute Neutralisation mit einer EC_{50} von 15 μg VEBP/ml. VEBP zeigt allerdings in diesem Konzentrationsbereich keinerlei toxische Wirkungen auf das Zellwachstum der verwendeten Vero-B4 Zellen sowohl im ^3H -Thymidin-Test als auch im Apoptosetest. Selbst bei hohen VEBP Konzentrationen von 200 $\mu\text{g/ml}$ kann die Infektion von Vero Zellen mit Dengue-2 Virus beobachtet werden. Die Zellen sind also noch unter diesen Bedingungen in der Lage, Virus zu produzieren. Gerade die Versuche mit den beiden Virentypen Gelbfieber und Dengue-2 zeigen, dass auch bei hohen VEBP

Konzentrationen eine normale Virusvermehrung stattfindet. So zeigen 160 µg VEBP/ml keinen Einfluss auf die Virusvermehrung. Das gleiche gilt für das Dengue-2 Virus. Dies ist umso bemerkenswerter, da sich das Dengue-2 Virus gerade im E-Protein und der B-Domäne nur gering von dem WNV unterscheidet. Dies zeigt einerseits die Spezifität des VEBP Proteins und andererseits eröffnet es die Möglichkeit, zu erforschen, worauf der neutralisierende Effekt gegen das WNV beruht.

Ein wichtiger Hinweis dafür, dass die Inhibition der West-Nil Virus Infektion auf der Hinderung des Virus am Eintritt in die Zelle beruht, konnte durch Experimente gefunden werden, bei denen der Zeitpunkt der VEBP-Zugabe variiert wurde (siehe Abbildung 27). Wurde die Infektion in Anwesenheit von VEBP durchgeführt, so konnte diese zu 100 % neutralisiert werden. Wenn jedoch die VEBP-Zugabe erst 1 h nach der Virus-Zugabe erfolgte, wurden Zellen mit West-Nil Virus infiziert. Diese infizierten Zellen werden nun neue Viren produzieren und die Infektion wird sich in der Zellkultur ausbreiten. Nach erfolgter Infektion wurde wieder VEBP zugegeben. Durch die spätere VEBP-Zugabe konnte tatsächlich die weitere Vermehrung (virus spreading) des Virus verhindert werden. Dies zeigt sich dadurch, dass in Gegenwart von VEBP insgesamt weniger Zellen infiziert wurden, als wenn gar kein VEBP zugesetzt wurde. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Eintritt des West-Nil Virus in die Zellen durch VEBP behindert wird und dass dieser Effekt auf der Interaktion von VEBP mit dem viralen E-Protein beruht.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass gerade die Experimente mit den beiden Flaviviren Gelbfieber und Dengue-2 zeigen, wie verträglich VEBP in Bezug auf das Zellwachstum ist und wie virusspezifisch die Neutralisation ist. Eine mögliche Erklärung für die Virusspezifität wäre, dass die Flaviviren verschiedene zelluläre Rezeptoren für den Eintritt in die Wirtszelle verwenden. Für Dengue Virus wurde DC-SIGN als Rezeptor auf dendritischen Zellen publiziert (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003). Der Rezeptor für Gelbfieber Virus ist dagegen noch nicht bekannt.

In den letzten Monaten wurde VEBP auch von anderen Mitarbeitern in verschiedenen Zellkultursystemen getestet. Ein sehr empfindliches Zellkultursystem ist die *in vitro* Züchtung der *Plasmodium falciparum* Malaria-Parasiten in roten Blutkörperchen. Die Parasiten reagieren sehr empfindlich auf „falsche“ Zellkulturbedingungen. VEBP zeigt in diesem System keinen negativen Einfluss auf das Parasitenwachstum bei

Konzentrationen von 100 und 200 µg/ml (persönliche Mitteilung M. Schreiber). Dies dokumentiert ebenfalls die geringen toxischen Eigenschaften des antiviralen VEBP. Auch die WNV Neutralisationsstudien zeigen, wie vorher schon die HIV-Studien, dass bei hohen VEBP Konzentrationen die verwendeten Zellen genauso gut wachsen wie in der Kultur ohne VEBP.

Im Unterschied zu HIV-1 kann über den Mechanismus der Inhibition von West-Nil Virus nur spekuliert werden. Der zelluläre Rezeptor für die West-Nil Virus Infektion, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, ist erst vor wenigen Wochen publiziert worden (Chu & Ng, 2004) und über die Art der Interaktion des viralen E-Proteins mit diesem Rezeptor ist bisher wenig bekannt. Aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen VEBP und gp120, die zur Inhibition der Infektion bei HIV-1 führen, ist es naheliegend, für die Inhibition der West-Nil Virus Infektion einen ähnlichen Mechanismus zu vermuten. Interessanterweise lassen sich beide Viren, HIV-1 und WNV, durch Heparansulfat inaktivieren. Diese Tatsache gewinnt an Bedeutung, da in letzter Zeit gezeigt wurde, dass HIV-1 an Syndekane bindet. Das sind Proteine mit großen Heparanpolymeren auf der Oberfläche von Zellen. Wie Bobardt *et al.*, (2004) zeigen konnte, ist diese Interaktion zwischen Syndekanen und dem HIV-1 von einer bestimmten Aminosäure gesteuert. Diese Aminosäure liegt überraschenderweise innerhalb der V3 Schleife – verantwortlich ist ein Asparaginrest.

Die Infektion von Zellen mit Hantaan Virus erfolgt mittels des gleichen Rezeptors, den auch West-Nil Virus für den Eintritt in die Zelle benutzt ($\alpha_v\beta_3$ -Integrin, Gavrilovskaya *et al.*, 1998, 1999). Aus diesem Grund wurde auch vermutet, dass sich die Infektion mit Hantaan Virus ebenso wie die Infektion mit West-Nil Virus durch VEBP inhibieren lässt. In Infektionsexperimenten mit Vero B4-Zellen konnte diese Vermutung bestätigt werden (siehe Abbildung 29 auf Seite 91). Die EC_{50} von VEBP für die Inhibition der Hantaan-Infektion liegt bei etwa 12 µg/ml. Dieser Wert passt sehr gut zu dem für die Inhibition der West-Nil Virus Infektion erhaltenen Wert von 15 µg/ml VEBP. Da beide Viren den gleichen Rezeptor benutzen, ist auch ein ähnlicher EC_{50} -Wert für die Inhibition der Infektion beider Viren durch VEBP in der gleichen Zelllinie zu erwarten. Die Infektion der Hantaan Virus Infektion lässt sich im Gegensatz zu der West-Nil Virus Infektion nicht zu 100 % durch VEBP neutralisieren (siehe Abbildung 29 auf Seite 91). Selbst bei Zugabe von 200 µg/ml VEBP während der Infektion der Zellen mit

Hantaan Virus lassen sich in der Immunfluoreszenz der Vero B4-Zellen noch infizierte Zellen finden. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt wäre, dass es trotz des gleichen Rezeptors wie bei der Infektion von Zellen mit West-Nil Virus einen Unterschied bei der Infektion von Zellen durch Hantaan Virus geben muss. Wenn das Hantaan Virus beispielsweise neben dem $\alpha\beta_3$ -Integrin einen weiteren Rezeptor für die Infektion von Zellen verwendet, dessen Interaktion mit dem G2-Protein weniger stark von VEBP gehemmt wird, wäre der beobachtete Effekt gut erklärbar. Tatsächlich konnte für Hantaan Virus ein möglicher weiterer zellulärer Rezeptor gefunden werden (Kim *et al.*, 2002). Hierbei handelt es sich um ein bisher noch nicht weiter charakterisiertes, 30 kDa grosses Zelloberflächenprotein.

5.3 Ausblick

Die Transformation von HSA in das antivirale VEBP beruht auf einer äusserst einfachen Prozedur, die sehr leicht umgesetzt werden kann und vergleichsweise günstig ist.

Als antivirales, nicht toxisches Mikrobizid, als Zusatz zu Blutkonserven oder zur affinitätschromatographischen Reinigung viraler Antigene könnte VEBP eine Rolle im Kampf gegen virale Infektionen spielen. Neben seinen bisher gezeigten antiviralen Eigenschaften gegen die verschiedenen HIV-1 Varianten und die „Emerging Viruses“ West-Nil und Hantaan ist es durchaus denkbar, dass VEBP auch anti-pathogene Eigenschaften gegen Viren besitzt, die wir heute noch nicht kennen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass humanes Serumalbumin durch einen einfachen Oxidationsschritt in ein antivirales Protein transformiert werden kann. Das modifizierte Serumalbumin ist ein wirksamer Inhibitor für die drei Viren HIV-1, West-Nil und Hantaan. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das HOCl-modifizierte Serumalbumin auch *Virus Envelope Binding Protein* (VEBP) genannt, da in Bindungsstudien eine spezifische Bindung des modifizierten Proteins an HIV-1 gp120 und die West-Nil B-Domäne gezeigt wurde. Diese Bindungsstudien wurden mit der Methode der *Surface Plasmon Resonance* (SPR) durchgeführt. Dabei wurden die viralen Hüllproteine gp120 und die B-Domäne an die Dextranoberfläche eines Sensorchips gekoppelt. Als Analyt wurde VEBP in verschiedenen Konzentrationen auf eine Bindung zu diesen beiden Proteinen getestet und eine spezifische Interaktion konnte jeweils gezeigt werden. Aus den SPR-Daten für die VEBP-gp120 Interaktion lässt sich eine Bindungskonstante von etwa 3×10^{-8} M berechnen. Damit ist die VEBP-Bindung an gp120 im Bereich eines spezifischen anti-gp120 Antikörpers.

Die antiviralen Eigenschaften des VEBP gegen HIV-1, West-Nil und Hantaan Virus wurden im Zellsystem untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl HIV-1 des X4-, R5X4- und R5-tropen Typs neutralisiert wurden ($EC_{50} = 2 - 50 \mu\text{g VEBP / ml}$). Die Effizienz der HIV-1 Neutralisation war für X4-trope Viren grösser als für R5-trope Viren. Bei den Untersuchungen zum West-Nil und Hantaan Virus zeigte sich ebenfalls eine sehr effiziente Neutralisation der Viren durch VEBP (WNV: $EC_{50} 15 \mu\text{g/ml}$, HTN: $EC_{50} = 12 \mu\text{g/ml}$).

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass VEBP im Bereich der HIV-1 gp120 V3 Schleife bindet, da komplexe Kohlenhydrate im Bereich der V3 Schleife die Effizienz der VEBP Neutralisation beeinflussen. Die HIV-1 Varianten, welche alle N-Glycosylierungsstellen im gp120, besonders im Bereich der V3 Schleife, besitzen, sind nicht so gut neutralisierbar wie HIV-1 Viren, denen z. B. das N-Glycan g15 innerhalb der V3 Schleife fehlt. Damit wurde die Rolle des N-Glycans g15 für den Schutz des HIV-1 gegen antivirale gp120-bindende Substanzen erneut bestätigt.

Im Unterschied zu den HIV-1, WNV und HTN-spezifischen Neutralisationseigenschaften zeigte VEBP keinerlei antivirale Effekte gegen das Gelbfieber- und Dengue Virus. Diese Viren wurden auch durch hohe VEBP-Konzentrationen nicht an einer Infektion gehindert. Gerade die Wirksamkeit gegen

WNV und die Unwirksamkeit gegen Dengue Virus zeigen die besondere „Spezifität“ des Inhibitors.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal berichtet, dass sich Serumalbumin durch HOCl in eine antivirale Substanz transformieren lässt. Interessant ist dies, da HOCl im Körper durch das Myeloperoxidase-H₂O₂-Cl⁻-System produziert wird und sich HOCl-modifizierte Proteine im Körper mit Hilfe monoklonaler Antikörper nachweisen lassen. Die starke Bindung an gp120 und die WNV B-Domäne ohne die Aminosäuresequenz-Spezifität eines Antikörpers machen VEBP zu einem interessanten Kandidaten für weitere Forschungen auf dem Weg zu einer antiviralen Substanz mit breitem Wirkungsspektrum.

7. Literaturverzeichnis

- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., and Berger, E. A.** (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958.
- Anderson, M. M., Hazen, S. L., Hsu, F. F., and Heinecke, J. W.** (1997). Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J.Clin.Invest* **99**, 424-432.
- Armesto, X. L., Canle, L., and Santaballa, J. A.** (1993). alpha-amino acids chlorination in apueous media. *Tetrahedron* **49**, 275-284.
- Ashorn, P. A., Berger, E. A., and Moss, B.** (1990). Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein/CD4-mediated fusion of nonprimate cells with human cells. *J.Virol.* **64**, 2149-2156.
- Asjo, B., Morfeldt-Manson, L., Albert, J., Biberfeld, G., Karlsson, A., Lidman, K., and Fenyo, E. M.** (1986). Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* **2**, 660-662.
- Baba, M., Snoeck, R., Pauwels, R., and de Clercq, E.** (1988). Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob.Agents Chemother.* **32**, 1742-1745.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L.** (2004). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Rev.Invest Clin.* **56**, 126-129.

- Bobardt, M. D., Salmon, P., Wang, L., Esko, J. D., Gabuzda, D., Fiala, M., Trono, D., Van der, S. B., David, G., and Gallay, P. A.** (2004). Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. *J.Virol.* **78**, 6567-6584.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., and Falkow, S.** (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. In 'Gene'. pp. 95-113.
- Brennan, R. O. and Durack, D. T.** (1981). Gay compromise syndrome. *Lancet* **2**, 1338-1339.
- Cabrera, C., Witvrouw, M., Gutierrez, A., Clotet, B., Kuipers, M. E., Swart, P. J., Meijer, D. K., Desmyter, J., de Clercq, E., and Este, J. A.** (1999). Resistance of the human immunodeficiency virus to the inhibitory action of negatively charged albumins on virus binding to CD4. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **15**, 1535-1543.
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G., and Brandt, W. E.** (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J.Gen.Virol.* **70** (Pt 1), 37-43.
- Callahan, L. N., Phelan, M., Mallinson, M., and Norcross, M. A.** (1991). Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120-CD4 interactions. *J.Virol.* **65**, 1543-1550.
- Capozzi, G. and Modena, G.** (1974). Oxidation of thiols. In 'The chemistry of the thiol group, Part 2'. (Ed. S. Patai.) pp. 785-839. (John Wiley & Sons: Bristol.)
- Carr, A. C., van den Berg, J. J., and Winterbourn, C. C.** (1996). Chlorination of cholesterol in cell membranes by hypochlorous acid. *Arch.Biochem.Biophys.* **332**, 63-69.

- Carrow, E. W., Vujcic, L. K., Glass, W. L., Seamon, K. B., Rastogi, S. C., Hendry, R. M., Boulos, R., Nzila, N., and Quinnan, G. V., Jr.** (1991). High prevalence of antibodies to the gp120 V3 region principal neutralizing determinant of HIV-1MN in sera from Africa and the Americas. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **7**, 831-838.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., and Marks, R. M.** (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat.Med.* **3**, 866-871.
- Chu, J. J. and Ng, M. L.** (2004). Interaction of West Nile virus with $\alpha V\beta 3$ integrin mediates virus entry into cells. *J.Biol.Chem.*
- Clapham, P. R., Blanc, D., and Weiss, R. A.** (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**, 703-715.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., and .** (1986). Human immunodeficiency viruses. *Science* **232**, 697.
- Cohen, M. S.** (1982). Epidemic hemorrhagic fever revisited. *Rev.Infect.Dis.* **4**, 992-995.
- Crill, W. D. and Roehrig, J. T.** (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J.Virol.* **75**, 7769-7773.
- Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., and Weiss, R. A.** (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767.
- Davis, L. C. and Radke, G. A.** (1987). Measurement of protein using flow injection analysis with bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* **161**, 152-156.
- de Moreno, M. R., Smith, J. F., and Smith, R. V.** (1986). Mechanism studies of coomassie blue and silver staining of proteins. *J.Pharm.Sci.* **75**, 907-911.

- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhardt, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., and Landau, N. R.** (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666.
- Dimitrov, D. S., Xiao, X., Chabot, D. J., and Broder, C. C.** (1998). HIV coreceptors. *J.Membr.Biol.* **166**, 75-90.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., and Paxton, W. A.** (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673.
- Drozd, R., Naskalski, J. W., and Sznajd, J.** (1988). Oxidation of amino acids and peptides in reaction with myeloperoxidase, chloride and hydrogen peroxide. *Biochim.Biophys.Acta* **957**, 47-52.
- Elliott, R. M.** (1994). Bunyaviruses, Replication. In 'Encyclopedia of Virology'. (Eds. R. G. Webster and A. Granoff.) pp. 192-6. (Academic Press:
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A.** (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877.
- Frank, H., Schwarz, H., Graf, T., and Schafer, W.** (1978). Properties of mouse leukemia viruses. XV. Electron microscopic studies on the organization of Friend leukemia virus and other mammalian C-type viruses. *Z.Naturforsch.[C.]* **33**, 124-138.
- Fu, S., Wang, H., Davies, M., and Dean, R.** (2000). Reactions of hypochlorous acid with tyrosine and peptidyl-tyrosyl residues give dichlorinated and aldehydic products in addition to 3-chlorotyrosine. *J.Biol.Chem.* **275**, 10851-10858.
- Fu, X., Kassim, S. Y., Parks, W. C., and Heinecke, J. W.** (2001). Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J.Biol.Chem.* **276**, 41279-41287.

- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., and .** (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503.
- Garcin, D., Lezzi, M., Dobbs, M., Elliott, R. M., Schmaljohn, C., Kang, C. Y., and Kolakofsky, D.** (1995). The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. *J.Virol.* **69**, 5754-5762.
- Gavrilovskaya, I. N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M. H., and Mackow, E. R.** (1998). beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 7074-7079.
- Gavrilovskaya, I. N., Brown, E. J., Ginsberg, M. H., and Mackow, E. R.** (1999). Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J.Virol.* **73**, 3951-3959.
- Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H., Ozel, M., Pauli, G., and Koch, M. A.** (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**, 171-176.
- Geyer, H., Holschbach, C., Hunsmann, G., and Schneider, J.** (1988). Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. *J.Biol.Chem.* **263**, 11760-11767.
- Gonzalez, S. F., Shope, R. E., Calisher, C. E., and Nathanson, N.** (1982). Characterization of monoclonal antibodies against the G1 and N proteins of La Crosse and Tahyna, two California serogroup bunyaviruses. *Virology* **120**, 42-53.
- Gottlieb, G. J., Ragaz, A., Vogel, J. V., Friedman-Kien, A., Rywlin, A. M., Weiner, E. A., and Ackerman, A. B.** (1981). A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men. *Am.J.Dermatopathol.* **3**, 111-114.
- Grady, L. J., Srihongse, S., Grayson, M. A., and Deibel, R.** (1983). Monoclonal antibodies against La Crosse virus. *Journal of General Virology* **64**, 1699-1704.

- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Harrop, H. A., Coombe, D. R., and Rider, C. C.** (1994). Heparin specifically inhibits binding of V3 loop antibodies to HIV-1 gp120, an effect potentiated by CD4 binding. *AIDS* **8**, 183-192.
- Harrop, H. A. and Rider, C. C.** (1998). Heparin and its derivatives bind to HIV-1 recombinant envelope glycoproteins, rather than to recombinant HIV-1 receptor, CD4. *Glycobiology* **8**, 131-137.
- Hawkins, C. L. and Davies, M. J.** (1998). Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem.J.* **332 (Pt 3)**, 617-625.
- Hawkins, C. L. and Davies, M. J.** (1999). Hypochlorite-induced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation. *Biochem.J.* **340 (Pt 2)**, 539-548.
- Hazell, L. J., Arnold, L., Flowers, D., Waeg, G., Malle, E., and Stocker, R.** (1996). Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions. *J.Clin.Invest* **97**, 1535-1544.
- Hazen, S. L., d'Avignon, A., Anderson, M. M., Hsu, F. F., and Heinecke, J. W.** (1998). Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to oxidize alpha-amino acids to a family of reactive aldehydes. Mechanistic studies identifying labile intermediates along the reaction pathway. *J.Biol.Chem.* **273**, 4997-5005.
- Heinz, F. X., Auer, G., Stiasny, K., Holzmann, H., Mandl, C., Guirakhoo, F., and Kunz, C.** (1994). The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. *Arch.Virol.Suppl* **9**, 339-348.
- Heinz, F. X. and Allison, S. L.** (2001). The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr.Opin.Microbiol.* **4**, 450-455.

- Herold, B. C., Gerber, S. I., Belval, B. J., Siston, A. M., and Shulman, N.** (1996). Differences in the susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 to modified heparin compounds suggest serotype differences in viral entry. *J.Virol.* **70**, 3461-3469.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R.** (1985). Simplified method for silver staining of protein in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoreses* **6**, 103-112.
- Hung, J. J., Hsieh, M. T., Young, M. J., Kao, C. L., King, C. C., and Chang, W.** (2004). An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J.Virol.* **78**, 378-388.
- Hwang, S. S., Boyle, T. J., Lyerly, H. K., and Cullen, B. R.** (1991). Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**, 71-74.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Ito, M., Baba, M., Sato, A., Pauwels, R., de Clercq, E., and Shigeta, S.** (1987). Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *Antiviral Res.* **7**, 361-367.
- Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W., and King, A. M.** (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J.Virol.* **70**, 5282-5287.
- Jansen, R. W., Schols, D., Pauwels, R., de Clercq, E., and Meijer, D. K.** (1993). Novel, negatively charged, human serum albumins display potent and selective in vitro anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Mol.Pharmacol.* **44**, 1003-1007.
- Jin, M., Park, J., Lee, S., Park, B., Shin, J., Song, K. J., Ahn, T. I., Hwang, S. Y., Ahn, B. Y., and Ahn, K.** (2002). Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology* **294**, 60-69.

- Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lau, J. Y., and Lipkin, W. I.** (2000). Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J.Infect.Dis.* **182**, 1214-1217.
- Kettle, A. J. and Winterbourn, C. C.** (1997). *Redox Rep.* **3**, 3-15.
- Kim, T. Y., Choi, Y., Cheong, H. S., and Choe, J.** (2002). Identification of a cell surface 30 kDa protein as a candidate receptor for Hantaan virus. *J.Gen.Virol.* **83**, 767-773.
- Kim, T. Y., Choi, Y., Cheong, H. S., and Choe, J.** (2002). Identification of a cell surface 30 kDa protein as a candidate receptor for Hantaan virus. *J.Gen.Virol.* **83**, 767-773.
- Kingford, L., Ishizawa, L. D., and Hill, D. W.** (1983). Biological activities of monoclonal antibodies reactive with antigenic sites mapped on the G1 glycoprotein of La Crosse virus. *Virology* **90**, 443-445.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C., and Montagnier, L.** (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-768.
- Klebanoff, S. J.** (1988). 'Inflammation: Basic principles and clinical correlates.' (Raven Press: New York.)
- Klebanoff, S. J.** (1991). 'Peroxidases in Chemistry and Biology.' (CRC Press: Boca Raton.)
- Klebanoff, S. J.** (1999). Myeloperoxidase. *Proc.Assoc.Am.Physicians* **111**, 383-389.
- Krusat, T. and Streckert, H. J.** (1997). Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch.Virol.* **142**, 1247-1254.
- Kuipers, M. E., vd, B. M., Swart, P. J., Laman, J. D., Meijer, D. K., Koppelman, M. H., and Huisman, H.** (1999). Mechanism of anti-HIV activity of succinylated human serum albumin. *Biochem.Pharmacol.* **57**, 889-898.

- Lasky, L. A., Groopman, J. E., Fennie, C. W., Benz, P. M., Capon, D. J., Dowbenko, D. J., Nakamura, G. R., Nunes, W. M., Renz, M. E., and Berman, P. W.** (1986). Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein. *Science* **233**, 209-212.
- Lee, C., Levin, A., and Branton, D.** (1987). Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal.Biochem.* **166**, 308-312.
- Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N., and Gregory, T. J.** (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.* **265**, 10373-10382.
- Levy, J. P.** (1998). AIDS vaccine development. *Science* **280**, 806-807.
- Lu, M., Blacklow, S. C., and Kim, P. S.** (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat.Struct.Biol.* **2**, 1075-1082.
- Luscher-Mattli, M.** (2000). Polyanions--a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases? *Antivir.Chem.Chemother.* **11**, 249-259.
- Maddon, P. J., Dalglish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A., and Axel, R.** (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**, 333-348.
- Malle, E., Hazell, L., Stocker, R., Sattler, W., Esterbauer, H., and Waeg, G.** (1995). Immunologic detection and measurement of hypochlorite-modified LDL with specific monoclonal antibodies. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **15**, 982-989.
- Mason, P. W., Zugel, M. U., Semproni, A. R., Fournier, M. J., and Mason, T. L.** (1990). The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in Escherichia coli. *J.Gen.Virol.* **71 (Pt 9)**, 2107-2114.
- Mitsuya, H., Looney, D. J., Kuno, S., Ueno, R., Wong-Staal, F., and Broder, S.** (1988). Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4+ cells. *Science* **240**, 646-649.

- Mizuochi, T., Spellman, M. W., Larkin, M., Solomon, J., Basa, L. J., and Feizi, T.** (1988). Carbohydrate structures of the human-immunodeficiency-virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem.J.* **254**, 599-603.
- Mondor, I., Ugolini, S., and Sattentau, Q. J.** (1998). Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J.Virol.* **72**, 3623-3634.
- Morrey, J. D., Smee, D. F., Sidwell, R. W., and Tseng, C.** (2002). Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus. *Antiviral Res.* **55**, 107-116.
- Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P. D., and Sattentau, Q. J.** (2000). Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J.Virol.* **74**, 1948-1960.
- Nathanson, N. and Gonzalez-Scarano, F.** (1994). Bunyaviruses, General Features. In 'Encyclopedia of Virology'. (Eds. R. G. Webster and A. Granoff.) pp. 185-92. (Academic Press:
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and Despres, P.** (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* **4**, 723-728.
- O'Leary, D. R., Marfin, A. A., Montgomery, S. P., Kipp, A. M., Lehman, J. A., Biggerstaff, B. J., Elko, V. L., Collins, P. D., Jones, J. E., and Campbell, G. L.** (2004). The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* **4**, 61-70.
- Okada, T., Patterson, B. K., and Gurney, M. E.** (1995). Inhibition of anti-V3 domain antibody binding to human immunodeficiency virus type-1-infected cells by sulfated polysaccharides. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **209**, 850-858.

- Pattison, D. I. and Davies, M. J.** (2001). Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem.Res.Toxicol.* **14**, 1453-1464.
- Pereira, W. E., Hoyano, Y., Summons, R. E., Bacon, V. A., and Duffield, A. M.** (1973). Chlorination studies. II. The reaction of aqueous hypochlorous acid with alpha-amino acids and dipeptides. *Biochim.Biophys.Acta* **313**, 170-180.
- Polzer, S., Dittmar, M. T., Schmitz, H., and Schreiber, M.** (2002). The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology* **304**, 70-80.
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C.** (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500.
- Prutz, W. A.** (1996). Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch.Biochem.Biophys.* **332**, 110-120.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., and Harrison, S. C.** (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375**, 291-298.
- Rey, F. A.** (2003). Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 6899-6901.
- Rey, F. A.** (2003). Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 6899-6901.
- Roehrig, J. T., Johnson, A. J., Hunt, A. R., Bolin, R. A., and Chu, M. C.** (1990). Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology* **177**, 668-675.
- Salzwedel, K. and Berger, E. A.** (2000). Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 12794-12799.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual.' (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor.)

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.** (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**, 104-108.
- Sarnadharan, M. G., DeVico, A. L., Bruch, L., Schupbach, J., and Gallo, R. C.** (1984). HTLV-III: the etiologic agent of AIDS. *Princess Takamatsu Symp.* **15**, 301-308.
- Sattentau, Q. J., Clapham, P. R., Weiss, R. A., Beverley, P. C., Montagnier, L., Alhalabi, M. F., Gluckmann, J. C., and Klatzmann, D.** (1988). The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *AIDS* **2**, 101-105.
- Savige, W. E. and Maclaren, J. A.** (1966). Oxidation of disulphides, with special reference to cystine. In 'The chemistry of organic sulfur compounds'. (Eds. M. Kharash and C. Y. Myers.) pp. 367-402. (Pergamon Press: Oxford.)
- Schonning, K., Jansson, B., Olofsson, S., Nielsen, J. O., and Hansen, J. S.** (1996). Resistance to V3-directed neutralization caused by an N-linked oligosaccharide depends on the quaternary structure of the HIV-1 envelope oligomer. *Virology* **218**, 134-140.
- Schreiber, M., Wachsmuth, C., Muller, H., Odemuyiwa, S., Schmitz, H., Meyer, S., Meyer, B., and Schneider-Mergener, J.** (1997). The V3-directed immune response in natural human immunodeficiency virus type 1 infection is predominantly directed against a variable, discontinuous epitope presented by the gp120 V3 domain. *J.Virol.* **71**, 9198-9205.
- Severson, W. E., Schmaljohn, C. S., Javadian, A., and Jonsson, C. B.** (2003). Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J.Virol.* **77**, 481-488.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., and Spear, P. G.** (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**, 13-22.
- Su, C. M., Liao, C. L., Lee, Y. L., and Lin, Y. L.** (2001). Highly sulfated forms of heparin sulfate are involved in japanese encephalitis virus infection. *Virology* **286**, 206-215.

- Tassaneeritthep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumpheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D. L., Steinman, R. M., Schlesinger, S., and Marovich, M. A.** (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J.Exp.Med.* **197**, 823-829.
- Theiler, M. and Smith, H. H.** (2000). The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* **65**, 787-800 (1937). *Rev.Med.Virol.* **10**, 6-16.
- Thomas, E. L.** (1979). Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal action against Escherichia coli. *Infect.Immun.* **23**, 522-531.
- Thullier, P., Demangel, C., Bedouelle, H., Megret, F., Jouan, A., Deubel, V., Mazie, J. C., and Lafaye, P.** (2001). Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. *J.Gen.Virol.* **82**, 1885-1892.
- Trybala, E., Bergstrom, T., Spillmann, D., Svennerholm, B., Flynn, S. J., and Ryan, P.** (1998). Interaction between pseudorabies virus and heparin/heparan sulfate. Pseudorabies virus mutants differ in their interaction with heparin/heparan sulfate when altered for specific glycoprotein C heparin-binding domain. *J.Biol.Chem.* **273**, 5047-5052.
- Ueno, R. and Kuno, S.** (1987). Dextran sulphate, a potent anti-HIV agent in vitro having synergism with zidovudine. *Lancet* **1**, 1379.
- VanCott, T. C., Bethke, F. R., Polonis, V. R., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S., Redfield, R. R., and Birx, D. L.** (1994). Dissociation rate of antibody-gp120 binding interactions is predictive of V3-mediated neutralization of HIV-1. *J.Immunol.* **153**, 449-459.
- Visser, M. C. and Winterbourn, C. C.** (1991). Oxidative damage to fibronectin. I. The effects of the neutrophil myeloperoxidase system and HOCl. *Arch.Biochem.Biophys.* **285**, 53-59.

- Watanabe, S.** (1998). [The receptor and pathways for human cytomegalovirus entry]. *Nippon Rinsho* **56**, 44-49.
- Weiss, S. J. and LoBuglio, A. F.** (1982). Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* **47**, 5-18.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C.** (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-430.
- Westman, E. and Harris, H. E.** (2004). Alteration of an autoantigen by chlorination, a process occurring during inflammation, can overcome adaptive immune tolerance. *Scand.J.Immunol.* **59**, 458-463.
- Winterbourn, C. C., van den Berg, J. J., Roitman, E., and Kuypers, F. A.** (1992). Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Arch.Biochem.Biophys.* **296**, 547-555.
- Zanotto, P. M., Gould, E. A., Gao, G. F., Harvey, P. H., and Holmes, E. C.** (1996). Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 548-553.
- Zgliczynski, J. M., Stelmaszynska, T., Ostrowski, W., Naskalski, J., and Sznajd, J.** (1968). Myeloperoxidase of human leukaemic leucocytes. Oxidation of amino acids in the presence of hydrogen peroxide. *Eur.J.Biochem.* **4**, 540-547.
- Zgliczynski, J. M., Stelmaszynska, T., Domanski, J., and Ostrowski, W.** (1971). Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Biochim.Biophys.Acta* **235**, 419-424.
- Zhu, Z., Gershon, M. D., Ambron, R., Gabel, C., and Gershon, A. A.** (1995). Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 3546-3550.
- Zwart, G., Langedijk, H., van der, H. L., de Jong, J. J., Wolfs, T. F., Ramautarsing, C., Bakker, M., de Ronde, A., and Goudsmit, J.** (1991). Immunodominance and antigenic variation of the principal neutralization domain of HIV-1. *Virology* **181**, 481-489.

8. Anhang

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Voßmann
Vorname: Markus
Geburtsdatum: 25.03.1975
Geburtsort: Cloppenburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

Ausbildung:

Schulbildung: Herbst 1981 - Sommer 1985: Grundschule Garrel
Herbst 1985 - Sommer 1987: Orientierungsstufe Garrel
Herbst 1987 - Sommer 1994: Clemens-August-Gymnasium
Cloppenburg
09.06.1994 Abitur

Zivildienst: 01.08.1994 - 31.10.1995: Heimvolkshochschule Stapelfeld

Studium: 16.10.1995 - 16.10.2000: Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum
19.01.2000 - 16.10.2000: Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie (Prof. Dr. H. Werchau) der Ruhr-Universität Bochum
Thema: Isolierung und Charakterisierung des SH-Proteins von Respiratory Syncytial Virus

Promotion: seit dem 01.02.2001: Promotion in der Abteilung für Virologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg bei Herrn Prof. H. Schmitz
Thema: Neutralisation von Varianten von HIV-1, West-Nil Virus und Hantaan Virus mit modifiziertem HSA

8.2 Veröffentlichungen

Voßmann, M., Kirst, M., Hauser, H., Schreiber, M.: Direct analysis of gp120-receptor binding using infectious viral particles by a new developed surface plasmon resonance assay. *First International Meeting on Glycovirolgy: Viruses and Glycans. Göteborg, 2003* (Vortrag)

Voßmann, M., Hauser, H., Schreiber, M.: Interaktionsmessung von Proteinen mit HIV-1 Partikeln mit Hilfe von Biacore. *Biacore Workshop Göttingen, 2003* (Vortrag)

Voßmann, M., Waase, I., Manegold, C., Dietrich, M., Schmitz, H., Schreiber, M.: V3 specific antibodies are present in sera from long-term non-progressors but not in sera from fast progressing HIV-1 infected individuals. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Erlangen 2002* (Vortrag)

Voßmann, M., Kirst, M., Hauser, H., Schreiber, M.: Direct analysis of gp120-receptor binding using infectious viral particles and a new developed surface plasmon resonance assay. *HIV Pathogenesis. Whistler, Kanada 2004* (Poster)

Voßmann, M., Kirst, M., Hauser, H., Schreiber, M.: Direct analysis of gp120-receptor binding using infectious viral particles by a new developed surface plasmon resonance assay. *First International Meeting on Glycovirolgy: Viruses and Glycans. Göteborg, 2003* (Poster)

Voßmann, M., Kirst, M., Brodde, M., Kehrel, B., Schreiber, M.: Binding of chemically modified serum albumins to HIV-1 gp120. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Berlin 2003* (Poster)

8.3 Abkürzungsverzeichnis

ad	zu
Abb.	Abbildung
Acc.-Nr.	Accession-Nummer
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrom
APS	Amoniumpersulfat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
Da	Dalton
DMEM	Dublecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	<i>effective concentration</i> ; Konzentration, bei der die Infektionsrate um 50 % gemindert wird
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
Env	envelope Protein
et al.	lateinisch: et alii, und andere
FCS	fetal calf serum
gp	Glykoprotein
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HTNV	Hantaan Virus
LB	Luria Bertani
LTR	long terminal repeats
M	Molar
min	Minute
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]

pH	lateinisch: pondus hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PI	Patientenisolat
RNA	ribonucleic acid, Ribonucleinsäure
SDS	sodium dodecyl sulphate
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCID	tissue culture infectious dose
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
VEBP	virus envelope binding protein (HSA, das mit 500-fachem Überschuss HOCl oxidiert wurde)
WNV	West-Nil Virus
WT	Wild-Typ
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid

Danksagung

Herrn Dr. Michael Schreiber danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, dieses selbständig zu bearbeiten. Außerdem danke ich ihm für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion und für seine wertvollen Tipps bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Herbert Schmitz möchte ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit danken.

Für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Professor Dr. Günter Adam bedanken.

Herrn Professor Dr. Bernd Meyer danke ich für die Organisation des Graduiertenkollegs „Glycoconjugate“. Auch allen Teilnehmern des Graduiertenkollegs danke ich für interessante Vorträge und die angenehme Atmosphäre im Kolleg.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Abteilung für Virologie. Die stete Hilfsbereitschaft aller Mitarbeiter und die gute Arbeitsatmosphäre habe ich sehr schätzen gelernt. Bei Frau Diana Ludolfs bedanke ich mich besonders für die Bereitstellung der aufgereinigten West-Nil B-Domäne.

Bei meinen Freunden, meinen Eltern und meinen Schwestern möchte ich mich ebenfalls bedanken. Ohne sie wären die frustrierenden Phasen im Labor kaum zu ertragen gewesen.

Besonders möchte ich mich bei Stephanie bedanken. Die vielen aufbauenden Worte und die ständige Versicherung, dass alles gut wird, haben sehr dabei geholfen, diese Arbeit zu Papier zu bringen.

Vielen, vielen Dank!!