

Aus dem
Robert Koch-Institut in Berlin
Leitung: Prof. Dr. Drs. Jörg Hacker

Habilitationsschrift

Thema

**Determinanten des Zelltropismus humaner und simianer
Immundefizienzviren und Charakterisierung wesentlicher Eigenschaften
physiologischer Liganden der HIV-Rezeptoren**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Virologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. phil. nat. Norbert Bannert

Eingereicht: Januar 2009
Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. Frank Kirchhoff
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Schubert

1. Einleitung	3
1.1. Historischer Hintergrund der HIV-Pandemie	3
1.2. Epidemiologie, Klinik und Therapie	5
1.3. Pathogenese der HIV-Infektion	7
1.4. Taxonomische Stellung, Gene und Proteine	9
1.5. Morphologie der Viruspartikel.....	13
1.6. Replikationszyklus von HIV	14
1.7. Mechanismus des Infektionsprozesses von Lentiviren	16
2. Zielsetzung.....	19
3. Eigene Arbeiten	20
3.1. Determinanten des Zelltropismus von HIV und SIV.....	20
<i>Einführung und Stand der Forschung</i>	<i>20</i>
<i>Publikation: The Level of CD4 Expression Limits Infection of Primary Rhesus Monkey Macrophages by a T-Tropic Simian Immunodeficiency Virus and Macrophagetropic Human Immunodeficiency Viruses</i>	<i>22</i>
3.2. Infektion unreifer Mastzellen und ihr Beitrag zum therapieresistenten HIV-1-Reservoir	33
<i>Einführung und Stand der Forschung</i>	<i>33</i>
<i>Publikation: Human Mast Cell Progenitors Can Be Infected by Macrophagetropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Retains Virus with Maturation in Vitro.....</i>	<i>35</i>
3.3. Überexpression, Isolierung, Reinigung und Charakterisierung des CCR5-Rezeptors	43
<i>Einführung und Stand der Forschung</i>	<i>43</i>
<i>Publikation: Enhanced Expression, Native Purification, and Characterization of CCR5, a Principal HIV-1 Coreceptor.....</i>	<i>44</i>
3.4. Bedeutung posttranslationaler Modifikationen des CCR5-Rezeptors für die Interaktion mit Chemokinen und die HIV-Korezeptorfunktion.....	51
<i>Einführung und Stand der Forschung</i>	<i>51</i>
<i>Publikation: Sialylated O-Glycans and Sulfated Tyrosines in the NH₂-Terminal Domain of CC Chemokine Receptor 5 Contribute to High Affinity Binding of Chemokines</i>	<i>53</i>
3.5. Interleukin-16: Ein CD4-Bindungspartner, Immunmodulator und HIV-Inhibitor.....	67
<i>Einführung und Stand der Forschung</i>	<i>67</i>
<i>Publikation: GA-binding Protein Factors, in Concert with the Coactivator CREB Binding Protein/p300, Control the Induction of the Interleukin 16 Promoter in T Lymphocytes.....</i>	<i>69</i>

3.6. Interaktionspartner des Interleukin-16-Vorläuferproteins	76
<i>Einführung und Stand der Forschung</i>	<i>76</i>
<i>Publikation: PDZ Domain-mediated Interaction of Interleukin-16 Precursor Protein with Myosin Phospatase Targeting Subunits.....</i>	<i>77</i>
4. Diskussion.....	88
5. Literaturverzeichnis	97
6. Zusammenfassung	110
7. Danksagung.....	113
8. Erklärung.....	114

1. EINLEITUNG

1.1. Historischer Hintergrund der HIV-Pandemie

Das Spektrum der in einer Bevölkerung auftretenden Infektionskrankheiten ist einem kontinuierlichen Wandel unterworfen. Veränderungen im sozialen Verhalten, dem Hygiene- und Immunstatus sowie in ökologischen, migratorischen und populationsdynamischen Faktoren zählen zu den Hauptursachen für das Auftreten und die Etablierung neuer Krankheitserreger in einer Population. Häufig handelt es sich bei den Erkrankungen um Zoonosen, denn die „emerging pathogens“ stammen von Tieren (Vorou et al., 2007). Der Mensch ist dabei meist ein Fehlwirt mit erheblicher Symptomatik und hohen Letalitätsraten. Die Transmission innerhalb der Population des neuen Wirtes fehlt zunächst meist oder ist stark eingeschränkt. Gelingt jedoch einem Erreger eine effiziente Übertragung von Mensch zu Mensch, kann dies dramatische Epidemien und Pandemien mit beträchtlichen Mortalitätsraten zur Folge haben. Ein prominentes Beispiel für ein solches Geschehen ist die Spanische Grippe von 1918 mit 40 Millionen Toten, hervorgerufen durch den Erreger einer aviären Influenza (Taubenberger, 2006).

Anfang der achtziger Jahre des vorigen Jahrhunderts wurde man in den USA auf zunehmende Fälle einer bis dahin unbekanntes Immunschwächekrankheit aufmerksam (Gottlieb et al., 1983). Junge homosexuelle Männer in einigen Großstädten litten an persistierender Lymphadenopathie sowie äußerst seltenen Gefäßtumoren und opportunistischen Pilz- und Protozoen-Infektionen, die nicht zu beherrschen waren und unweigerlich zum Tode führten (Masur et al., 1981). Bereits Ende 1982 wurde das Krankheitsbild unter dem Begriff AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrom) zusammengefasst. Dabei steht AIDS für das Endstadium der HIV-Infektion. Es wird erreicht, sobald definierte Kriterien erfüllt sind, zu denen ein Abfall der CD4-Zellzahl auf unter 200/µl Plasma sowie die Manifestation opportunistischer Infektionen oder bestimmter Tumore zählen (Brodts, 2005).

Retrospektive fanden sich Berichte über vergleichbare Fälle, die mehr als zwanzig Jahre zurückreichten (Froland et al., 1988; Saxinger et al., 1985; Williams et al., 1983). Die meisten dieser Patienten kamen aus Zentralafrika oder standen, zumindest temporär, mit der dort lebenden Bevölkerung in Kontakt. Aus diesem Grunde wurde die Herkunft des Erregers schon sehr früh in diesem geographischen Gebieten vermutet (Noireau, 1987).

Der Charakter der Seuche war sehr schnell in den Grundzügen geklärt. Ein neuartiges Retrovirus wurde als Krankheitsursache identifiziert. Der Nachweis gelang Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier am Pariser Pasteur Institut, die den Erreger aus dem Lymphknoten eines AIDS-Patienten isolieren, in Kultur nehmen und im Elektronenmikroskop darstellten konnten (Barre-Sinoussi et al., 1983). Der Erreger wurde später der Gattung der Lentiviren zugeordnet (Sonigo et al., 1985) und erhielt die allgemein akzeptierte Bezeichnung Humanes Immundefizienz Virus-1, HIV-1 (Coffin et al., 1986).

Kurz nach der ersten Beschreibung von HIV-1 wurde in Portugal ein zweites AIDS verursachendes Virus von einem Patienten aus Westafrika isoliert (Clavel et al., 1986). Das Genom des als HIV-2 bezeichneten Erregers ist lediglich zu 45 % dem des HIV-1 homolog, weist aber bis zu 99 % Homologie zu simianen Retroviren auf (Chakrabarti et al., 1987).

Das Ursprungsgebiet und die Verwandtschaft von HIV mit simianen Immundefizienzviren ließen vermuten, dass die Erreger von einigen der in afrikanischen Primaten endemischen Viren abstammen. SIV wurde bisher in mindestens 35 afrikanischen Primatenspezies nachgewiesen (Aghokeng et al., 2006). In keinem ihrer natürlichen Wirte verursachen diese Retroviren Immundefizienzen. Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen führten schließlich zu der Erkenntnis, dass mit den Gruppe N- und M-Isolaten, zwei der drei HIV-1-Gruppen auf SIVcpz, ein Retrovirus des Schimpansen (*Pan troglodydes troglodydes*), zurückgehen (Gao et al., 1999), während die Herkunftsquelle der Gruppe O-Stämme wahrscheinlich der Gorilla (*Gorilla gorilla*) ist (Van Heuverswyn et al., 2006) (Abb.1). Entsprechend der Sequenzhomologien werden die Isolate der einzelnen Gruppen in sogenannte Clades zusammengefasst.

Aufgrund der hohen genetischen Identität von HIV-2 und SIVsm der Rauchgrauen Mangaben (*Cercocebus atys*) werden diese Tiere als die Quelle der Transspeziesübertragung angesehen (Abb.1). Nach gegenwärtigen Varianzanalysen könnte dies um das Jahr 1940 stattgefunden haben (Lemey et al., 2003).

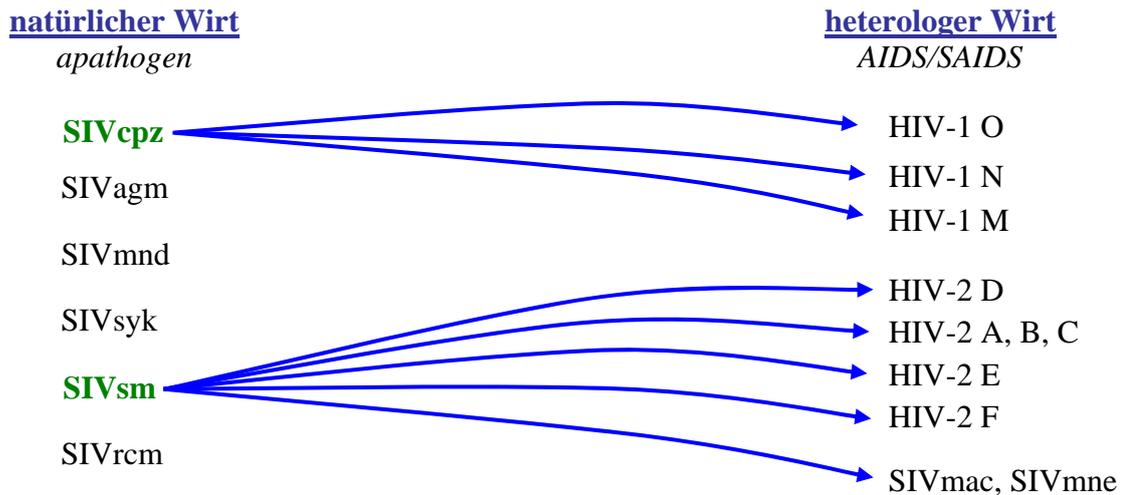


Abb. 1: Entstehung von HIV durch Cross-Spezies-Transmission von SIVcpz und SIVsm.

cpz, Schimpanse (*Pan troglodytes troglodytes*); agm, Afrikanische Grüne Meerkatze (*Cercopithecus aetiops*); mnd, Mandrill (*Mandrillus sphinx*); syk, Sykes Affen (*Cercopithecus mitis*); sm, Rauchgraue Mangabe (*Cercocebus atys*); rcm, Rotkappen-Mangaben (*Cercopithecus torquatus torquatus*); mac, Rhesusaffe (*Macaca mulatta*); mne, Schweinsaffe (*Macaca nemestrina*).

Wie bei HIV-2, so ist auch bei HIV-1 der exakte Zeitpunkt der Cross-Spezies-Übertragung bis heute nicht sicher zu belegen. Das älteste bekannte HIV-1-positive Serum stammt von 1959 aus dem Zaire (Nahmias et al., 1986). Einer aktuellen Hypothese zufolge ist HIV bereits seit vielen hundert Jahren in Zentralafrika endemisch. Der zu Beginn des 20. Jahrhunderts dort stattgefunden soziale Wandel ließ die Zahl Infizierter einen kritischen Wert erreichen, der zur Etablierung hochvirulenter Stämme führte. Bedingt durch die gestiegene Reisetätigkeit führte dies zu einer weltweiten Pandemie (Chitnis et al., 2000; Hahn et al., 2000; Lemey et al., 2003).

1.2. Epidemiologie, Klinik und Therapie

Nach Angaben der WHO sind derzeit über 33 Millionen Menschen mit HIV infiziert (www.unaids.org). Alle 10 Sekunden stirbt gegenwärtig ein Mensch an AIDS, alle 7 Sekunden findet eine Neuinfektion statt. Die meisten Infizierten und die höchsten Infektionsraten sind in der Sub-Sahara-Region Afrikas und in den Staaten der ehemaligen Sowjetunion sowie in Südost-Asien zu konstatieren (Abb.2). In Deutschland leben derzeit etwa 63.500 Menschen mit HIV oder AIDS (www.rki.de).

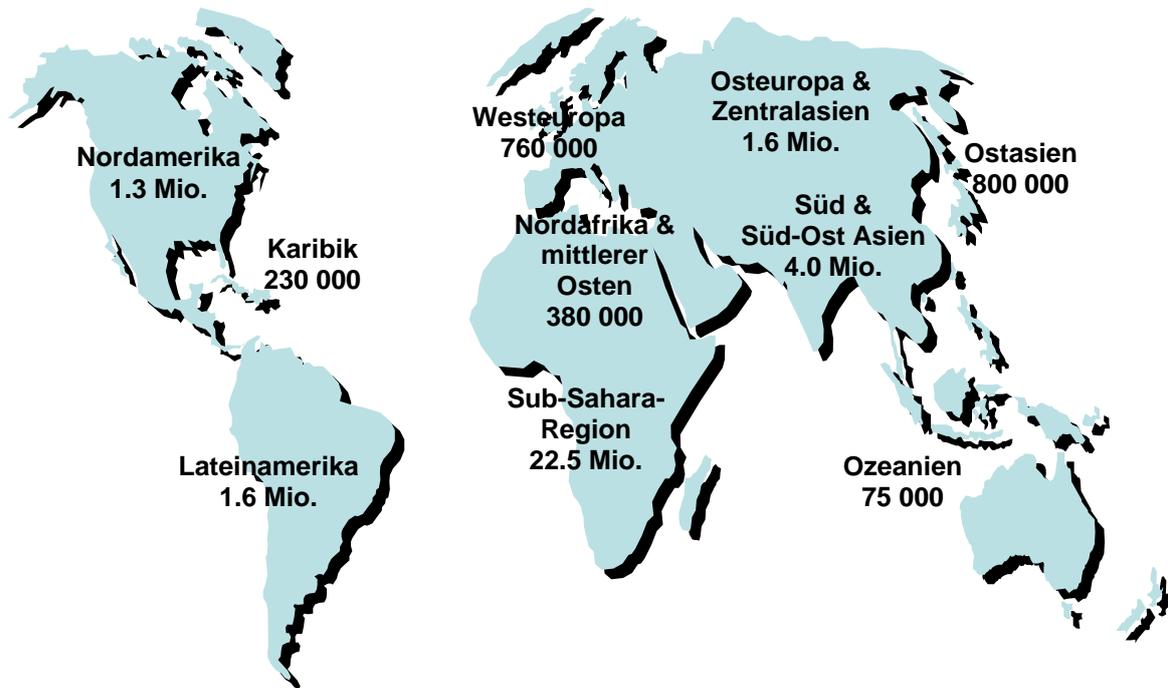


Abb. 2: Regionale Verteilung der HIV-Pandemie [Quelle: AIDS Epidemic 2007 (UNAIDS/WHO)].

Die Zahlen wären viel dramatischer, hätten nicht präventive Maßnahmen und die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) die Pandemie eingeschränkt. Der Erfolg von massiven Informationskampagnen in den Hochrisikogruppen, zu denen homosexuelle Männer, Prostituierte und Drogenabhängige zählen, sowie die Aufklärung der Allgemeinbevölkerung über die Hauptübertragungswege (Geschlechtsverkehr, intravenöser Drogenmissbrauch) und über Maßnahmen zum Schutz haben die Infektionsraten in den entwickelten Ländern lange zur Stagnation und zum Absinken gebracht. Dazu beigetragen haben auch die Gewährleistung sicherer Blutprodukte und Transplantate sowie Schritte zur Vermeidung einer Mutter-Kind-Transmission. Durch die Einführung und permanente Verbesserung der hochaktiven antiretroviralen Therapie kann heute die Viruslast im Blut oft bis unter die Nachweisgrenze gedrückt werden, womit eine Verminderung der Transmissionsraten einhergeht (Porco et al., 2004). Im Gegenzug verringerten offenbar die Erfolge das empfundene Gefährdungspotential und die Bereitschaft zur Prävention. Nach aktuellen Erhebungen des Robert Koch-Instituts ist ein erneuter Anstieg der Neuinfektionen in Deutschland zu erkennen (www.rki.de). Aufgrund der hohen Kosten und einer fehlenden Verfügbarkeit bleibt die antiretrovirale Therapie vielen Betroffenen in den Ländern mit den höchsten Infektionsraten vorenthalten. Dies betrifft etwa 80 % der gesamten Indikationsfälle (UNAIDS 2006 Report [www.unaids.org/enHIVdata]). Kulturelle, religiöse und oftmals auch politische

Vorbehalte erschweren zudem die Präventions- und Behandlungsmaßnahmen in diesen Ländern.

Aktuellen Empfehlungen der International AIDS Society und der CDC zur Folge sollte die Therapie spätestens beginnen, wenn die Viruslast über 30.000 RNA-Kopien/ μ l Plasma erreicht und die CD4-Zellzahl 350/ μ l Plasma unterschreitet (Yeni et al., 2004). Für das Therapieregime werden Kombinationen aus meist drei Inhibitoren zweier viraler Enzyme, der Reversen Transkriptase und der Protease, gewählt (Hogg et al., 2001). Darüber hinaus stehen neue Therapieansätze mit Inhibitoren des Infektionsprozesses (z. B. Enfuvirtide, T20) bereit (Kilby and Eron, 2003), die insbesondere dann zu einer notwendigen Option werden, wenn Resistenzen oder Unverträglichkeiten gegenüber den meisten Standardtherapeutika aufgetreten sind (Lazzarin et al., 2003). Obwohl erhebliche Nebenwirkungen und Resistenzbildung den Nutzen der hochaktiven antiretroviralen Therapie nachhaltig einschränken und keine vollständige Eliminierung des Virus erreicht werden kann (Vigano et al., 2006), müssen die meisten der Infizierten nicht mehr mit einer schnellen Progression zu AIDS und einem frühen Tod wenige Jahre nach der Infektion rechnen. Neben der Entwicklung eines breit wirksamen Impfstoffes zählen die Generierung, Evaluierung und Implementierung neuer Therapiekonzepte zu den vordringlichsten Zielen im Kampf gegen die Seuche. Die Zerstörung latent infizierter langlebiger und therapieresistenter Zellen sowie die Rekonstitution des geschädigten Immunsystems sind dabei wichtige Kriterien.

Im Gegensatz zur Entwicklung antiretroviraler Therapeutika blieben die bisherigen Strategien zur Herstellung eines sicheren und breitwirksamen HIV-Impfstoffes erfolglos. Weder die humorale noch die zelluläre Immunabwehr kann mit den derzeitigen Ansätzen genügend stimuliert werden, um eine Neuinfektion oder zumindest einen abgeschwächten Krankheitsverlauf zu gewährleisten.

1.3. Pathogenese der HIV-Infektion

Die ersten klinischen Symptome einer HIV-Infektion treten meist 1-4 Wochen nach der Übertragung auf. In der Regel handelt es sich um grippeähnliche Beschwerden, die mit Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, leichtem Fieber, Lymphknotenschwellung und Erythemen einhergehen (Daar et al., 2001). Mit modernen RT-PCR-Methoden kann virale RNA bereits 3-10 Tage nach der Infektion nachgewiesen werden (Fiebig et al., 2005). Bei sexueller Übertragung gehören Langerhanszellen, Makrophagen, dendritische Zellen und

CD4⁺-Lymphozyten der Mukosa zu den primären Zielzellen des Virus (Mehandru et al., 2004). Mit diesen Zellen gelangt das Virus zu lokalen Lymphknoten, in denen insbesondere aktivierte Effektorzellen, vor allem CD4⁺-Lymphozyten des Typs HLA-DR⁺, CD38^{hi} und CD45RO⁺, infiziert werden und zu den Hauptproduzenten neuer Viren werden. Die hohe Virusreplikation zu Beginn der Infektion (> 10⁷ Partikel/ml Plasma) wird wesentlich durch die zelluläre Immunantwort sowie Interferone, das Komplementsystem und andere Faktoren der „angeborenen Immunität“ reduziert (Reynolds et al., 2005; Schmitz et al., 1999). Der Höhepunkt der Viruslast in der akuten Phase und insbesondere der Wert der Viruslast im Serum nach vier Monaten können als prognostischer Marker für die Geschwindigkeit dienen, mit der die Erkrankung voranschreitet (Abb. 3).

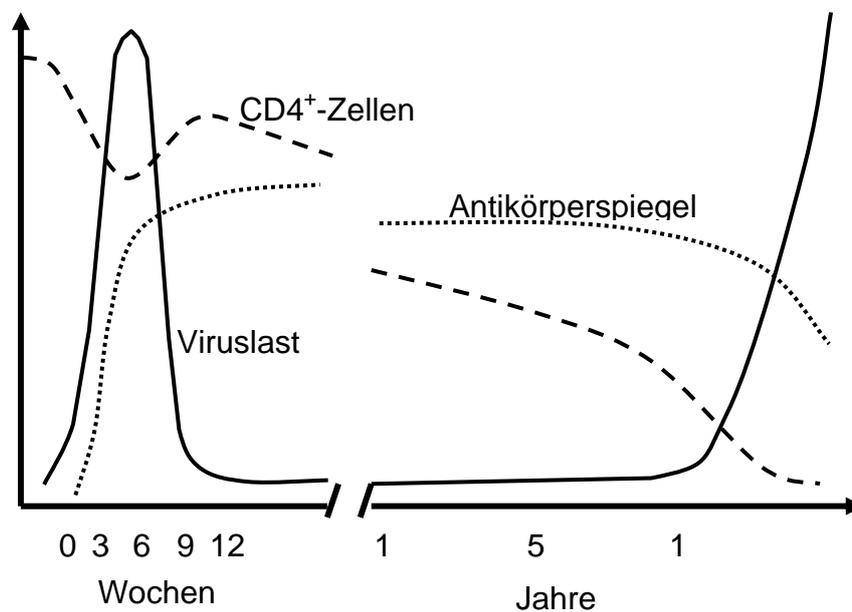


Abb. 3: Schematische Darstellung des Verlaufs der Viruslast, CD4⁺-Zellzahl und des Antikörperspiegels im Serum eines HIV-1-Infizierten.

Das akute retrovirale Syndrom (ARS) dauert meist bis zur Serokonversion und geht dann in eine asymptomatische Phase über. Diese Phase kann einige Monate dauern, meist tritt jedoch eine relativ symptomlose Latenzzeit mit nur leicht abnehmenden CD4-Zellzahlen von mehreren Jahren auf (Demarest et al., 2001). In dieser Periode findet man nach wie vor Virus in Immunkomplexen an folliculären dendritischen Zellen (FDC) in den Lymphknoten. Die Hyperaktivierung des Immunsystems bleibt aufgrund einer reduzierten, aber persistierenden Virusreplikation dennoch bestehen. Sie spiegelt sich im Zytokinmuster und im Verhältnis der Zellen des Immunsystems wieder. Aufgrund direkter Faktoren des Virus und indirekter zytotoxischer Mechanismen (z. B. Apoptose) sowie des

hyperaktiven Immunsystems gehen permanent infizierte Zellen und bystander-Zellen verloren und müssen erneuert werden. Die Halbwertszeit eines infizierten Lymphozyten beträgt weniger als zwei Tage (Ho et al., 1995; Ribeiro et al., 2002).

Neben Zellen des hämatopoetischen Systems, werden auch andere Gewebe infiziert. Man findet Viren in Mikrogliazellen und Astrozyten des Gehirns, in Zellen der Haut, des Gastrointestinaltraktes, des Thymus und vieler weiterer Organe (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005).

Im Laufe der Infektion stellt sich ein Zustand ein, den man als „Ermüdung“ des Immunsystems beschreibt. Ein molekulares Kennzeichen ist die erhöhte Expression des Membranproteins PD-1, die mit einer reduzierten antiviralen Aktivität der Lymphozyten einhergeht (Day et al., 2006; Trautmann et al., 2006). Zudem geht die Architektur der Lymphknoten, insbesondere der Keimzentren, verloren und die Zahl der follikulären dendritischen Zellen nimmt ab.

Die der Zerstörung der Lymphknoten und die „Ermüdung“ des Immunsystems führt schließlich zu einem Punkt, ab dem ein stärkerer, oft rapider Abfall der CD4-Zellzahlen eintritt (Abb. 3). Damit beginnt die symptomatische Periode, die schließlich zur AIDS-Erkrankung führt. Die Zeitspanne zwischen Infektion und dem Auftreten von AIDS hängt von einer Vielzahl genetischer Prädispositionen des Infizierten ab, insbesondere von seinem HLA-Typ. So besitzen besonders viele Personen, die seit über 10 Jahren symptomlos leben, sogenannte Long Term Non-Progressors, den Typ HLA-B*5701 (Migueles et al., 2000). Neben dem genetischen Hintergrund bedingen aber auch die Eigenschaften des Virus, wie Subtyp und Tropismus, den Verlauf der Infektionskrankheit.

Der forcierte Abfall der CD4⁺-Lymphozyten, der neben den auftretenden opportunistischen Infektionen ein Kriterium für AIDS darstellt, ist durch eine stark ansteigende Virusreplikation bedingt. Häufig findet man in diesem Stadium aggressivere Viruspopulationen, die anstatt CCR5 den Chemokinrezeptor CXCR4 als Korezeptor benutzen und damit einen breiteren Zelltropismus aufweisen.

1.4. Taxonomische Stellung, Gene und Proteine

Das HI-Virus gehört zur Familie der Retroviren, Gattung Lentiviren (Fauquet CM., 2005). Retroviren besitzen die Eigenschaft, sich in die chromosomale DNA der infizierten Zelle in Form eines Provirus zu integrieren. Zuvor wird ihr RNA-Genom mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben.

An beiden Enden des Provirus befinden sich etwa 1 kb große direkte Sequenzwiederholungen, die als LTR (Long Terminal Repeat) bezeichnet werden (Abb. 4). Während die 5'-LTR den viralen Promotor enthält, sind in der 3'-LTR Terminationssequenzen der RNA-Polymerase zu finden. Zwischen 5'-LTR und der kodierenden Region befinden sich Dimerisierungs- und Verpackungssignale, deren komplexe dreidimensionale Faltung eine Insertion des diploiden RNA-Genoms in das sich formende Viruspartikel gewährleisten.

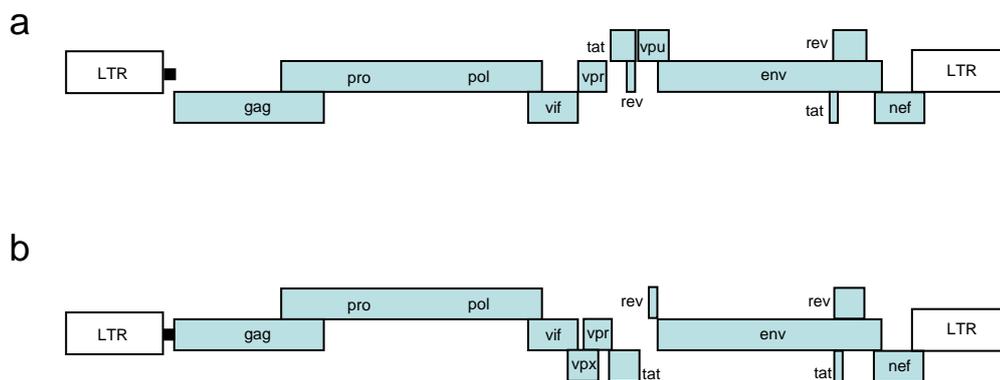


Abb. 4: Genomstruktur von HIV-1 (a) und HIV-2 (b). Dargestellt sind die kodierenden Regionen in den drei Leserahmen sowie die flankierenden LTRs des Provirus.

Wie jedes Retrovirus, so besitzt auch HIV die Gene für die Strukturproteine und viralen Enzyme in der Reihenfolge *gag-pro-pol-env* (Bannert and Kurth, 2004, 2006). *Gag* (*group specific antigen*) kodiert ein Polyprotein von 55 kDa, das mit Hilfe der viralen Protease (*pro*) während der Maturationsphase zu den Proteinen Matrix (MA), Capsid CA), p1, Nucleocapsid (NC), p2 und p6 prozessiert wird. Das Matrixprotein sorgt mit Hilfe seines Myristolrestes und hydrophober Bereiche für die Verankerung des Polyproteins in der Zellmembran (Bryant and Ratner, 1990). Es verleiht dem Viruspartikel Stabilität und ist nach der Infektion am Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern beteiligt (Gallay et al., 1995). Im Gegensatz zu vielen anderen Retroviren sind Lentiviren in der Lage Zellen zu infizieren, die nicht proliferieren (Lewis et al., 1992). Das prozessierte Capsidprotein bildet das konische Core des Virus. Hierbei autoaggregieren freigesetzte Capsidproteine zu Hexons und zwölf an bestimmte Positionen gebundenen Pentons (Ganser-Pornillos et al., 2004). Die kurzen Spacerpeptide p1 und p2 sind an der Regulation der Prozessierung beteiligt. Im p6-Protein befinden sich Interaktionsbereiche für Komponenten der zellulären Freisetzungsmaschinerie und die Bindungsstelle für das virale

Vpr-Protein (Paxton et al., 1993). Das Nukleoprotein besitzt Zink-Finger-ähnliche Motive, mit denen es die Verpackungssignale der viralen RNA bindet (Darlix et al., 1990).

Um die Expression der für die Protease und Polymerase kodierenden Sequenzen zu erreichen, ist ein Leserahmenwechsel am Ribosom um ein Nukleotid in 5'-Richtung erforderlich. Der Leserahmenwechsel erfolgt an einer homopolymeren Sequenz und wird durch einen nachfolgenden Pseudoknoten reguliert, der die Translation kurzzeitig verzögert. Bei etwa 5 % aller Translationen kommt es zu der erwähnten Rasterverschiebung und der Synthese des Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteins (Hatfield and Oroszlan, 1990). Dadurch wird gewährleistet, dass wesentlich mehr Gag- als Gag-Pro-Pol-Protein synthetisiert wird. Die autokatalytische Aktivität der viralen Protease sorgt für die Freisetzung der Gag-Untereinheiten sowie der Protease und Polymerase aus dem Vorläuferprotein. Die Polymerase wird weiter in die asymmetrischen Untereinheiten (p66 und p51) der Reversen Transkriptase (RT) und die C-terminal kodierte Integrase (IN) prozessiert. Die Reverse Transkriptase sorgt für die Retrotranskription der genomischen RNA in DNA. Mit Hilfe der RNase H-Aktivität der größeren Untereinheit wird die RNA im RNA:DNA-Doppelstrang abgebaut (Hansen et al., 1987). Da der RT eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität fehlt, verfügt sie über keinen „proofreading“-Mechanismus. So kommt es im Mittel zu etwa einer Mutation pro Genomsynthese (Svarovskaia et al., 2003). Das Enzym trägt damit wesentlich zu der hohen Sequenzvarianz und Plastizität der Viren bei. Die Integration des Provirus in die chromosomale DNA der Wirtszelle vermittelt die virale Integrase (Bushman et al., 1990).

Im zentralen Bereich des HIV-1-Genoms befinden sich die Gene für die akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Vpu, die von einem einfach-gespleißten Transkript translatiert werden.

Vif (*virion infectivity factor*) kodiert ein 23 kDa großes Protein, das den Einbau zellulärer Cytosin-Deaminasen der APOBEG-3-Familie in virale Partikel verhindert (Harris et al., 2003). Fehlt Vif, deaminiert das Enzym Cytosin zu Uracil im Minusstrang während der reversen Transkription. Die Folge sind Guanosin-zu-Adenosin-Austausche im Plusstrang, die mit einer verminderten Aktivität der Viren einhergehen (Mangeat et al., 2003).

Das 14 kDa große basischen Protein Vpr (*Viral protein R*) ist ebenso wie das Matrixprotein am Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern beteiligt (Heinzinger et al., 1994). In der chronisch infizierten Zelle blockiert es außerdem deren Proliferation (Rogel et al., 1995).

Vpu (16 kDa) ist ein membranständiges Phosphoprotein, das von einem bicistronischen Transkript translatiert wird. Vpu induziert die Degradation des CD4 Rezeptorproteins im Endoplasmatischen Retikulum und erleichtert die Virusfreisetzung (Wildum et al., 2006).

Im Gegensatz zu HIV-1 besitzen HIV-2 und einige SIV-Isolate kein Vpu-Gen, sondern ein Vpx-Gen (Abb. 4). Vpx ist wahrscheinlich aus einer Duplikation des Vpr hervorgegangen (Tristem et al., 1992). Ebenso wie Vpr spielt es eine Rolle beim Kerntransport des Präintegrationskomplexes (Singhal et al., 2006).

Neben den schon erwähnten Genen befinden sich die ersten Exons der Gene Tat und Rev ebenfalls in der zentralen Region des Genoms. Das zweite Exon dieser regulatorischen Proteine überlappt mit der Sequenz des Hüllproteins (Env), dessen Startkodon ebenfalls in der zentralen Region zu finden ist. Das Transaktivatorprotein Tat stabilisiert die Transkriptionsmaschinerie, indem es an ein als „TAR“ (Tat response element) bezeichnetes Motiv am begonnenen Transkript bindet und eine vorzeitige Termination verhindert (Feng and Holland, 1988). Tat erhöht die Transkriptionsrate um mehr als den Faktor 1000 (Roy et al., 1990). Ebenso wie Tat ist Rev überwiegend im Zellkern zu finden und bindet an die virale mRNA. Im Gegensatz zu Tat befindet sich das *cis*-aktive Element (RRE, Rev Responsive Element) im 3'-Bereich des Transkripts (Malim et al., 1989). Die Interaktion erleichtert den Transport ungespleißter und partiell gespleißter Transkripte aus dem Zellkern (Zapp and Green, 1989). Die Regulation des Spleißens sorgt für ein optimales Verhältnis viraler Proteine und des Vollängentranskripts für die Enkapsidierung in Partikel.

Als einziges Strukturprotein wird das membranständige Hüllprotein (Env) von einer gespleißten mRNA translatiert. Das hochglykosylierte 160 kDa große Vorläuferprotein wird bei seiner Passage durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat von einer Furin-Protease in die beiden Untereinheiten SU (gp120) und TM (gp41) gespalten (McKeating and Willey, 1989). Die Untereinheiten bleiben jedoch assoziiert und lagern sich zu Trimeren zusammen. Das gp 120 besitzt konservierte und 5 hypervariable Regionen (V1-V5) von denen die V3-Region eine der Hauptdeterminanten des Korezeptortropismus ist und Epitope für neutralisierende Antikörper enthält (Feng et al., 1996; Hwang et al., 1991). Das Transmembranprotein beinhaltet das hydrophobe Fusionspeptid und zwei Regionen, die beim Fusionsprozess interagierende Helices bilden (Camerini and Seed, 1990).

Am 3'-Ende des Genoms befindet sich das Gen für das Nef (negativ factor)-Protein. Es überlappt partiell mit der 3'-LTR. Das 27 kDa große myristylierte Protein besitzt eine Vielzahl an funktionellen Eigenschaften, die *in vivo* zum Tragen kommen. Es reguliert die CD4-, MHC I- und MHC II-Expression herunter (Garcia and Miller, 1992; Luria et al., 1991) und blockiert die Apoptose, um eine längere Phase der Virusproduktion zu ermöglichen (Greenway et al., 2002). Nef-Deletionen korrelieren mit verminderter Viruslast und deutlich verzögerter AIDS-Symptomatik. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Nef-Protein von HIV-1 Lymphozyten aktiviert und somit zur Hyperaktivierung des gesamten Immunsystems führt. Dies wird als eine der vermuteten Ursachen von AIDS diskutiert (Schindler et al., 2006). Im Gegensatz zu HIV-1 im Menschen führen die Nef-Proteine der afrikanischen Primaten in ihren natürlichen Wirten nicht zu dieser Aktivierung und die Tiere entwickeln keinerlei AIDS-Symptomatik.

1.5. Morphologie der Viruspartikel

Reife Retroviruspartikel haben ein Durchmesser von ca. 110-130 nm (Frank et al., 1978). Im Elektronenmikroskop ist ein konisches Core zu erkennen (Abb. 5), das den Ribonukleokomplex aus zwei identischen, ca. 9,7 kb langen RNA-Molekülen positiver Orientierung mit anhaftendem NC-Protein darstellt. Die Stränge sind über eine Dimerisierungsregion miteinander verbunden und liegen in Form eukaryotischer mRNA mit 7-Methylguanin-Cap am 5'-Ende und polyadenyliertem 3'-Ende vor. Virale Enzyme (Protease, RT, IN) und einige der akzessorischen Proteine (Nef, Vpr) sind ebenfalls im oder am Core gebunden. Neben dem Capsid-Core sind elektronendichte Ablagerungen zu erkennen (Gelderblom, 1991). Diese Lateral-Bodies stellen Gag-Protein dar, das für die Assemblierung des Cores nicht benötigt wurde. Der Kernbereich ist von einer Matrix umgeben. Das Matrixprotein verbleibt auch nach der Abspaltung der Gag-Untereinheiten während der Reifung mit der Virusmembran assoziiert. Die Virusmembran stammt von der produzierenden Zelle und wurde während der Freisetzung mitgenommen. Neben dem viralen Hüllprotein enthält sie zelluläre Proteine.

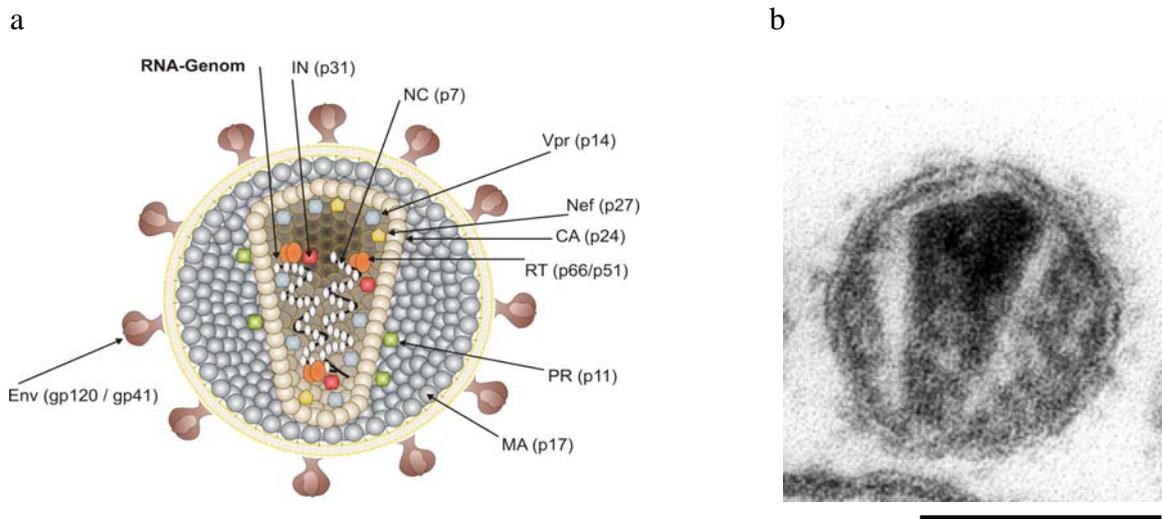


Abb. 5: HIV-Morphologie. Schematische Darstellung (a) und elektronenmikroskopische Aufnahme (b, Marker: 100 nm). IN, Integrase; NC, Nukleokapsid; CA, Capsid; RT, Reverse Transkriptase; PR, Protease; MA, Matrix,

1.6. Replikationszyklus von HIV

Nach der Anhaftung und dem rezeptorvermittelten Eintritt des viralen Cores in die Zelle (Abb. 6) findet eine Destabilisierung der Corestruktur über einen noch unbekanntem Triggermechanismus statt, die einen Umbau zum Reverse-Transkriptase-Komplex (RTC) induziert. Die Verfügbarkeit von dNTPs scheint ein wichtiger Faktor für die Aufnahme der reversen Transkription zu sein. Im Zuge der Reaktion dient der RNA-Einzelstrang zunächst als Matrize für die Synthese einer Minusstrang-DNA. Der Polymerasekomplex kann dabei auf den zweiten RNA-Strang des diploiden Genoms wechseln und somit chimäre Viren erzeugen, die zur Variabilität der Quasispezies beitragen. Die RNase H-Aktivität der Reversen Transkriptase verdaut anschließend den RNA-Anteil des Heteroduplex und die Polymeraseaktivität des Enzyms sorgt für die Herstellung des DNA-Doppelstrangs.

Interaktion mit zellulären Proteinen und interne Umlagerungen im Zuge der DNA-Synthese führen schließlich zur Bildung des Präintegrationskomplexes (PIC), der mit Hilfe von Mikrotubuli und Motorproteinen des Zytoskeletts in die Nähe des MTOC (Microtubuli Organizing Centers) gebracht wird (Afonso et al., 2007). Von dort erfolgt der Transport über noch weitestgehend unbekanntem Mechanismen in den Zellkern. Kernlokalisierungssignale im Matrix- und Vpr-Protein sowie in der Integrase sind daran beteiligt. Die Endonukleaseaktivität der Integrase öffnet die chromosomale DNA und ihre

Ligaseaktivität verknüpft sie mit dem proviralen Doppelstrang. Zelluläre Enzyme sorgen für die Reparatur der Einzelstränge an den Verknüpfungsstellen zwischen proviraler und chromosomaler DNA.

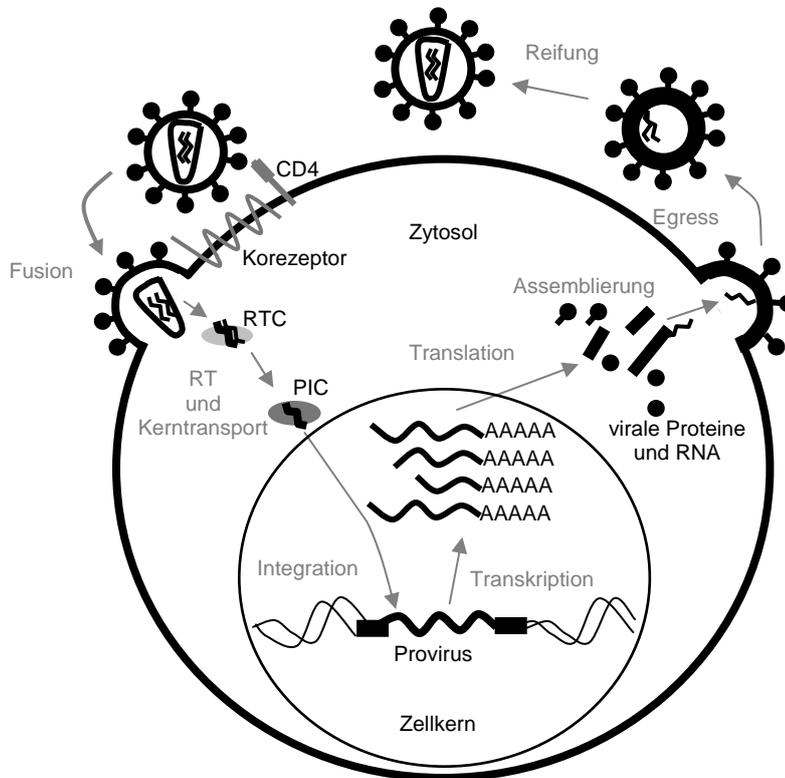


Abb. 6: Replikationszyklus von HIV. Nach der rezeptorvermittelten Fusion der Zellmembran mit der Membran des Virus (Abb. 7) erfolgt der Eintritt des viralen Cores in die Zelle. Daraufhin disassembliert das Core und ein Reverse-Transkriptase-Komplex (RTC) entsteht. Darin erfolgt die reverse Transkription, die zur Entstehung des Präintegrationskomplexes (PIC) beiträgt. Dieser Komplex wird in den Zellkern transportiert und die virale DNA in das Genom der Zelle integriert. Virale Transkripte werden an den Ribosomen der Zelle zu viralen Proteinen translatiert und in ungespleißter Form als Genom verpackt. Die Assemblierung erfolgt an der Zellmembran. Nach der Freisetzung reifen die Virionen zu infektiösen Partikeln mit einem konischen Core.

Nach der Integration nutzt das Virus die Transkriptionsmaschinerie der zellulären RNA-Polymerase II und die Spleißosomen, um mit Hilfe der eigenen regulatorischen Proteine Tat und Rev ein ausbalanciertes Verhältnis der viralen mRNAs für die Translation und für den Einbau in neue Partikel zu produzieren. Wie alle Lentiviren werden HIV- und SIV-Partikel an der Plasmamembran assembliert (Abb. 6). Der Einbau mehrerer funktioneller Einheiten wird dabei über die Synthese großer Gag-Polypeptide gelöst, die später durch eine Protease freigesetzt werden. Über Interaktionen mit den Gag-Polypeptiden wird das

diploide RNA-Genom sowie zelluläre und akzessorische virale Proteine enkapsidiert (Darlix et al., 1990). Die Gag-Polypeptide akkumulieren in Regionen der Zellmembran mit hoher Konzentration an viralem Hüllprotein.

Um den Transport zur Zellmembran und die Knospung zu gewährleisten, bei der auch zelluläre membranständige Proteine auf die Virionen gelangen, bedient sich das Virus der Mechanismen des zellulären Vesikeltransports. Als Late-Domänen bezeichnete Motive im p6-Protein interagieren direkt und indirekt mit Proteinen der ESCRT-Maschinerie (von Schwedler et al., 2003). Während der letzten Stadien der Knospung oder kurze Zeit nach der Freisetzung erfolgt die Reifung mit proteolytischer Spaltung der Gag-Vorläuferproteine und der Ausbildung des typischen konischen Cores (Briggs et al., 2003).

1.7. Mechanismus des Infektionsprozesses von Lentiviren

Das erste Stadium im Infektionsprozess von HIV und SIV ist die Adhäsion des Virus an die Oberfläche von Zellen. Die primäre Interaktion ist avide, aber unspezifisch, und wird durch stark glykosilierte zelluläre Membranproteine vermittelt. Zu den am besten untersuchten dieser Proteinklasse gehören das Mannose-bindende Protein auf Makrophagen und DC-SIGN auf dendritischen Zellen (Geijtenbeek et al., 2000). Diese Interaktionen vermitteln keinen Eintritt des Viruspartikels in die Zelle. Sie erlauben aber den Transport zu Membranregionen mit höherer Rezeptordichte oder, im Falle der dendritischen Zellen, die Infektion einer T-Zelle nach Transport und nach Kontaktaufnahme im Lymphknoten. An der Interaktion dieser Lektine ist auf der viralen Seite primär das Hüllprotein beteiligt. Den Effekt verstärken zelluläre Transmembranproteine, die beim Zusammenbau des Virus mit der Membran in das Viruspartikel eingebaut wurden.

Der Tropismus von HIV für CD4-positive Zellen und die Beteiligung des CD4-Moleküls am Infektionsprozess von HIV und SIV wurden schon zu Beginn der HIV-Pandemie, kurz nach der ersten Beschreibung von HIV bewiesen (Dalglish et al., 1984). Das Typ I-Transmembranmolekül besteht aus vier Domänen (D1-D4), von denen Lentiviren mit der N-terminalen D1-Region interagieren, die partiell mit der Bindestelle des MHC II-Komplexes überlappt (Moebius et al., 1992). Diese Region bindet spezifisch an das Oberflächenprotein gp120 aller Lentiviren der Primaten im Bereich des konstanten C4-Abschnitts des Moleküls (Lasky et al., 1987). Die Bindung eines CD4-Moleküls in diese Bindungstasche des gp120 induziert eine erste Umlagerung innerhalb des Moleküls

(Abb.7). Dabei wird insbesondere die Position der variablen V1/V2-Schleifen und der V3-Schleife verändert. Für eine direkte Fusion der Zellmembran mit der Membran des Virus und den Eintritt des viralen Cores in das Zytoplasma der Zelle ist die Interaktion mit dem CD4-Molekül allein nicht hinreichend. Ebenso erfolgt keine Endozytose mit anschließender pH-abhängiger Fusion der endosomalen und viralen Membran, wie es zum Beispiel für viele murine Retroviren und andere umhüllte Viren charakteristisch ist. Die Bindung des gp120 an CD4 induziert dagegen eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die jedoch für den Infektionsmechanismus des Viruspartikels keine Konsequenzen hat, denn CD4-Moleküle mit deletiertem intrazellulärem C-Terminus vermitteln den Eintritt ebenso erfolgreich wie der Wildtyp (Bannert et al., 2000). Die Erfahrung, dass viele CD4 positive Zellen nicht mit HIV zu infizieren sind, führte schon kurz nach der Identifizierung des CD4-Rezeptors zu der Vermutung, dass es noch mindestens einen weiteren unbekanntem HIV-Rezeptor geben muss (Chesebro et al., 1991; Evans et al., 1987). Schließlich resultierte die Beobachtung, dass die drei Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β die Infektion mit bestimmten HIV-1-Stämmen inhibieren können, zu der Erkenntnis, dass ihr gemeinsamer Rezeptor - das CCR5-Protein - einer der gesuchten HIV-Korezeptoren ist (Cocchi et al., 1995; Feng et al., 1996). Als weiterer HIV-Korezeptor wurde parallel der Chemokinrezeptor CXCR4 publiziert (Feng et al., 1996). Auch hier findet eine Inhibition der HIV-Infektion durch den spezifischen Liganden SDF-1 mittels Kompetition und bindungsinduzierter Endozytose statt (Bleul et al., 1996). Nachfolgend konnte eine ganze Reihe alternativer Chemokinrezeptoren identifiziert werden, die ebenfalls die Fähigkeit besitzen, den Eintritt von HIV und SIV in die Zelle zu vermitteln. Im Vergleich mit CCR5 und CXCR4 spielen diese „alternativen“ Korezeptoren nur eine untergeordnete Rolle und besitzen lediglich in speziellen Zellen und Geweben ein pathophysiologische Relevanz (Gabuzda and Wang, 1999; Gorry et al., 2001).

Alle HIV- und SIV-Korezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren mit sieben Transmembranbereichen. Die durch die CD4-Bindung induzierte Umlagerung im gp120 mit der oben erwähnten Verlagerung der variablen Schleifen ermöglicht ihnen die Interaktion mit einer als „bridging sheet“ bezeichneten Region (Kwong et al., 1998). Diese Bindung destabilisiert die nichtkovalente gp120-gp41-Assoziation des Hüllproteins und ermöglicht eine weitere grundlegende Umlagerung, die zur Insertion des hydrophoben Fusionspeptids am gp41 in die Membran der Zielzelle führt (Abb. 7). Dies hat die energetisch günstige Bildung einer Sechs-Helix-Struktur aus den N- und C-Helices der drei gp41-Untereinheiten zur Folge. Dadurch werden die Virus- und

Zellmembran aneinander gezogen, so dass eine Fusionspore entsteht, durch die das Viruscore in die Zelle gelangt (Mkrtychyan et al., 2005).

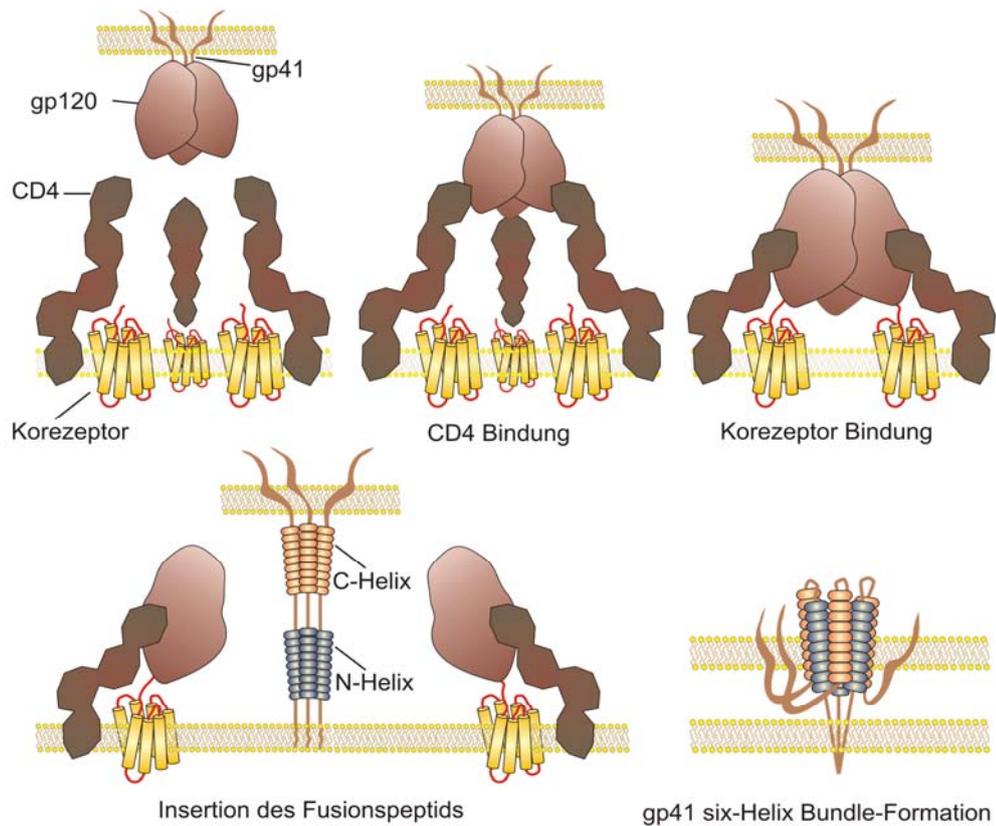


Abb. 7: Schematische Darstellung des Infektionsmechanismus von HIV und SIV. Nach der Interaktion des Hüllproteins mit dem CD4-Molekül auf der Oberfläche der Zielzelle erfolgt eine Strukturänderung im Hüllprotein. Dabei wird die Bindestelle für den Korezeptor zugänglich. Nach Bindung des Korezeptors erfolgt eine Trennung des gp120 und vom gp 41 des Hüllproteins und das hydrophobe Fusionspeptid inseriert in die Zellmembran. Durch die energetisch günstige Bildung eines Six-Helix-Bundles aus den N- und C-Helices des gp41 werden die Membranen ineinander gezogen und die Fusionspore, durch die das Core in die Zelle eintritt, entsteht.

2. ZIELSETZUNG

Zu den aussichtsreichsten Interventionsoptionen bei der Bekämpfung der Immunschwächekrankheit AIDS gehört die Blockade des Eintritts der HIV-Partikel in eine Zielzelle. Um auf dieser Ebene wirksame antivirale Substanzen und Therapiekonzepte zu entwickeln, sind die exakte Kenntnis des Zelltropismus sowie eine funktionelle Charakterisierung der beteiligten Rezeptoren und ihrer Rolle beim Infektionsvorgang erforderlich. Von besonderem Interesse sind hierbei körpereigene antivirale Proteine und physiologische Liganden der viralen Rezeptoren. Neben dem humanen System ist auch ein tiefes Verständnis dieser Faktoren im SIVmac-Modell erforderlich - dem wichtigsten Tiermodell der HIV-Infektion.

Im Rahmen der nachfolgend dargestellten Arbeiten sollten die molekularen Determinanten des Zelltropismus der Immundefizienzviren, insbesondere von SIVmac, bestimmt werden. Im Fokus sollten dabei die viralen Rezeptoren CD4 und CCR5 sowie die Rolle der natürlichen Liganden dieser Proteine stehen. Die Aufklärung der molekularen Grundlage des Tropismuswechsels, der im Verlauf einer Infektion von Rhesusaffen mit SIVmac zur ZNS-Symptomatik und Pneumonien führt, trägt wesentlich zum Verständnis der Pathophysiologie der Infektion bei. Mit einem analogen Ziel soll die HIV-1-Suszeptibilität von Mastzellen geklärt werden. Während ihrer Reifungsphase exprimieren diese langlebigen Zellen CD4, CCR5 sowie weitere HIV-Korezeptoren, so dass sie als latent infiziertes, therapieresistentes Virusreservoir in Frage kommen. Zum tieferen Verständnis des CCR5-Proteins sollen fundamentale Arbeiten zur nativen Isolierung und extrazellulären Rekonstitution dieses bedeutsamsten HIV-Korezeptors erfolgen. Auf der Grundlage der erarbeiteten Methoden sind nachfolgend Untersuchungen zur Rolle posttranslationaler Modifikationen bei dem HIV-Infektionsprozess und der Chemokinbindung vorgesehen. Hierbei soll insbesondere ein Beitrag der O-Glykosylierung und Sulfatierung des CCR5-Korezeptors zur hochaffinen Bindung der viralen Hüllproteine und anderer Liganden evaluiert werden. Auf Seiten des primären Rezeptors CD4 sind Studien zur Expression des physiologischen CD4-Liganden und HIV-Inhibitors Interleukin-16 geplant. Der Schwerpunkt wird hierbei auf die Promotorcharakterisierung des großen Vorläuferproteins Pro-IL-16 gelegt, aus dem das reife Zytokin nach Prozessierung durch eine Caspase entsteht. Diese Studien sollen mit Arbeiten zur Identifizierung von zellulären Wechselwirkungspartnern komplettiert werden, die auf noch unbekanntes physiologische Funktionen des Pro-IL-16 hinweisen.

3. EIGENE ARBEITEN

3.1. Determinanten des Zelltropismus von HIV und SIV

Einführung und Stand der Forschung

Die Entdeckung der Korezeptoren hat in erheblichem Maße zur Klärung der molekularen Grundlagen des Zelltropismus von HIV und SIV beigetragen (Bleul et al., 1996; Feng et al., 1996). Die überwiegende Zahl der HIV-Stämme ist nur in der Lage einige wenige Korezeptoren zu verwenden. Prinzipiell können drei Tropismus-Gruppen unterschieden werden:

1. Makrophagen-trope (M-trope) HIV-1-Stämme, die Makrophagen infizieren, aber nicht in der Lage sind in CD4-positiven T-Zelllinien zu proliferieren. Diese Isolate bilden keine Syncytien in PBMCs. Sie verwenden vorzugsweise CCR5 als Korezeptor, und nicht CXCR4.
2. T-Zelltrope (T-trope) HIV-1-Stämme, die nur sehr schwer humane Makrophagen infizieren, aber in T-Zelllinien effizient wachsen und Syncytien induzieren. Diese Isolate verwenden CXCR4 als Korezeptor.
3. Dualtrope HIV-1-Isolate. Diese Viren können sowohl CCR5 als auch CXCR4 verwenden. Sie sind besonders einfach mit neutralisierenden Antikörpern zu inaktivieren.

Simiane Immundefizienzviren verwenden kein CXCR4 als Korezeptor. Dennoch sind auch hier variable Zelltropismen zu beobachten (Zhang et al., 2000). Bei SIV-Stämmen der Rhesusaffen, die als Tiermodell für die AIDS-Pathogenese und Impfstoffentwicklung eine enorme Bedeutung haben, können zwei Tropismus-Gruppen differenziert werden.

1. Makrophagen-trope SIV-Stämme, die in Makrophagen von Rhesusaffen und primären T-Zellen replizieren.
2. T-Zelltrope SIV-Stämme, die nicht in Makrophagen von Rhesusaffen, jedoch in primären T-Zellen replizieren.

Im Gegensatz zu HIV-1 sind auch T-trope SIVmac-Stämme in der Lage CCR5 als Korezeptor zu benutzen (Zhang et al., 2000).

Im Rahmen der nachfolgend beschriebenen Studie (Bannert et al., 2000) sollten die Rezeptoren identifiziert werden, die von M-tropen SIVmac-Stämmen zur Infektion von Makrophagen herangezogen werden. Darüber hinaus sollten die ursächlichen Gründe für

den unterschiedlichen Zelltropismus von SIV-Isolaten bestimmt und die Basis der Restriktion T-troper HIV-Isolate für Makrophagen der Rhesusaffen untersucht werden.

Als Modellisolate für die Studie wurde das M-trope SIV-Isolat SIVmac316 und das T-trope Isolat SIVmac239 verwendet. SIVmac316 wurde von Desrosiers und Mitarbeitern aus alveolären Makrophagen eines Rhesusaffen gewonnen, der mit dem T-tropen SIVmac239-Isolat infiziert wurde (Desrosiers et al., 1991). Der unterschiedliche Tropismus ist durch die Sequenz der Hüllproteine determiniert, wobei fünf Aminosäuredifferenzen und eine Deletion im C-Terminus des gp41 den größten Beitrag leisten (Mori et al., 1993; Mori et al., 1992).

Die Quantifizierung der Infektion wurde mit Hilfe pseudotypisierter SHIV-Reporterviren durchgeführt, die ein Hüllprotein der Wahl auf der Oberfläche tragen und ein Reportergen kodieren, das zur Expression des Reporters (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase oder Green Fluorescent Protein) in der infizierten Zelle führt. Mit diesen sogenannten „single round“-Viren kann der Eintritt der Virionen in Abhängigkeit von dem Hüllprotein gemessen werden.

Publikation:

Bannert, N., Schenten, D., Craig, S., and Sodroski, J. (2000). The level of CD4 expression limits infection of primary rhesus monkey macrophages by a T-tropic simian immunodeficiency virus and macrophagetropic human immunodeficiency viruses. *Journal of Virology* 74, 10984-10993.

3.2. Infektion unreifer Mastzellen und ihr Beitrag zum therapieresistenten HIV-1-Reservoir

Einführung und Stand der Forschung

Die von Paul Ehrlich entdeckten Mastzellen sind wichtige Effektorzellen des angeborenen Zweiges des Immunsystems, insbesondere im Kampf gegen Parasiten und Gram-negative Bakterien (Heib et al., 2008; Malaviya et al., 1996). Neben ihrer Rolle bei Entzündungsreaktionen und der IgE-vermittelten allergischen Reaktion, die zur Degranulation und Ausschüttung von Histamin und anderen Botenstoffen führt, besitzen sie auch immunoregulatorische Eigenschaften im erworbenen Zweig des Immunsystems (Galli et al., 2008). Reife Mastzellen kommen über den ganzen Körper verteilt im interstitiellen Bindegewebe vor, am häufigsten jedoch in der Submucosa von Darm und Atemwegen sowie in der Nähe von Gefäßen und Nerven. Bei ihrer Patrouille durch die Gewebe überwinden sie auch die Blut-Hirn-Schranke und wandern in das zentrale Nervensystem ein (Silver et al., 1996).

Reife Mastzellen entstehen aus Vorläuferzellen, die im Knochenmark unter dem Einfluss des Stammzell-Faktors (SCF) determiniert werden und ins Blut ausschwemmen. Diese zirkulierenden Vorläuferzellen (PrMC) exprimieren den SCF-Rezeptor *c-kit* (CD117) sowie die membranassoziierte Aminopeptidase CD13, sind CD14-negativ und Chloracetatesterase-positiv (Agis et al., 1993). PrMC wandern in die Gewebe ein, wo sie zu reifen, extrem langlebigen Mastzellen mit charakteristischer Granula heranreifen.

Die geringe Zahl an PrMC im Blut erschwert das Studium dieser Zellen. Mit Hilfe eines Zytokincocktails, der vor allem aus löslichem SCF (sSCF), Interleukin-6 und Interleukin-10 besteht, ist es jedoch möglich, aus Nabelschnurblut PrMC zu gewinnen (Ochi et al., 1999). Neben CD4 exprimieren PrMC mit CCR5 und CCR3 zwei HIV-Korezeptoren für M-trope HIV-1-Stämme sowie CXCR4, das von T-tropen HIV-1-Isolaten für den Zelleintritt verwendet wird. Während der Reifung verlieren PrMC ihre CD4- und CCR5-Expression und sollten deshalb keine Zielzellen mehr für HIV-1 darstellen. Um die PrMC von kontaminierenden Monozyten und Makrophagen zu befreien, wurde eine Depletion CD14-positiver Zellen nach vier Wochen in Kultur durchgeführt.

Das vorrangige Ziel der nachfolgend beschriebenen Studie (Bannert et al., 2001b) ist es gewesen, die Infizierbarkeit von PrMC mit HIV-1-Stämmen unterschiedlicher Tropismen und das Replikationspotential von HIV-1 in diesen Zellen zu überprüfen. Gegebenenfalls

sollte zudem die Expression viraler Gene in *in vitro* ausgereiften Mastzellen nachgewiesen werden. Die Expression der HIV-Rezeptoren (Ochi et al., 1999) ließ vermuten, dass PrMC sowohl von M-tropen als auch von T-tropen HIV-1-Stämmen infiziert werden können und das Virus in diesen Zellen produktiv repliziert.

Publikation:

Bannert, N., Farzan, M., Friend, D.S., Ochi, H., Price, K.S., Sodroski, J., and Boyce, J.A. (2001b). Human Mast cell progenitors can be infected by macrophagetropic human immunodeficiency virus type 1 and retain virus with maturation in vitro. *Journal of Virology* 75, 10808-10814.

3.3. Überexpression, Isolierung, Reinigung und Charakterisierung des CCR5-Rezeptors

Einführung und Stand der Forschung

Der Chemokinrezeptor und dominante HIV-Korezeptor CCR5 gehört zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembranbereichen. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei neuronalen, immunologischen und vielen weiteren physiologischen Prozessen. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass etwa 30 % aller heute verfügbaren Pharmazeutika die Funktion dieser Proteinfamilie modulieren (Stadel et al., 1997). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden meist ohne Signalpeptid synthetisiert und integrieren über einen noch weitestgehend unbekanntem Mechanismus in Membranen. In der Regel weisen sie eine flache Topologie mit einem extrazellulären N-Terminus und einem cytoplasmatischen C-Terminus auf, der mit einem trimeren G-Protein-Komplex in Wechselwirkung tritt. Die sieben hydrophoben Membrandurchgänge sind ringförmig angeordnet. Wegen ihrer sieben hydrophoben membran-durchspannenden Bereiche ist es extrem schwierig, diese Proteine im nativen, gefalteten Zustand zu isolieren oder denaturierte Proteine im nativen Zustand in einer Membran zu rekonstituieren. Ein weiteres Problem stellt die relativ geringe Expression der meisten G-Proteinrezeptoren in eukaryontischen Zellen dar. Aufgrund essentieller posttranslationaler Modifikationen sind bakterielle und andere nicht eukaryontische Expressionssysteme für die Produktion der meisten G-Proteinrezeptoren keine Alternative (Tate and Grishammer, 1996). CCR5 bindet zunächst mit seinem N-Terminus an das HIV-1-Hüllprotein, wobei posttranslationale Modifikationen wie die Sulfatierung von Tyrosinen die Interaktion verstärken (Farzan et al., 1999). Für nachfolgende Schritte des Infektionsmechanismus werden Wechselwirkungen mit weiteren Regionen des Proteins, insbesondere mit einigen extrazellulären Schleifen, postuliert.

Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten (Mirzabekov et al., 1999) zur Steigerung der CCR5-Expression, der Reinigung des Proteins unter nativen Bedingungen und dem Nachweis der Bindung des solubilisierten CCR5 an das HIV-gp120 stellen erste Schritte zum Aufbau von Screening-Systemen mit rekonstituierten nativen G-Proteinrezeptoren dar. Sie sind ebenfalls relevant für die meisten anderen Mitglieder dieser umfangreichen Rezeptorfamilie.

Publikation:

Mirzabekov, T., Bannert, N., Farzan, M., Hofmann, W., Kolchinsky, P., Wu, L., Wyatt, R., and Sodroski, J. (1999). Enhanced expression, native purification, and characterization of CCR5, a principal HIV-1 coreceptor. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 28745-28750.

3.4. Bedeutung posttranslationaler Modifikationen des CCR5-Rezeptors für die Interaktion mit Chemokinen und die HIV-Korezeptorfunktion

Einführung und Stand der Forschung

CCR5, der primäre HIV-Korezeptor für M-trope Isolate, ist der physiologische Rezeptor für eine Reihe von β -Chemokinen, zu denen RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β zählen. Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor ist auf vielen Leukozyten, insbesondere auf Gedächtnis-T-Zellen und aktivierten T-Zellen, zu finden sowie auf B-Zellen, Makrophagen, Mikrogliazellen, Mastzellvorläufern und dendritischen Zellen. Nach hochaffiner Bindung des Liganden werden Signaltransduktionskaskaden induziert, von denen eine über ein trimeres G-Protein vermittelt wird und zu einem transienten Kalzium-Influx führt. Die induzierten Signale leiten in der Summe eine chemotaktische Antwort ein und erhöhen den Aktivierungszustand der Zelle (Kuehn and Gilfillan, 2007).

Etwa 1% der Kaukasier ist homozygot für eine 32-Basenpaardeletion im CCR5-Gen, die zu einem kompletten Verlust der Expression eines funktionellen CCR5-Proteins führt. Trotz dieses Defekts wurden bisher keine Defizite in der Immunantwort bei diesen Personen beobachtet. Die hohe Redundanz des Chemokinsystems scheint den Ausfall eines Rezeptors effektiv kompensieren zu können (Dean et al., 1996). Diese Tatsache und die hohe Resistenz dieser Personen gegenüber einer HIV-Infektion mit M-tropen Isolaten verstärken die Bemühungen, wirksame Inhibitoren des CCR5-Rezeptors als HIV-Therapeutika zu entwickeln. Eine exakte Kenntnis der Bindungsdeterminanten des Rezeptors und seiner Liganden sowie deren strukturelle Basis sind für die Suche nach neuen und die Verbesserung bekannter Interventionsmöglichkeiten von entscheidender Bedeutung. Gegenwärtig wird bei der Interaktion eines β -Chemokins mit seinem Rezeptor ein zweistufiger Prozess angenommen. Zunächst scheint eine relativ unspezifische Wechselwirkung mit aufragenden N-terminalen Regionen des Rezeptors stattzufinden, bei der negativ geladene und aromatische Aminosäuren eine Rolle spielen. Die so „eingefangenen“ Chemokine kommen dann in Kontakt mit den flachen extrazellulären Schleifen des Rezeptors und induzieren in Folge einer spezifischen Interaktion eine Signaltransduktion und Internalisierung. Es gibt Hinweise auf eine vergleichbare Abfolge der Ereignisse bei der Bindung an das gp120 und der Vermittlung des Eintritts von HIV in die Zelle (Blanpain et al., 1999; Farzan et al., 1999; Samson et al., 1997). Hierbei sind

Sulfatreste am N-Terminus von CCR5 beteiligt, die mit ihren negativen Ladungen zur Elektrostatik der Wechselwirkung beitragen (Farzan et al., 1999).

Eine ähnliche Rolle könnten weitere posttranslationale Modifikationen spielen. Von außerordentlichem Interesse in diesem Zusammenhang sind die über O-glykosidische Bindungen mit Serinen und Threoninen verknüpften Zuckerreste, da sie negativ geladene endständige Sialinsäuren enthalten (Farzan et al., 1999). Der Chemokinrezeptor CCR5 wird im Golgi-Apparat der Zelle durch O-Glykane posttranskriptionell modifiziert (Farzan et al., 1999). Die glykosylierten Serine und/oder Threonine waren jedoch nicht bekannt. Die Kriterien für eine O-Glykosylierung sind bisher wenig definiert. Es gibt jedoch die Beobachtung, dass insbesondere extrazelluläre Regionen von Rezeptoren mit Clustern von Serinen und Threoninen häufig modifiziert sind.

Die bekannten Funktionen der O-Glykane an Proteinrezeptoren sind sehr vielfältig. Sie tragen zum Erhalt der Konformation bei, schützen vor Proteasen, vermitteln Wechselwirkungen bei der Adhäsion von Zellen und Mikroben und der Bindung von Liganden. Sie sind an der Blutgerinnung, der Embryogenese und weiteren physiologischen Prozessen unmittelbar beteiligt (Brockhausen, 1999; Varki, 1993). Von besonderem Interesse ist ihre Funktion bei der Kinese und Adhäsion aktivierter Blutzellen und dem metastatischen Potential von Krebszellen (Fukuda et al., 1986).

In der folgenden Arbeit (Bannert et al., 2001a) wurden die Position der O-Glykane am CCR5-Protein lokalisiert sowie ihr Beitrag zur Bindung von Chemokinen und der Korezeptorfunktion für HIV-1 untersucht. Die Studie wurde anschließend um Experimente zur Aufklärung der Rolle einzelner Sulfate am CCR5 bei der Chemokinbindung erweitert.

Publikation:

Bannert, N., Craig, S., Farzan, M., Sogah, D., Santo, N.V., Choe, H., and Sodroski, J. (2001a). Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH₂-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines. *J Exp Med* *194*, 1661-1673.

3.5. Interleukin-16: Ein CD4-Bindungspartner, Immunmodulator und HIV-Inhibitor

Einführung und Stand der Forschung

Der primäre HIV-Rezeptor, das CD4-Molekül, ist ein Glykoprotein von 55 kDa, das an den MHC II-Komplex von antigenpräsentierenden Zellen bindet und die Interaktion des T-Zellrezeptorkomplexes sowie die immunologische Synapse stabilisiert (Doh and Irvine, 2006). Neben dem MHC II-Komplex ist das Zytokin Interleukin-16 (IL-16) ein weiterer physiologischer CD4-Bindungspartner (Cruikshank et al., 1994).

IL-16 wird, wie IL-1, IL-18 und einige weitere Zytokine, in Form von Vorläuferproteinen synthetisiert (Bannert et al., 1996). Die meisten Leukozyten, insbesondere aber CD8⁺ T-Zellen, produzieren ein 67 kDa großes Vorläuferprotein, das Pro-IL-16 (Baier et al., 1997). Einige Neurone im Kleinhirn und Hippocampus exprimieren eine N-terminal verlängerte Variante (Npro-IL-16) von 141 kDa (Kurschner and Yuzaki, 1999). Aus beiden Vorläuferproteinen wird durch die Aktivität der Caspase 3 ein C-terminales Fragment von 121 Aminosäuren abgespalten, das als reifes Zytokin von aktivierten Zellen freigesetzt wird (Baier et al., 1998). Strukturell ähnelt der größte Teil des IL-16 einer einzelnen PDZ (Postsynaptic density/Disc large/Zona occludens-1)-Domäne, jedoch ist die Bindungstasche dieses Proteinwechselwirkungsmotivs im IL-16 sehr schmal und durch eine Tyrosinseitenkette blockiert (Muhlhahn et al., 1998). An der Wechselwirkung mit dem CD4-Molekül ist das PDZ-ähnliche Motiv nicht beteiligt (Mathy et al., 2000). Die Bindung an die D4-Domäne des CD4 wird durch eine Aminosäuresequenz am C-Terminus des Zytokins vermittelt (Liu et al., 1999). Aufgrund seiner Tetramärstruktur ist IL-16 in der Lage CD4-Moleküle zu vernetzen und eine Signaltransduktionskaskade zu induzieren (Cruikshank et al., 1994). In Folge der Interaktion kommt es neben einer starken chemotaktischen Reaktion zu einer partiellen Blockade immunologischer Funktionen (T-Zellenergie) und einer Aktivierung proinflammatorischer Funktionen (Center et al., 2000). In diesem Zusammenhang ist eine hohe Konzentration des Zytokins bei Asthma, rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose und anderen Entzündungsreaktionen gezeigt worden, die mit der Einwanderung von CD4⁺ T-Zellen und deren Sekretion proinflammatorischer Zytokine korreliert (Center et al., 2000).

Ähnlich wie die Wechselwirkung mit HIV-gp120 und die Bindung einiger Antikörper führt die IL-16-induzierte CD4-Signaltransduktion zu einer Hemmung des Promotors von HIV und SIV (Benkirane et al., 1995; Berube et al., 1996; Zhou et al., 1997). Maciaszek

und Mitarbeiter konnten zeigen, dass nach Bindung von IL-16 an CD4 ein inhibitorischer Transkriptionsfaktor induziert wird, der mit dem Kernbereich des LTR-Promotors in der Nähe der NF- κ B-Bindestelle in Wechselwirkung tritt und die Transkription um den Faktor 60 reduziert (Maciaszek et al., 1997). Neben den β -Chemokinen MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sowie dem noch nicht identifizierten CAF-Zytokin (Levy, 2003) gehört IL-16 somit zu den antiviralen Faktoren, die von CD8⁺-Zellen sezerniert werden (Bannert, 1998). Um Informationen über das IL-16-Gen und die Transkription zu generieren sollte zunächst die Exon/Intron-Struktur aufgeklärt werden und danach eine exakte Analyse des Promotors folgen (Bannert et al., 1999).

Publikation:

Bannert, N., Avots, A., Baier, M., Serfling, E., and Kurth, R. (1999). GA-binding protein factors, in concert with the coactivator CREB binding protein/p300, control the induction of the interleukin 16 promoter in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1541-1546.

3.6. Interaktionspartner des Interleukin-16-Vorläuferproteins

Einführung und Stand der Forschung

Die beiden PDZ-Domänen im Vorläuferprotein des IL-16, von denen insbesondere die zweite Domäne sehr hoch konserviert ist, sind typische Proteinbindungsmotive (Bannert et al., 1998; Doyle et al., 1996). Die Interaktionspartner dieser Motive sind jedoch noch völlig unbekannt. Die Identifizierung dieser Proteine kann wichtige Hinweise auf die zellulären und antiviralen Mechanismen liefern, an denen Pro-IL-16 beteiligt ist. Diese Faktoren könnten ebenfalls an der Prozessierung des Vorläufers, seines Transports oder der Sekretion des IL-16 beteiligt sein oder Anhaltspunkte für völlig neue physiologische Funktionen ergeben.

PDZ-Domänen sind 80-90 Aminosäuren lang und zeigen eine charakteristische Faltung, die eine Bindungstasche für die C-Termini der wechselwirkenden Proteine ausbildet (Doyle et al., 1996). Die über 250 Proteine mit PDZ-Domänen sind mehrheitlich Struktur- und Transportproteine, die am Zusammenbau von makromolekularen Proteinkomplexen, Signaltransduktionskaskaden und an Transportprozessen beteiligt sind. Sie sind häufig indirekt über Adapterproteine mit dem Zytoskelett und zellulären Motorproteinen assoziiert (Hung and Sheng, 2002). Typisch ist die Interaktion der beiden PDZ-Domänen im neuronalen IL-16-Vorläuferprotein (Npro-IL-16). Diese zwei Motive, welche sich in der N-terminalen Sequenz des Proteins befinden, die dem Pro-IL-16 (in Leukozyten) fehlt, binden an eine Reihe von Ionenkanälen (Kurschner and Yuzaki, 1999). Einige PDZ-Domänen treten in Wechselwirkung mit viralen Proteinen. Zu nennen ist in diesem Zusammenhang insbesondere das Tax-Protein von HTLV-1, das an den Tumorsuppressor hDLG bindet (Suzuki et al., 1999). Mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid (YTH)-Systems sollten die Interaktionspartner der PDZ-Domänen im Pro-IL-16 identifiziert werden und die Bindungseigenschaften sowie deren mögliche physiologische Konsequenzen, insbesondere in Bezug auf die antivirale Wirkung des Zytokins, untersucht werden.

Im Rahmen der nachfolgend referierten Arbeit wurden drei verwandte regulatorische Untereinheiten der Myosin-Phosphatase als Bindungspartner der zweiten PDZ-Domäne gefunden und die Interaktion biochemisch charakterisiert (Bannert et al., 2003).

Publikation:

Bannert, N., Vollhardt, K., Asomuddinov, B., Haag, M., Konig, H., Norley, S., and Kurth, R. (2003). PDZ Domain-mediated interaction of interleukin-16 precursor proteins with myosin phosphatase targeting subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 42190-42199.

4. DISKUSSION

Die Immunschwächekrankheit AIDS wird durch HIV, ein zur Gattung der Lentiviren gehörendes Retrovirus verursacht. Der Erreger stammt von afrikanischen Primaten ab und hat seit seiner Erstbeschreibung im Jahr 1983 zu einer weltweiten Pandemie geführt. Ein Impfstoff steht nicht zur Verfügung, die Virusreplikation kann jedoch mit einer hochaktiven antiretroviralen Therapie wirksam blockiert werden. Die Suche nach weiteren therapeutischen Ansätzen und Interventionsmöglichkeiten im viralen Replikationszyklus ist von hoher Präferenz. Dabei bietet insbesondere der Infektionsverlauf vielfältige Optionen. Die Neu- und Weiterentwicklung von Entry-Inhibitoren erfordert jedoch eine umfassende Analyse der beteiligten Proteine und Prozesse.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Infektion einer Zelle durch ein HIV- und SIV-Isolat ist die Expression des CD4-Moleküls und eines Korezeptors, den der jeweilige Stamm verwenden kann. Einige Zellen werden jedoch gar nicht oder nur sehr schlecht infiziert, obwohl die passenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Ein Beispiel sind humane Makrophagen, die kaum von T-tropen HIV-Stämmen infiziert werden, obwohl CD4 und CXCR4 exprimiert sind (Dimitrov et al., 1999). Die Ursachen dieser Restriktion sind noch weitestgehend unbekannt. Ebenfalls unverstanden war die Blockade T-troper SIV-Isolate für Rhesusaffen-Makrophagen, obwohl CD4 und CCR5 auf diesen Zellen nachweisbar ist und die Viren diese Rezeptoren auf anderen Zellen verwenden (Mori et al., 1992). M-trope SIVmac-Varianten können aus Rhesusaffen isoliert werden, die neuronale Symptome (Meningoenzephalitis) oder eine granulomatöse interstitielle Pneumonie mit Infektion von Mikrogliazellen bzw. Makrophagen zeigen. Diese Symptome treten meist erst sehr spät im Verlauf der SIVmac-Infektion auf, wenn die Affen bereits eine starke simiane AIDS (SAIDS)-Symptomatik aufweisen (Banapour et al., 1991; Flaherty et al., 1997). Aus diesem Grunde wurde vermutet, dass M-trope Viren erst dann effizient im Wirt replizieren können, wenn das Immunsystem der Primaten bereits stark in Mitleidenschaft gezogen wurde und die Bildung neutralisierenden Antikörper eingeschränkt ist (Sharma et al., 1992). In einigen Aspekten ähnelt diese Hypothese der Erklärung für das dominante Auftreten T-troper HIV-1-Varianten beim Eintritt in das AIDS-Stadium, denn auch hier sind diese Viren sensitiver gegenüber neutralisierenden Antikörpern und neue Zelltypen werden als Wirtszellen erschlossen.

Im Zuge der Studien konnte mit Hilfe eines CCR5-spezifischen Inhibitors gezeigt werden, dass ein M-tropes SIVmac-Isolat für den Eintritt in Makrophagen überwiegend CCR5 benutzt, obgleich alternative Korezeptoren exprimiert werden, die auf anderen Zellen einen effizienten Eintritt vermitteln können (Schenten et al., 1999). Dagegen konnte ein T-tropes Isolat, SIVmac239, das ebenfalls in der Lage ist CCR5 zu verwenden, diese Zellen ca. 50-fach schlechter infizieren und nicht produktiv replizieren.

Die entscheidenden Experimente, die zur Aufklärung der Basis des M/T-Tropismus von SIV geführt haben, waren Infektionsversuche mit Makrophagen, die CD4 überexprimieren. Die Überexpression wurde durch Transduktion mit VSV-pseudotypisierten SHIVs erreicht, die an Position des *nef*-Gens die CD4-Sequenz tragen. Diese Makrophagen konnten sowohl von M-tropen SIVmac316, von T-tropen SIVmac239 und von Virionen, die Hüllproteine M-troper HIV-1-Stämme tragen, mit vergleichbarer Effizienz infiziert werden. Somit ist die geringe CD4-Expression der Makrophagen von Rhesusaffen (Lewin et al., 1996) der Grund für das Ausbleiben der Infektion mit T-tropen SIVmac-Stämmen. Dieses Ergebnis wurde in einer nachfolgenden Arbeit uneingeschränkt bestätigt (Mori et al., 2000). In Makrophagen, die den primären Rezeptor überexprimieren, benutzt auch ein T-troper SIVmac-Stamm CCR5 als Korezeptor.

Die Befähigung mit geringen Rezeptorkonzentrationen auszukommen könnte in einer höheren CD4-Affinität des gp120 von SIVmac316 gegenüber SIVmac239 begründet sein. Tatsächlich konnte für monomeres gp120 des M-tropen Stammes eine etwas höhere Bindungsstärke an solubles CD4 gemessen werden als für den T-tropen Stamm (Schenten et al., 1999). Im Kontext des Trimers mit kooperativen Bindungsmodi könnte dieser Unterschied zu dem beobachteten Tropismus führen.

Mit dem Potential CCR5-positive Zellen mit geringer CD4-Expression zu infizieren hängt offenbar die Eigenschaft zusammen, beim Eintritt in Zellen mit hoher CCR5-Expression gänzlich auf CD4 verzichten zu können. Ein gewisser Grad an CD4-Unabhängigkeit wurde auch für andere M-trope SIV-Isolate publiziert. So wurde für SIVmac/17E-Fr die Infektion CD4-negativer Endothelzellen von Kapillaren im Gehirn berichtet (Edinger et al., 1997; Mankowski et al., 1994). Ein Grund für den Verzicht auf die Interaktion mit dem CD4-Rezeptor könnte eine etwas „offenere“ Struktur des Hüllproteins sein, die konservierte Epitope in der CCR5-Bindungsregion (bridging sheet) exponiert, so dass CCR5 auch ohne vorherige CD4-Interaktion andocken kann. Das bridging sheet ist allerdings Ziel neutralisierender Antikörper, weshalb es offenbar nach der Interaktion mit CD4 nur für

kurze Zeit für CCR5 zugänglich ist. Deshalb sind Viren mit einer offeneren Struktur auch sensitiver gegenüber einer Neutralisation durch Seren von infizierten Resusaffen. Aus diesem Grund sollten diese Varianten in immunkompetenten Tieren nicht dominieren können. In Übereinstimmung mit der Hypothese findet man M-trope Isolate überwiegend in bereits stark immundefizienten Tieren. Offenbar verhindert eine funktionierende humorale Immunabwehr die Replikation M-troper SIVmac-Virionen.

Die Replikation von HIV *in vivo* kann bereits mit einer antiretroviralen Therapie wirksam inhibiert werden. Ein Defizit der aktuellen Behandlung ist die mangelnde Fähigkeit eine vollständige Eradikation des Virus aus dem Körper eines HIV-Infizierten zu erreichen. Es ist derzeit akzeptiert, dass die Persistenz der Infektion durch Populationen latent infizierter langlebiger T-Zellen, insbesondere Gedächtniszellen, und von Zellen außerhalb der T-Zelllinien aufrecht erhalten wird (Finzi et al., 1999; Persaud et al., 2003). Die erfolgreiche Weiterentwicklung der Therapiestrategien wird in hohem Maße von einer genaueren Kenntnis dieser Zellen und einem besseren Verständnis solcher Reservoirs abhängen.

Infizierte Mastzellen, die sich über Monate und Jahre in Bindegeweben aufhalten, die durch antivirale Therapien nur schwer zu erreichen sind, könnten ein solches Reservoir darstellen. Durch ihre Fähigkeit die Blut-Hirnschranke zu überwinden könnten infizierte Mastzellen das Virus zudem in das Gehirn passagieren wo Mikrogliazellen, Astrozyten und einige Neuronen befallen werden, was zur neurologischen Symptomatik und AIDS-assoziierten Demenzzuständen führt. Durch ihr Vorhandensein an den primären Eintrittspforten von HIV ist auch eine Beteiligung bei der Etablierung einer Infektion möglich.

Ein wichtiger Hinweis auf eine Infektion von Mastzellen war die Beobachtung, dass unreife, *in vitro* aus pluripotenten Zellen des Nabelschnurblutes differenzierte Mastzellen transient die von HIV benötigten Rezeptoren exprimieren. Ausdifferenzierte reife Mastzellen exprimieren kein CD4 und CCR5 mehr und sind gegenüber HIV inert (Ochi et al., 1999).

Das Ergebnis der Infektionsversuche mit CD14-depletierten 4 Wochen alten PrMC-Kulturen bestätigte die Vermutung jedoch nur teilweise, denn lediglich M-trope Isolate waren in der Lage zu replizieren. Die exakte Ursache für den Replikationsblock T-troper Isolate ist nicht bekannt. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für Makrophagen, Mikrogliazellen und bestimmte Gruppen von Stammzellen gemacht (Albright et al., 2003; Moriuchi et al., 1998; Schenten et al., 1999). Die beschriebenen Experimente mit

pseudotypisierten Reporterviren weisen darauf hin, dass schon der Eintritt in die Zelle verhindert wird. Ein möglicher Grund könnten posttranslationale Modifikationen oder Topologien des CXCR4-Rezeptors sein, die ihn als HIV-1-Korezeptor auf diesen Zellen unbrauchbar machen. Neben M-tropen HIV-Isolaten kann auch SIVmac316 unreife humane Mastzellen mit CD4- und CCR5-Expression infizieren. Im Vergleich mit CD4⁺-Lymphozyten und Makrophagen sind die Infektionsraten aber wesentlich geringer. Der dominante Korezeptor für den Eintritt in PrMC ist CCR5. Der ebenfalls von PrMC exprimierte CCR3-Rezeptor spielt nur eine untergeordnete Rolle. Durch den Nachweis granulärer Enzyme wurden die infizierten Zellen auf Einzelzellniveau mit Hilfe spezifischer Farbreaktionen eindeutig als PrMC identifiziert.

Die Halbwertszeit der meisten infizierten Zellen *in vivo* beträgt nur wenige Tage (Ho et al., 1995). In einigen Zellen wird die Expression viraler Proteine jedoch vermindert oder völlig abgeschaltet. In diesen Latenzperioden sind die Zellen gegenüber der Immunabwehr nicht zu erkennen. Die Ergebnisse der angeführten Arbeiten zur Ausdifferenzierung HIV-infizierter PrMC belegen, dass *in vitro* die Infektion zumindest innerhalb von zwei Wochen nicht zytotoxisch wirkt und die infizierten Vorläuferzellen ihre Differenzierung zu reifen Mastzellen fortsetzen. Latent infizierte reife Mastzellen könnten somit über Monate und Jahre das Virus in sich tragen. Durch Stimulation mit Toll-like-Rezeptoren können latent infizierte Mastzellen zur Virusproduktion angeregt werden (Sundstrom et al., 2004).

Ebenfalls nicht auszuschließen ist ein kausaler Zusammenhang zwischen Urtikarien und Pruritiden bei HIV-Infizierten und der Infektion von Mastzellen (Duvic, 1995; Milazzo et al., 1999). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass HIV-infizierte PrMC bei AIDS-Patienten mit allergischen Symptomen beschrieben wurden (Li et al., 2001).

Kürzlich wurde zudem belegt, dass auch in HIV-Patienten ohne Allergien infizierte Mastzellen selbst unter Therapiebedingungen nachweisbar sind und zur Virusproduktion angeregt werden können (Sundstrom et al., 2007). Diese Studie bestärkt die Hypothese, dass CD4⁺/CCR5⁺-Mastzellenvorläufer mit M-tropen HIV-Stämmen infizierbar sind und zu Mastzellen heranreifen. Latent infizierte Mastzellen scheinen einen signifikanten Beitrag zur Pathophysiologie der Erkrankung und zum persistenten Virusreservoir während der HIV-Therapie zu leisten.

Die zahlreichen Beobachtungen, in denen trotz Expression der benötigten Rezeptoren einige Zellen den Eintritt von HIV- oder SIV-Stämmen nicht erlauben, legt die Vermutung nahe, dass zelltypspezifische posttranslationale Modifikationen den Restriktionen zu

Gründe liegen. Um diese zu untersuchen und eine biochemische und strukturelle Charakterisierung des Proteins sowie dessen Rekonstitution in synthetischen Membranen zu ermöglichen, wurden Experimente zur Isolierung des CCR5-Rezeptors im nativen Zustand aus eukaryontischen Zellen durchgeführt.

Eine effiziente Steigerung der endogenen oder ektopischen Expression eines Rezeptors in eukaryontischen Zellen ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Isolierung. Infolge einer Kodonoptimierung und Klonierung in ein optimales Plasmid konnte die Expression des CCR5-Rezeptors in stabilen Zelllinien gegenüber der Wildtypsequenz um den Faktor 5 erhöht werden. Durch eine FACS-Sortierung wurden zusätzlich die am höchsten exprimierenden Zellen isoliert und expandiert. Damit konnte die mittlere Expression der Zellen nochmals um den Faktor 5-10 erhöht werden (Daten nicht gezeigt).

Durch eine sehr umfangreiche Experimentenserie mit 18 verschiedenen Detergenzien in Kombination mit mehreren Puffersystemen konnte mit Cyclohexyl-Pentyl- β -D-Maltosid (Cymol-5) eine Detergenz gefunden werden, die CCR5 im nativen Konformationszustand aus der Zellmembran herauslöst. Der Grund für die Eignung dieses sehr milden Detergenz liegt wahrscheinlich darin, dass nichtkovalent assoziierte Lipide unvollständig von dem Protein entfernt werden. Diese Lipide tragen zur Stabilisierung der Tertiärstruktur und Topologie des G-Proteinrezeptors bei. Als Hinweise auf die korrekte Faltung des von Cymol-5 herausgelösten Proteins wurden die Bindung des konformationsabhängigen Antikörpers 2D7 (Wu et al., 1997) gezeigt und die Interaktion mit dem äußeren Hüllprotein (gp120) von HIV-1 nachgewiesen. Dabei unterstützen posttranslationale Modifikationen, insbesondere die Sulfatierung des CCR5, die Wechselwirkung mit dem Hüllprotein.

Ein weiterer wichtiger Vorzug der verwendeten Detergenz liegt in der hohen kritischen Mizellkonzentration, die bei einer späteren Rekonstitution des Proteins in definierte synthetische Membranen oder für Kristallisationsversuche von Vorteil ist. Dies wurde in einer Folgearbeit bereits deutlich, bei der funktionelles CCR5 in einer Membran auf paramagnetischen Beads über Dialysetechniken rekonstituiert werden konnte (Mirzabekov et al., 2000). Es ist zu erwarten, dass die hier generierte Methodik für die Entwicklung von Screening-Methoden für spezifische Inhibitoren des CCR5 und anderer G-Proteinrezeptoren genutzt werden kann.

Die Interaktion von CCR5 und anderen Chemokinrezeptoren mit ihren Chemokinliganden ist von einer hohen Redundanz und Promiskuität gekennzeichnet. Die Basis für diese

Flexibilität auf der einen Seite und die hohen Bindungsaffinitäten auf der anderen Seite bilden elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativen Ladungen in den N-Termini der Rezeptoren und Regionen positiver Ladungen auf Seiten der Chemokine. Im Rahmen der hier referierten Arbeiten konnte ein wichtiger Beitrag der O-Glykane, insbesondere der endständigen negativ geladenen Sialinsäuren, zur Bindung der Chemokine an CCR5 gezeigt werden. Für die HIV-Korezeptorfunktion des Rezeptors sind sie hingegen von untergeordneter Bedeutung. Dies steht im Gegensatz zu der Sulfatierung N-terminaler Tyrosine, die sowohl die Korezeptorfunktion als auch die Chemokinbindung unterstützt, wobei dem Sulfatrest an Tyrosin 14 eine besondere Rolle bei der Chemokinbindung zukommt. Mit einer Reihe von CCR5-Mutanten, einer O-Glykan-defizienten CHO-Zelllinie (Kingsley et al., 1986) sowie durch Markierung mit radioaktiver Galaktose und Analysen des Migrationsverhaltens der Proteine in Polyacrylamidgelen konnte die Position der O-Glykane im CCR5 und ihr funktioneller Beitrag zur Ligandenbindung bestimmt werden. Serin 6 oder Serin 7 wurden dabei als potentielle O-Glykosylierungsstellen identifiziert. Im Wildtyp CCR5 ist nur eine dieser Aminosäuren glykosyliert. Die Ergebnisse der Bindungsstudien und früherer Arbeiten (Blanpain et al., 1999; Zhou et al., 2000) weisen darauf hin, dass es Serin 6 ist. Die Glykosylierung an dieser Stelle ist konsistent mit der Entstehung eines Proteinbereichs mit hoher Konzentration negativer Ladungen infolge eines β -Turns durch Prolin 8. Durch diesen Turn kommt es zu einer direkten Nachbarschaft von Serin 6 mit dem sialierten Glykan und dem sulfatierten Tyrosin 14, die für die Bindung der Chemokine maßgeblich sind. Die Ergebnisse der diskutierten Studien zeigen Parallelen auf zu der Bindung von Selektinen und ihren Liganden. Auch hier spielen N-terminale O-Glykane und benachbarte sulfatierte Tyrosine der Liganden eine entscheidende Rolle bei der hochaffinen Bindung. Die Position, Chiralität und Struktur der Glykane beeinflusst dabei wesentlich die Affinität und Signaltransduktion der Rezeptoren (Leppanen et al., 1999; Somers et al., 2000). Eine Analyse der Aminotermini von Chemokinrezeptoren zeigt, dass sie besonders reich an Serinen, Threoninen und Tyrosinen sind. Die hier gefundenen Determinanten für einen hochaffinen Kontakt zwischen Chemokinen und dem CCR5-Rezeptor scheinen deshalb auch bei anderen Chemokinrezeptoren und ihren Liganden Relevanz zu haben. Bei Rezeptoren, die im Gegensatz zu CCR5 auch N-Glykane besitzen, können auch diese zur Wechselwirkung mit den Liganden beitragen (Chabot et al., 2000; Zhou and Tai, 1999).

Durch Bindung an CCR5 können RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β den Eintritt von HIV oder SIV in eine Zielzelle blockieren (Cocchi et al., 1995). Ein weiteres Zytokin, dass

jedoch durch Bindung an den CD4-Rezeptor zu einer Inhibition der HIV-Replikation führt, ist das Interleukin-16 (Baier et al., 1995). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das IL-16 in Form eines Vorläuferproteins synthetisiert wird (Baier et al., 1997; Bannert et al., 1996). Durch die Analyse der Genstruktur und des Promotors sollten Informationen über die Regulation der Expression dieses antiretroviralen Zytokins gesammelt werden.

Das Pro-IL-16-Gen besteht aus sieben Exons. Im Gegensatz zu den meisten Zytokingenen besitzt der Promotor keine TATA-Box. Zur Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase II tragen Proteine der Ets-Familie bei. Damit ähnelt dieser Promotor den Initiationssequenzen von CD4, CD3 ϵ , CD18 und anderen TATA-Box-losen Promotoren von Genen, welche in bestimmten Leukozyten hochaktiv sind (Clevers et al., 1988). Mit EMSA und Supershift-Assays sowie funktionellen Studien konnten die Ets-Faktoren im Pro-IL-16, die an die drei markanten und konservierten „GGAA“-Kernsequenzen binden, als GABP-Proteine identifiziert werden. Eine dieser Kernsequenzen befindet sich im transkribierten Bereich an Position +10, die beiden strangaufwärts gelegenen Motive bilden ein exaktes palindromes 18 Basenpaare umfassendes „Dyad Symmetry Element“ (DSE). Dieses Element, das auch im IL-2-Promotor/Enhancer zu finden ist (Avots et al., 1997), bestimmt wesentlich die Induzierbarkeit der Expression nach Stimulierung der Lymphozyten durch Phorbol-12-myristat-13-acetat. Die beiden GABP-Proteine (GABP α und GABP β) bilden Heterodimere (α - β) und Heterotetramere (α 2- β 2). Gegenüber dem DSE im IL-2-Gen wurde im IL-16-Gen ein 3-fach höherer Anteil an Heterotetrameren gefunden, was mit einer verstärkten Transkriptionsinitiation verbunden ist. GABP-Proteine werden durch eine Vielzahl an Signaltransduktionskaskaden mittels Phosphorylierung aktiviert. Insbesondere aber sind die Ras-Raf-Erk und JNK/SAP-Kinase-Kaskaden in diesem Zusammenhang zu nennen, die durch diverse Mitogene in Gang gesetzt werden. Ebenso wie die Kofaktoraktivität des CBP/p300-Komplexes (Janknecht and Hunter, 1996) erklären die GABP-Proteine die Verstärkung der IL-16-Produktion in Lymphozyten nach deren Stimulierung (Rumsaeng et al., 1997).

Pro-IL-16, das Vorläuferprotein des antiretroviralen Zytokins IL-16, enthält drei PDZ-Domänen (Baier et al., 1997; Baier et al., 1995). Mit einem Pro-IL-16-Fragment, das die drei PDZ-Domänen umfasst, wurden eine cDNA-Bibliothek von Milzzellen und eine cDNA Bibliothek von PBL (periphere Blutzellen) gescreent. Die Mehrzahl der positiven Klone der Milzbibliothek kodierte für C-terminale Regionen des Proteins Myosin Phosphatase Targeting Subunit 2 (MYPT2), während 34/37 der positiven Klone der PBL-Library den C-Terminus des Proteins Myosin Binding Subunit 85 (MBS85) enthielten (Ito

et al., 2004). Beide Proteine, MYPT2 und MBS85, haben eine identische Aminosäuresequenz am C-Terminus. Da MYPT1, ein drittes Protein dieser Familie der Myosin Phosphatase Targeting Subunits, C-terminal eine sehr hohe Homologie zu den C-Termini der beiden zuvor genannten Proteine aufweist, wurde zusätzlich auch eine Interaktion dieses Proteins mit dem Pro-IL-16 getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass ebenso wie MYPT2 und MBS85 auch MYPT1 an Pro-IL-16 bindet. Die drei gefundenen Interaktionspartner von Pro-IL-16 sind alle in Leukozyten exprimiert.

Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte die PDZ2-Domäne des Pro-IL-16 sowie einer neuronalen Variante (Kurschner and Yuzaki, 1999) als Wechselwirkungspartner aller drei regulatorischen Myosin-Phosphatase-Untereinheiten identifiziert werden. Auf Seiten der Myosin-Phosphatase-Untereinheiten sind die 30 C-terminalen Aminosäuren für die Bindung notwendig. Eine besondere Rolle spielt das vorletzte Serin. Ein Austausch zu Alanin verhindert die Bindung komplett.

Um die im YTH-System gefundenen Interaktionen zu bestätigen, wurden zunächst GST-MYPT2- und His₁₀-PDZ2-Proteine in Bakterien hergestellt und Pull-down-Experimente durchgeführt. Dabei konnte die Bindung sicher nachgewiesen und die kritische Rolle der C-terminalen Region des MYPT2 bei der Bindung belegt werden. Für die Bestimmung der Bindungsparameter wurden Plasmon-Resonanzmessungen mit immobilisierten MYPT2-Fragmenten in der BIAcore durchgeführt. Eine Bindung im nanomolaren Bereich, die eine physiologische Relevanz der Wechselwirkung nahelegt, konnte dabei mit der PDZ2-Domäne ermittelt werden. Durch Koimmunopräzipitationen von Pro-IL-16 und den Myosin-Phosphatase-Untereinheiten wurde die Interaktion dieser Proteine auch innerhalb der Zellen belegt. Dabei war es möglich mit spezifischen Antikörpern die Interaktion endogener Proteine in Leukozyten durch Koimmunopräzipitationen nachzuweisen.

Proteine, die miteinander in Wechselwirkung treten, weisen, zumindest temporär die gleiche Lokalisation in der Zelle auf. Dies lässt sich mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachweisen. Im konfokalen Fluoreszenzmikroskop konnte in transfizierten COS-7-Zellen eine Kolokalisierung von Pro-IL-16 mit MYPT1, MYPT2 und MBS85 in der perinukleären Region sowie an zytoskeletalen Aktomyosin-Filamenten beobachtet werden. Die Kolokalisation war besonders im kortikalen Bereich der Zellen ausgeprägt.

Die regulatorischen Untereinheiten bilden gemeinsam mit der viel kleineren katalytischen Untereinheit (PPc1) ein Holoenzym (Ito et al., 2004). Das bekannteste Substrat des Enzyms ist die leichte Kette 2 des Myosins. Die Dephosphorylierung reguliert die

Ca²⁺-Sensitivität und damit den kontraktilen Tonus. Neben Muskelzellen sind die regulatorischen Untereinheiten, von denen mehrere Spleißvarianten existieren, in vielen weiteren Geweben exprimiert - insbesondere im Gehirn und in Leukozyten (Hartshorne et al., 1998). Die Substrate in diesen Zellen sind noch weitestgehend unbekannt, eine Rolle in der Regulation kontraktiler Prozesse während zytokinetischer Vorgänge sowie zellulären Transportprozessen und Umlagerungen von kortikalen makromolekularen Komplexen bei Aktivierungsprozessen gilt jedoch als wahrscheinlich (Totsukawa et al., 1999). Die Untereinheiten sind Effektorproteine einer Reihe von Signaltransduktionskaskaden. In diesem Rahmen sind unter anderem die cGMP-abhängige Proteinkinase 1 α und RhoA zu nennen, die in der Nähe der gefundenen Pro-IL-16-Interaktionsregion an die regulatorischen Untereinheiten der Phosphatasen binden (Hofmann et al., 2000). Aus diesen Gründen ist eine unmittelbare Beteiligung des zytoplasmatischen Vorläuferproteins bei der Chemotaxis von Zellen, die ja durch das reife Zytokin induziert wird, wahrscheinlich. Alternativ kann aber auch die Bindung von Pro-IL-16 an Komponenten des Aktomyosin-Komplexes im Rahmen von Transport-, Prozessierungs- und späteren Sezernierungsprozessen des reifen, antiretroviral wirkenden Zytokins erfolgen. Eine Überprüfung dieser Hypothesen bleibt zukünftigen Arbeiten vorbehalten.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Afonso, P.V., Zamborlini, A., Saib, A., and Mahieux, R. (2007). Centrosome and retroviruses: the dangerous liaisons. *Retrovirology* 4, 27.

Aghokeng, A.F., Liu, W., Bibollet-Ruche, F., Loul, S., Mpoudi-Ngole, E., Laurent, C., Mwenda, J.M., Langat, D.K., Chege, G.K., McClure, H.M., *et al.* (2006). Widely varying SIV prevalence rates in naturally infected primate species from Cameroon. *Virology* 345, 174-189.

Agis, H., Willheim, M., Sperr, W.R., Wilfing, A., Kromer, E., Kabrna, E., Spanblochl, E., Strobl, H., Geissler, K., Spittler, A., *et al.* (1993). Monocytes do not make mast cells when cultured in the presence of SCF. Characterization of the circulating mast cell progenitor as a c-kit+, CD34+, Ly-, CD14-, CD17-, colony-forming cell. *J Immunol* 151, 4221-4227.

Albright, A.V., Soldan, S.S., and Gonzalez-Scarano, F. (2003). Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease. *J Neurovirol* 9, 222-227.

Avots, A., Hoffmeyer, A., Flory, E., Cimanis, A., Rapp, U.R., and Serfling, E. (1997). GABP factors bind to a distal interleukin 2 (IL-2) enhancer and contribute to c-Raf-mediated increase in IL-2 induction. *Mol Cell Biol* 17, 4381-4389.

Baier, M., Bannert, N., Werner, A., Adler, H.S., Otteken, A., Beer, B., Norley, S., and Kurth, R. (1998). Chemoattractant factors and the control of human immunodeficiency virus replication. *Pathobiology* 66, 128-130.

Baier, M., Bannert, N., Werner, A., Lang, K., and Kurth, R. (1997). Molecular cloning, sequence, expression, and processing of the interleukin 16 precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5273-5277.

Baier, M., Werner, A., Bannert, N., Metzner, K., and Kurth, R. (1995). HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 378, 563.

Banapour, B., Marthas, M.L., Ramos, R.A., Lohman, B.L., Unger, R.E., Gardner, M.B., Pedersen, N.C., and Luciw, P.A. (1991). Identification of viral determinants of macrophage tropism for simian immunodeficiency virus SIVmac. *Journal of virology* 65, 5798-5805.

Bannert, N. (1998). Interleukin 16: Expression, antiretrovirale Wirkung, Sequenzanalysen, Genstruktur und Promotoraktivität (Herdecke, GCA-Verlag).

Bannert, N., Adler, H.S., Werner, A., Baier, M., and Kurth, R. (1998). Molecular cloning and sequence analysis of interleukin 16 from nonhuman primates and from the mouse. *Immunogenetics* 47, 390-397.

Bannert, N., Avots, A., Baier, M., Serfling, E., and Kurth, R. (1999). GA-binding protein factors, in concert with the coactivator CREB binding protein/p300, control the induction of the interleukin 16 promoter in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1541-1546.

- Bannert, N., Baier, M., Werner, A., and Kurth, R. (1996). Interleukin-16 or not? *Nature* *381*, 30.
- Bannert, N., Craig, S., Farzan, M., Sogah, D., Santo, N.V., Choe, H., and Sodroski, J. (2001a). Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH₂-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines. *J Exp Med* *194*, 1661-1673.
- Bannert, N., Farzan, M., Friend, D.S., Ochi, H., Price, K.S., Sodroski, J., and Boyce, J.A. (2001b). Human Mast cell progenitors can be infected by macrophagetropic human immunodeficiency virus type 1 and retain virus with maturation in vitro. *Journal of virology* *75*, 10808-10814.
- Bannert, N., and Kurth, R. (2004). Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101 Suppl 2*, 14572-14579.
- Bannert, N., and Kurth, R. (2006). The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annual review of genomics and human genetics* *7*, 149-173.
- Bannert, N., Schenten, D., Craig, S., and Sodroski, J. (2000). The level of CD4 expression limits infection of primary rhesus monkey macrophages by a T-tropic simian immunodeficiency virus and macrophagetropic human immunodeficiency viruses. *Journal of virology* *74*, 10984-10993.
- Bannert, N., Vollhardt, K., Asomuddinov, B., Haag, M., Konig, H., Norley, S., and Kurth, R. (2003). PDZ Domain-mediated interaction of interleukin-16 precursor proteins with myosin phosphatase targeting subunits. *The Journal of biological chemistry* *278*, 42190-42199.
- 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., *et al.* (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* *220*, 868-871.
- Benkirane, M., Schmid-Antomarchi, H., Littman, D.R., Hirn, M., Rossi, B., and Devaux, C. (1995). The cytoplasmic tail of CD4 is required for inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by antibodies that bind to the immunoglobulin CDR3-like region in domain 1 of CD4. *Journal of virology* *69*, 6904-6910.
- Berube, P., Barbeau, B., Cantin, R., Sekaly, R.P., and Tremblay, M. (1996). Repression of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-driven gene expression by binding of the virus to its primary cellular receptor, the CD4 molecule. *Journal of virology* *70*, 4009-4016.
- Blanpain, C., Doranz, B.J., Vakili, J., Rucker, J., Govaerts, C., Baik, S.S., Lorthioir, O., Migeotte, I., Libert, F., Baleux, F., *et al.* (1999). Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *The Journal of biological chemistry* *274*, 34719-34727.
- Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T.A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* *382*, 829-833.

- Briggs, J.A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.G., and Fuller, S.D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo J* 22, 1707-1715.
- Brockhausen, I. (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1473, 67-95.
- Brodts, H., Helm, E.B., Staszewski S. (2005). *AIDS 2003/2004 Diagnostik und Therapie*, 11 edn (Berlin, Springer Verlag).
- Bryant, M., and Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 523-527.
- Bushman, F.D., Fujiwara, T., and Craigie, R. (1990). Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* 249, 1555-1558.
- Camerini, D., and Seed, B. (1990). A CD4 domain important for HIV-mediated syncytium formation lies outside the virus binding site. *Cell* 60, 747-754.
- Center, D.M., Kornfeld, H., Ryan, T.C., and Cruikshank, W.W. (2000). Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression. *Immunol Today* 21, 273-280.
- Chabot, D.J., Chen, H., Dimitrov, D.S., and Broder, C.C. (2000). N-linked glycosylation of CXCR4 masks coreceptor function for CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Journal of virology* 74, 4404-4413.
- Chakrabarti, L., Guyader, M., Alizon, M., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C., Tiollais, P., and Sonigo, P. (1987). Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* 328, 543-547.
- Chesebro, B., Nishio, J., Perryman, S., Cann, A., O'Brien, W., Chen, I.S., and Wehrly, K. (1991). Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, and macrophages. *Journal of virology* 65, 5782-5789.
- Chitnis, A., Rawls, D., and Moore, J. (2000). Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses* 16, 5-8.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., *et al.* (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-346.
- Clevers, H.C., Dunlap, S., Wileman, T.E., and Terhorst, C. (1988). Human CD3-epsilon gene contains three minixons and is transcribed from a non-TATA promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 8156-8160.
- Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., and Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270, 1811-1815.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., *et al.* (1986). What to call the AIDS virus? *Nature* 321, 10.

- Cruikshank, W.W., Center, D.M., Nisar, N., Wu, M., Natke, B., Theodore, A.C., and Kornfeld, H. (1994). Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 5109-5113.
- Daar, E.S., Little, S., Pitt, J., Santangelo, J., Ho, P., Harawa, N., Kerndt, P., Glorgi, J.V., Bai, J., Gaut, P., *et al.* (2001). Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network. *Ann Intern Med* *134*, 25-29.
- Dalgleish, 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.
- Darlix, J.L., Gabus, C., Nugeyre, M.T., Clavel, F., and Barre-Sinoussi, F. (1990). Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol* *216*, 689-699.
- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., *et al.* (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* *443*, 350-354.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Smith, M.W., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., *et al.* (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* *273*, 1856-1862.
- Demarest, J.F., Jack, N., Cleghorn, F.R., Greenberg, M.L., Hoffman, T.L., Ottinger, J.S., Fantry, L., Edwards, J., O'Brien, T.R., Cao, K., *et al.* (2001). Immunologic and virologic analyses of an acutely HIV type 1-infected patient with extremely rapid disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* *17*, 1333-1344.
- Desrosiers, R.C., Hansen-Moosa, A., Mori, K., Bouvier, D.P., King, N.W., Daniel, M.D., and Ringler, D.J. (1991). Macrophage-tropic variants of SIV are associated with specific AIDS-related lesions but are not essential for the development of AIDS. *Am J Pathol* *139*, 29-35.
- Dimitrov, D.S., Norwood, D., Stantchev, T.S., Feng, Y., Xiao, X., and Broder, C.C. (1999). A mechanism of resistance to HIV-1 entry: inefficient interactions of CXCR4 with CD4 and gp120 in macrophages. *Virology* *259*, 1-6.
- Doh, J., and Irvine, D.J. (2006). Immunological synapse arrays: patterned protein surfaces that modulate immunological synapse structure formation in T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 5700-5705.
- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* *85*, 1067-1076.
- Duvic, M. (1995). Human immunodeficiency virus and the skin: selected controversies. *J Invest Dermatol* *105*, 117S-121S.

- Edinger, A.L., Amedee, A., Miller, K., Doranz, B.J., Endres, M., Sharron, M., Samson, M., Lu, Z.H., Clements, J.E., Murphey-Corb, M., *et al.* (1997). Differential utilization of CCR5 by macrophage and T cell tropic simian immunodeficiency virus strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4005-4010.
- Evans, L.A., McHugh, T.M., Stites, D.P., and Levy, J.A. (1987). Differential ability of human immunodeficiency virus isolates to productively infect human cells. *J Immunol* 138, 3415-3418.
- Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N.P., Gerard, C., Sodroski, J., and Choe, H. (1999). Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96, 667-676.
- Fauquet CM., M.M., Maniloff J., Desselberger U., Ball LA (2005). *Virus taxonomy, Vol 8* (London, Elsevier Academic Press).
- Feng, S., and Holland, E.C. (1988). HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* 334, 165-167.
- 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.
- Fiebig, E.W., Heldebrant, C.M., Smith, R.I., Conrad, A.J., Delwart, E.L., and Busch, M.P. (2005). Intermittent low-level viremia in very early primary HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 39, 133-137.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., *et al.* (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 5, 512-517.
- Flaherty, M.T., Hauer, D.A., Mankowski, J.L., Zink, M.C., and Clements, J.E. (1997). Molecular and biological characterization of a neurovirulent molecular clone of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology* 71, 5790-5798.
- 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.
- Froland, S.S., Jenum, P., Lindboe, C.F., Wefring, K.W., Linnestad, P.J., and Bohmer, T. (1988). HIV-1 infection in Norwegian family before 1970. *Lancet* 1, 1344-1345.
- Fukuda, M., Carlsson, S.R., Klock, J.C., and Dell, A. (1986). Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells, and acute myelogenous leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* 261, 12796-12806.
- Gabuzda, D., and Wang, J. (1999). Chemokine receptors and virus entry in the central nervous system. *J Neurovirol* 5, 643-658.

- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F., and Trono, D. (1995). HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 83, 569-576.
- Galli, S.J., Grimaldeston, M., and Tsai, M. (2008). Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 8, 478-486.
- Ganser-Pornillos, B.K., von Schwedler, U.K., Stray, K.M., Aiken, C., and Sundquist, W.I. (2004). Assembly properties of the human immunodeficiency virus type 1 CA protein. *Journal of virology* 78, 2545-2552.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., *et al.* (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436-441.
- Garcia, J.V., and Miller, A.D. (1992). Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res Virol* 143, 52-55.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., *et al.* (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.
- Gelderblom, H.R. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids* 5, 617-637.
- Gonzalez-Scarano, F., and Martin-Garcia, J. (2005). The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 5, 69-81.
- Gorry, P.R., Bristol, G., Zack, J.A., Ritola, K., Swanstrom, R., Birch, C.J., Bell, J.E., Bannert, N., Crawford, K., Wang, H., *et al.* (2001). Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 isolates from brain and lymphoid tissues predicts neurotropism independent of coreceptor specificity. *Journal of virology* 75, 10073-10089.
- Gottlieb, M.S., Groopman, J.E., Weinstein, W.M., Fahey, J.L., and Detels, R. (1983). The acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 99, 208-220.
- Greenway, A.L., McPhee, D.A., Allen, K., Johnstone, R., Holloway, G., Mills, J., Azad, A., Sankovich, S., and Lambert, P. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *Journal of virology* 76, 2692-2702.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., and Sharp, P.M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287, 607-614.
- Hansen, J., Schulze, T., and Moelling, K. (1987). RNase H activity associated with bacterially expressed reverse transcriptase of human T-cell lymphotropic virus III/lymphadenopathy-associated virus. *The Journal of biological chemistry* 262, 12393-12396.
- Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S., and Malim, M.H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113, 803-809.

- Hartshorne, D.J., Ito, M., and Erdodi, F. (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* *19*, 325-341.
- Hatfield, D., and Oroszlan, S. (1990). The where, what and how of ribosomal frameshifting in retroviral protein synthesis. *Trends Biochem Sci* *15*, 186-190.
- Heib, V., Becker, M., Taube, C., and Stassen, M. (2008). Advances in the understanding of mast cell function. *Br J Haematol* *142*, 683-694.
- Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 7311-7315.
- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* *373*, 123-126.
- Hofmann, F., Ammendola, A., and Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* *113* (Pt 10), 1671-1676.
- Hogg, R.S., Yip, B., Chan, K.J., Wood, E., Craib, K.J., O'Shaughnessy, M.V., and Montaner, J.S. (2001). Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy. *Jama* *286*, 2568-2577.
- Hung, A.Y., and Sheng, M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *The Journal of biological chemistry* *277*, 5699-5702.
- 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.
- Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F., and Hartshorne, D.J. (2004). Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem* *259*, 197-209.
- Janknecht, R., and Hunter, T. (1996). Transcription. A growing coactivator network. *Nature* *383*, 22-23.
- Kilby, J.M., and Eron, J.J. (2003). Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med* *348*, 2228-2238.
- Kingsley, D.M., Kozarsky, K.F., Hobbie, L., and Krieger, M. (1986). Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. *Cell* *44*, 749-759.
- Kuehn, H.S., and Gilfillan, A.M. (2007). G protein-coupled receptors and the modification of FcepsilonRI-mediated mast cell activation. *Immunol Lett* *113*, 59-69.
- Kurschner, C., and Yuzaki, M. (1999). Neuronal interleukin-16 (NIL-16): a dual function PDZ domain protein. *J Neurosci* *19*, 7770-7780.

- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., and Hendrickson, W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648-659.
- Lasky, L.A., Nakamura, G., Smith, D.H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T., and Capon, D.J. (1987). Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* 50, 975-985.
- Lazzarin, A., Clotet, B., Cooper, D., Reynes, J., Arasteh, K., Nelson, M., Katlama, C., Stellbrink, H.J., Delfraissy, J.F., Lange, J., *et al.* (2003). Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* 348, 2186-2195.
- Lemey, P., Pybus, O.G., Wang, B., Saksena, N.K., Salemi, M., and Vandamme, A.M. (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6588-6592.
- Leppanen, A., Mehta, P., Ouyang, Y.B., Ju, T., Helin, J., Moore, K.L., van Die, I., Canfield, W.M., McEver, R.P., and Cummings, R.D. (1999). A novel glycosulfopeptide binds to P-selectin and inhibits leukocyte adhesion to P-selectin. *The Journal of biological chemistry* 274, 24838-24848.
- Levy, J.A. (2003). The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends Immunol* 24, 628-632.
- Lewin, S.R., Sonza, S., Irving, L.B., McDonald, C.F., Mills, J., and Crowe, S.M. (1996). Surface CD4 is critical to in vitro HIV infection of human alveolar macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12, 877-883.
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J* 11, 3053-3058.
- Li, Y., Li, L., Wadley, R., Reddel, S.W., Qi, J.C., Archis, C., Collins, A., Clark, E., Cooley, M., Kouts, S., *et al.* (2001). Mast cells/basophils in the peripheral blood of allergic individuals who are HIV-1 susceptible due to their surface expression of CD4 and the chemokine receptors CCR3, CCR5, and CXCR4. *Blood* 97, 3484-3490.
- Liu, Y., Cruikshank, W.W., O'Loughlin, T., O'Reilly, P., Center, D.M., and Kornfeld, H. (1999). Identification of a CD4 domain required for interleukin-16 binding and lymphocyte activation. *The Journal of biological chemistry* 274, 23387-23395.
- Luria, S., Chambers, I., and Berg, P. (1991). Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5326-5330.
- Maciaszek, J.W., Parada, N.A., Cruikshank, W.W., Center, D.M., Kornfeld, H., and Viglianti, G.A. (1997). IL-16 represses HIV-1 promoter activity. *J Immunol* 158, 5-8.
- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., and Abraham, S.N. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381, 77-80.

- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254-257.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103.
- Mankowski, J.L., Spelman, J.P., Ressetar, H.G., Strandberg, J.D., Laterra, J., Carter, D.L., Clements, J.E., and Zink, M.C. (1994). Neurovirulent simian immunodeficiency virus replicates productively in endothelial cells of the central nervous system in vivo and in vitro. *Journal of virology* 68, 8202-8208.
- Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato, I., Stouwe, R.A., Holzman, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W., *et al.* (1981). An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 305, 1431-1438.
- Mathy, N.L., Bannert, N., Norley, S.G., and Kurth, R. (2000). Cutting edge: CD4 is not required for the functional activity of IL-16. *J Immunol* 164, 4429-4432.
- McKeating, J.A., and Willey, R.L. (1989). Structure and function of the HIV envelope. *Aids* 3 *Suppl 1*, S35-41.
- Mehandru, S., Poles, M.A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., Boden, D., Racz, P., and Markowitz, M. (2004). Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200, 761-770.
- Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M., Schwartz, D., Sullivan, J., *et al.* (2000). HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2709-2714.
- Milazzo, F., Piconi, S., Trabattoni, D., Magni, C., Coen, M., Capetti, A., Fusi, M.L., Parravicini, C., and Clerici, M. (1999). Intractable pruritus in HIV infection: immunologic characterization. *Allergy* 54, 266-272.
- Mirzabekov, T., Bannert, N., Farzan, M., Hofmann, W., Kolchinsky, P., Wu, L., Wyatt, R., and Sodroski, J. (1999). Enhanced expression, native purification, and characterization of CCR5, a principal HIV-1 coreceptor. *The Journal of biological chemistry* 274, 28745-28750.
- Mirzabekov, T., Kontos, H., Farzan, M., Marasco, W., and Sodroski, J. (2000). Paramagnetic proteoliposomes containing a pure, native, and oriented seven-transmembrane segment protein, CCR5. *Nat Biotechnol* 18, 649-654.
- Mkrtchyan, S.R., Markosyan, R.M., Eadon, M.T., Moore, J.P., Melikyan, G.B., and Cohen, F.S. (2005). Ternary complex formation of human immunodeficiency virus type 1 Env, CD4, and chemokine receptor captured as an intermediate of membrane fusion. *Journal of virology* 79, 11161-11169.

- Moebius, U., Clayton, L.K., Abraham, S., Diener, A., Yunis, J.J., Harrison, S.C., and Reinherz, E.L. (1992). Human immunodeficiency virus gp120 binding C'C" ridge of CD4 domain 1 is also involved in interaction with class II major histocompatibility complex molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 12008-12012.
- Mori, K., Ringler, D.J., and Desrosiers, R.C. (1993). Restricted replication of simian immunodeficiency virus strain 239 in macrophages is determined by env but is not due to restricted entry. *Journal of virology* 67, 2807-2814.
- Mori, K., Ringler, D.J., Kodama, T., and Desrosiers, R.C. (1992). Complex determinants of macrophage tropism in env of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology* 66, 2067-2075.
- Mori, K., Rosenzweig, M., and Desrosiers, R.C. (2000). Mechanisms for adaptation of simian immunodeficiency virus to replication in alveolar macrophages. *Journal of virology* 74, 10852-10859.
- Moriuchi, H., Moriuchi, M., and Fauci, A.S. (1998). Differentiation of promonocytic U937 subclones into macrophagelike phenotypes regulates a cellular factor(s) which modulates fusion/entry of macrophagetropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 72, 3394-3400.
- Muhlhahn, P., Zweckstetter, M., Georgescu, J., Ciosto, C., Renner, C., Lanzendorfer, M., Lang, K., Ambrosius, D., Baier, M., Kurth, R., *et al.* (1998). Structure of interleukin 16 resembles a PDZ domain with an occluded peptide binding site. *Nat Struct Biol* 5, 682-686.
- Nahmias, A.J., Weiss, J., Yao, X., Lee, F., Kodosi, R., Schanfield, M., Matthews, T., Bolognesi, D., Durack, D., Motulsky, A., *et al.* (1986). Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959. *Lancet* 1, 1279-1280.
- Noireau, F. (1987). HIV transmission from monkey to man. *Lancet* 1, 1498-1499.
- Ochi, H., Hirani, W.M., Yuan, Q., Friend, D.S., Austen, K.F., and Boyce, J.A. (1999). T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. *J Exp Med* 190, 267-280.
- Paxton, W., Connor, R.I., and Landau, N.R. (1993). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *Journal of virology* 67, 7229-7237.
- Persaud, D., Zhou, Y., Siliciano, J.M., and Siliciano, R.F. (2003). Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers. *Journal of virology* 77, 1659-1665.
- Porco, T.C., Martin, J.N., Page-Shafer, K.A., Cheng, A., Charlebois, E., Grant, R.M., and Osmond, D.H. (2004). Decline in HIV infectivity following the introduction of highly active antiretroviral therapy. *Aids* 18, 81-88.
- Reynolds, M.R., Rakasz, E., Skinner, P.J., White, C., Abel, K., Ma, Z.M., Compton, L., Napoe, G., Wilson, N., Miller, C.J., *et al.* (2005). CD8+ T-lymphocyte response to major

immunodominant epitopes after vaginal exposure to simian immunodeficiency virus: too late and too little. *Journal of virology* 79, 9228-9235.

Ribeiro, R.M., Mohri, H., Ho, D.D., and Perelson, A.S. (2002). In vivo dynamics of T cell activation, proliferation, and death in HIV-1 infection: why are CD4⁺ but not CD8⁺ T cells depleted? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15572-15577.

Rogel, M.E., Wu, L.I., and Emerman, M. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *Journal of virology* 69, 882-888.

Roy, S., Delling, U., Chen, C.H., Rosen, C.A., and Sonenberg, N. (1990). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev* 4, 1365-1373.

Rumsaeng, V., Cruikshank, W.W., Foster, B., Prussin, C., Kirshenbaum, A.S., Davis, T.A., Kornfeld, H., Center, D.M., and Metcalfe, D.D. (1997). Human mast cells produce the CD4⁺ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J Immunol* 159, 2904-2910.

Samson, M., LaRosa, G., Libert, F., Paindavoine, P., Detheux, M., Vassart, G., and Parmentier, M. (1997). The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *The Journal of biological chemistry* 272, 24934-24941.

Saxinger, C., Levine, P.H., Dean, A., Lange-Wantzin, G., and Gallo, R. (1985). Unique pattern of HTLV-III (AIDS-related) antigen recognition by sera from African children in Uganda (1972). *Cancer Res* 45, 4624s-4626s.

Schenten, D., Marcon, L., Karlsson, G.B., Parolin, C., Kodama, T., Gerard, N., and Sodroski, J. (1999). Effects of soluble CD4 on simian immunodeficiency virus infection of CD4-positive and CD4-negative cells. *Journal of virology* 73, 5373-5380.

Schindler, M., Munch, J., Kutsch, O., Li, H., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Muller-Trutwin, M.C., Novembre, F.J., Peeters, M., Courgnaud, V., *et al.* (2006). Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell* 125, 1055-1067.

Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M.A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., *et al.* (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science* 283, 857-860.

Sharma, D.P., Zink, M.C., Anderson, M., Adams, R., Clements, J.E., Joag, S.V., and Narayan, O. (1992). Derivation of neurotropic simian immunodeficiency virus from exclusively lymphocytotropic parental virus: pathogenesis of infection in macaques. *Journal of virology* 66, 3550-3556.

Silver, R., Silverman, A.J., Vitkovic, L., and Lederhendler, II (1996). Mast cells in the brain: evidence and functional significance. *Trends Neurosci* 19, 25-31.

Singhal, P.K., Kumar, P.R., Rao, M.R., Kyasani, M., and Mahalingam, S. (2006). Simian immunodeficiency virus Vpx is imported into the nucleus via importin alpha-dependent and -independent pathways. *Journal of virology* 80, 526-536.

- Somers, W.S., Tang, J., Shaw, G.D., and Camphausen, R.T. (2000). Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* *103*, 467-479.
- Sonigo, P., Alizon, M., Staskus, K., Klatzmann, D., Cole, S., Danos, O., Retzel, E., Tiollais, P., Haase, A., and Wain-Hobson, S. (1985). Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* *42*, 369-382.
- Stadel, J.M., Wilson, S., and Bergsma, D.J. (1997). Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* *18*, 430-437.
- Sundstrom, J.B., Ellis, J.E., Hair, G.A., Kirshenbaum, A.S., Metcalfe, D.D., Yi, H., Cardona, A.C., Lindsay, M.K., and Ansari, A.A. (2007). Human tissue mast cells are an inducible reservoir of persistent HIV infection. *Blood* *109*, 5293-5300.
- Sundstrom, J.B., Little, D.M., Villinger, F., Ellis, J.E., and Ansari, A.A. (2004). Signaling through Toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells. *J Immunol* *172*, 4391-4401.
- Suzuki, T., Ohsugi, Y., Uchida-Toita, M., Akiyama, T., and Yoshida, M. (1999). Tax oncoprotein of HTLV-1 binds to the human homologue of Drosophila discs large tumor suppressor protein, hDLG, and perturbs its function in cell growth control. *Oncogene* *18*, 5967-5972.
- Svarovskaia, E.S., Cheslock, S.R., Zhang, W.H., Hu, W.S., and Pathak, V.K. (2003). Retroviral mutation rates and reverse transcriptase fidelity. *Front Biosci* *8*, d117-134.
- Tate, C.G., and Grishammer, R. (1996). Heterologous expression of G-protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol* *14*, 426-430.
- Taubenberger, J.K. (2006). The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Proc Am Philos Soc* *150*, 86-112.
- Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hosoya, H., Hartshorne, D.J., and Matsumura, F. (1999). Activation of myosin phosphatase targeting subunit by mitosis-specific phosphorylation. *J Cell Biol* *144*, 735-744.
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E.A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R.S., *et al.* (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* *12*, 1198-1202.
- Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A., and Hill, F. (1992). Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. *Embo J* *11*, 3405-3412.
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B.F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., *et al.* (2006). Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* *444*, 164.
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* *3*, 97-130.

- Vigano, A., Trabattoni, D., Schneider, L., Ottaviani, F., Aliffi, A., Longhi, E., Rusconi, S., and Clerici, M. (2006). Failure to eradicate HIV despite fully successful HAART initiated in the first days of life. *J Pediatr* 148, 389-391.
- von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.P., Cimbara, D.M., *et al.* (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* 114, 701-713.
- Vorou, R.M., Papavassiliou, V.G., and Tsiodras, S. (2007). Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. *Epidemiol Infect* 135, 1231-1247.
- Wildum, S., Schindler, M., Munch, J., and Kirchhoff, F. (2006). Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *Journal of virology* 80, 8047-8059.
- Williams, G., Stretton, T.B., and Leonard, J.C. (1983). AIDS in 1959? *Lancet* 2, 1136.
- Wu, L., LaRosa, G., Kassam, N., Gordon, C.J., Heath, H., Ruffing, N., Chen, H., Humblias, J., Samson, M., Parmentier, M., *et al.* (1997). Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *J Exp Med* 186, 1373-1381.
- Yeni, P.G., Hammer, S.M., Hirsch, M.S., Saag, M.S., Schechter, M., Carpenter, C.C., Fischl, M.A., Gatell, J.M., Gazzard, B.G., Jacobsen, D.M., *et al.* (2004). Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *Jama* 292, 251-265.
- Zapp, M.L., and Green, M.R. (1989). Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* 342, 714-716.
- Zhang, Y., Lou, B., Lal, R.B., Gettie, A., Marx, P.A., and Moore, J.P. (2000). Use of inhibitors to evaluate coreceptor usage by simian and simian/human immunodeficiency viruses and human immunodeficiency virus type 2 in primary cells. *Journal of virology* 74, 6893-6910.
- Zhou, H., and Tai, H.H. (1999). Characterization of recombinant human CXCR4 in insect cells: role of extracellular domains and N-glycosylation in ligand binding. *Arch Biochem Biophys* 369, 267-276.
- Zhou, N., Luo, Z., Hall, J.W., Luo, J., Han, X., and Huang, Z. (2000). Molecular modeling and site-directed mutagenesis of CCR5 reveal residues critical for chemokine binding and signal transduction. *Eur J Immunol* 30, 164-173.
- Zhou, P., Goldstein, S., Devadas, K., Tewari, D., and Notkins, A.L. (1997). Human CD4+ cells transfected with IL-16 cDNA are resistant to HIV-1 infection: inhibition of mRNA expression. *Nat Med* 3, 659-664.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In den vorliegenden Arbeiten werden unterschiedliche Aspekte des Zelltropismus von HIV und SIV untersucht. Im Fokus stehen dabei insbesondere die viralen Rezeptoren und einige ihrer physiologischen Bindungspartner.

Der HIV- und SIV-Tropismus ist überwiegend über die Expression von CD4 und Korezeptor definiert. Eine Ausnahme sind Makrophagen von Rhesusaffen, dem wichtigsten HIV-Tiermodell. Trotz der Expression von CD4 und CCR5 replizieren nur M-trope und nicht T-trope SIVmac-Isolate in diesen Zellen, obwohl alle SIVmac-Isolate in der Lage sind diese Rezeptoren zu verwenden. Als Determinante des SIVmac-Tropismus ist die geringe CD4-Expression ihrer Makrophagen ermittelt worden. Nach Überexpression von CD4 waren sowohl M-trope und T-trope SIVmac-Varianten als auch M-trope HIV-Stämme in der Lage, diese Zellen effizient zu infizieren. Die Fähigkeit M-troper SIVmac-Stämme, mit der geringen CD4-Expression der Makrophagen eine hohe Infektionsrate zu erreichen, geht mit einer teilweisen CD4-Unabhängigkeit einher, deren Grad nimmt mit der CCR5-Dichte zu. Infektionsstudien mit einem CD4-spezifischen Antikörper belegen, dass auch M-trope Isolate in diesen Zellen CD4-abhängig bleiben, die geringe CD4-Dichte jedoch wesentlich effektiver nutzen. Als Ursache dafür kommt eine unmittelbare partielle Verfügbarkeit des Korezeptorepitops in Frage, so dass eine CD4-Interaktion zu dessen Exposition nicht zwingend erforderlich wird.

In einer weiteren Tropismusstudie wurde die Infektion von unreifen Mastzellen (PrMC) untersucht. Im Gegensatz zu reifen Mastzellen (MC) exprimieren PrMC sowohl CD4 als auch CCR5, CXCR4 und CCR3. Replikationsexperimente mit *in vitro* aus Nabelschnurblut differenzierten PrMC belegen jedoch, dass nur M-trope HIV-1-Stämme und nicht CXCR4-verwendende T-trope Isolate in diesen Zellen replizieren. Infektionsexperimente mit Korezeptor-spezifischen Inhibitoren belegen, dass dabei CCR5 der dominierende Korezeptor ist. Die Infektion der PrMC wurde durch GFP-Reporterviren in Verbindung mit dem Nachweis PrMC- und MC-typischer Enzymaktivitäten in den infizierten Zellen auf Einzelzellniveau bestätigt. Nach Infektion im PrMC-Stadium differenzieren die Zellen zu reifen MCs. Aufgrund ihrer langen Lebensdauer und der Auswanderung in viele Gewebe des Körpers, in denen suboptimale Spiegel der antiretroviralen Therapeutika zu erwarten sind, stellen infizierte MC eines der potentiellen HIV-Reservoirs dar, die eine vollständige Eradikation des Virus derzeit verhindern.

Eine hohe Expression, native Isolierung und Rekonstitution des CCR5-Korezeptors sind aufgrund des hohen Anteils hydrophober Bereiche extrem problematisch. Eine 5-fach höhere Expression konnte durch Optimierung der Kodons erzielt werden. Um eine Solubilisierung des CCR5 im gefalteten nativen Zustand zu erreichen, wurde eine Reihe von Detergentien getestet, von denen Cyclohexyl-Pentyl- β -D-Maltosid die beste Strukturhaltung erlaubte. Der korrekt gefaltete Zustand des isolierten Rezeptors wurde durch Präzipitation mit konformationsabhängigen Antikörpern und durch Bindung an einen Komplex aus solublen CD4 und gp120 von HIV-1 nachgewiesen. Die Bindung an das gp120 war für die reife, posttranskriptionell modifizierte Form des Rezeptors wesentlich stärker als für die unreife Form. Dem Hinweis auf eine Rolle posttranskriptionaler Modifikationen des Proteins bei der Bindung von Liganden wurde in einer nachfolgenden Studie nachgegangen.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass CCR5 an Serin 6 ein O-Glykan enthält. Die O-Glykosylierung spielt keinerlei Rolle beim CCR5-vermittelten Eintritt von HIV in die Zelle. Im Gegensatz dazu sind die Zucker und insbesondere die endständigen Sialinsäuren mit ihren negativen Ladungen für die Interaktion mit den β -Chemokinliganden essentiell. In homologen kompetitiven Bindungsstudien mit CCR5-exprimierenden Zellen und iodinierten Chemokinen ist bei Abwesenheit von O-Glykanen nur eine minimale Chemokinbindung detektierbar, während für den glykosylierten CCR5-Wildtyp Bindungskonstanten im einstelligen Nanomolarbereich gemessen wurden. In Übereinstimmung mit den durchgeführten Bindungsstudien wurde ein stark verminderter chemokininduzierter Ca^{2+} -Influx mit glykosylierungsdefizienten Mutanten ermittelt. Ebenso wie der Zucker an Serin 6 ist die Sulfatierung von N-terminalen Tyrosinen, insbesondere von Tyrosin 14 und Tyrosin 15, für die Chemokinbindung wesentlich. In der Summe weisen die erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass, ähnlich wie bei der Interaktion von Selektinen mit ihren Liganden, die negativen Ladungen an Sialinsäuren und Sulfaten im N-Terminus von CCR5 für hochaffine Bindungen benötigt werden.

Eine Inhibition der HIV-Replikation ist ebenfalls über den CD4-Rezeptor zu erzielen. Bestimmte CD4-spezifische Antikörper als auch der physiologische Ligand Interleukin-16 (IL-16) sind in der Lage, über eine Signaltransduktionskette die LTR-Aktivität zu hemmen. Aus diesem Grunde wurden das IL-16-Gen und sein Promotor analysiert. Das in Lymphozyten exprimierte IL-16 wird in Form eines 67 kDa großen Vorläuferproteins (Pro-IL-16) synthetisiert. Nach Spaltung durch die Caspase 3 wird dessen C-terminales Fragment von 13 kDa als reifes antiretrovirales Zytokin sezerniert. Das Pro-IL-16-

kodierende Gen besteht aus sieben Exons und besitzt einen Promotor ohne TATA-Box. Die Expression ist wesentlich durch GA-Binding Proteins (GABPs) gesteuert, die auch im IL-2-Enhancer die Induktion der Transkription regulieren. Durch Phorbolster lässt sich die Aktivität des Promotors in Lymphozyten um den Faktor 8 erhöhen. Zwei der hochkonservierten palindromen GABP-Bindestellen formen ein Dyad Symmetry Element (DSE). Über die Bindung an GABP kontrolliert der CREB/p300-Koaktivatorkomplex die Pro-IL-16-Transkription.

Der intrazelluläre Transport des Pro-IL-16 erfolgt über Aktomyosin-Komplexe. Als Bindungspartner des Vorläuferproteins wurden mit MYPT1, MYPT2 und MBS85 drei nahe verwandte regulatorische Untereinheiten der Myosin-Phosphatase mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid-Systems identifiziert. Ihr C-Terminus bindet an die PDZ2-Domäne des Pro-IL-16. Die hochspezifische Interaktion konnte mittels Plasmonresonanz-Messungen und Koimmunopräzipitationen bestätigt werden. In Zellen kolokalisieren Pro-IL-16 sowie MYPT1, MYPT2 und MBS85 an Aktin-Myosin-Filamenten. Aufgrund der gefundenen Interaktionspartner des Pro-IL-16 bleibt festzuhalten, dass neben seiner Rolle als Vorläuferprotein eines antiretroviralen Zytokins noch weitere physiologische Funktionen wahrscheinlich sind.

7. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth für die großzügige ideelle und materielle Unterstützung meiner Arbeiten im Paul-Ehrlich-Institut in Langen und später am Robert Koch-Institut in Berlin danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Steven Norley und Herrn Dr. Joachim Denner für die gute Zusammenarbeit und anregende Diskussion der Ergebnisse und Projekte sowie allen Kooperationspartnern, die ich hier nicht aufzählen kann.

Herrn Prof. Joseph Sodroski und seinen Mitarbeitern, insbesondere Michael Farzan und Tajib Mirzabekov, danke ich für die wunderbare und wissenschaftlich sehr erfolgreiche Zeit an der Harvard Medical School in Boston. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Joshua Boyce vom Dana-Farber Cancer Insitut in Boston für die guten Ideen danken, die mir Anstoß für einige der Projekte waren. Der Aufenthalt in Boston wäre ohne ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft nicht möglich gewesen. Deshalb gilt mein Dank auch dieser Unterstützung.

Für die stets freundliche und wissenschaftlich anregende Atmosphäre im Labor am Robert Koch-Institut geht ein herzliches Dankeschön an alle Mitarbeiter der AG Norley und des ZBS 4. Dankend erwähnen möchte ich auch meine technischen Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen, die zum Erfolg der hier aufgeführten Arbeiten beigetragen haben, insbesondere Steward Craig, Daniela Schacht und Maria Pack.

Letztlich möchte ich mich auch bei meiner Frau bedanken, die mir so häufig den Rücken freigehalten hat und die vielen Überstunden und Samstage im Labor tolerierte.

8. ERKLÄRUNG

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

15.01.2009.....
Datum

.....
Unterschrift