

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

Vorgelegt von
Diplom-Biochemiker Marko Norman Lampe
Aus: Gronau (Leine)
Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

**Analyse der frühen Schritte der HIV-1-Zell-
Interaktion mittels Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie**

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich

PD Dr. Stephan Urban

*Susanne und
Meiner Familie*

Inhaltsverzeichnis

1	Veröffentlichungen	I
2	Abkürzungsverzeichnis	II
3	Zusammenfassung	I
4	Summary	II
5	Einleitung	I
5.1	Das HI-Virus und AIDS	1
5.2	Der Aufbau des HI-Virus	3
5.3	Das Virale Protein R (Vpr)	5
5.4	Der HIV-Replikationszyklus.....	7
5.5	Allgemeine Viruseintrittsmechanismen	10
5.5.1	Der Mechanismus der HIV-1 Fusion an der Plasmamembran	11
5.5.2	Methoden zur Detektion der HIV-1 Fusionskinetik	12
5.5.3	Adhäsionsfaktoren (<i>attachment factors</i>) von HIV-1	14
5.6	Methodische Einleitung.....	15
5.6.1	Grundlagen der Fluoreszenz	15
5.6.2	Fluoreszierende Proteine	16
5.6.3	Fluoreszenzmarkierte HIV-Proteine.....	18
5.6.4	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie.....	18
5.6.5	TIRF-Mikroskopie	20
5.6.6	Die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie	22
6	Fragestellung	24
7	Material und Methoden	25
7.1	Materialien	25
7.1.1	Chemikalien	25
7.1.2	Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Kits.....	26
7.1.3	Puffer und Lösungen	27
7.1.4	Enzyme	28
7.1.5	DNA- und Protein-Standardmarker.....	29
7.1.6	Antiseren	29
7.1.7	Verwendete Plasmide	29
7.1.8	Synthetische Oligonukleotide für PCR	30
7.1.9	Sterilisation	30
7.1.10	Bakterienkulturen	30
7.1.11	Bakterienstämme	30
7.1.12	Zelllinien	31
7.1.13	Nährmedien und Zusatzreagenzien	32
7.2	Technische Geräte	32
7.3	Software für allgemeine Anwendungen.....	33
7.4	Molekularbiologische Methoden.....	33
7.4.1	Transformation von Bakterien	33
7.4.2	Präparation von Plasmid-DNA	33
7.4.2.1	Mini-Präparation	33
7.4.2.2	Maxi-Präparation	34
7.4.3	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	34
7.4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
7.4.5	DNA-Restriktion und Ligation	35
7.4.6	Elektrophoretische Separation von DNA.....	35
7.4.7	Klonierung von pmRFP1.Vpr.....	35
7.5	Biochemische Methoden	36
7.5.1	p24-ELISA	36
7.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
7.5.3	Westernblot	37
7.5.4	pH-Stabilität von Fluorophoren in Viruspartikeln.....	37
7.6	Zellbiologische und virologische Methoden.....	37
7.7	Zellkultur	37
7.7.1	Cryo-Konservierung von Zelllinien.....	38

Inhaltsverzeichnis

7.7.2	Adaption von HeLaP4-Zellen an Hybridomed 1000F	38
7.7.3	Transfektion von Zelllinien	38
7.7.4	Viruspartikelproduktion und -aufreinigung	39
7.7.5	Infektion von T2M-Reporterzellen	39
7.7.6	Durchflußzytometrie zur Bestimmung der Virusbindung und Oberflächenkonzentration von Rezeptormolekülen	40
7.7.7	β -Lactamase-Fusionsassay	40
7.8	Mikroskopie	41
7.8.1	Mikroskopbeschaffung	41
7.8.2	Aufbau des Mikroskops	42
7.8.3	TIRF-Mikroskopie	43
7.8.4	Mikroskopische Bestimmung der Partikeldiffusion und Virus-Zell-Bindung	44
7.8.5	Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Viruspartikeln in Suspension	44
7.8.6	Bestimmung der Virusbindung und Virus-Zell-Kontaktzeit	45
7.9	Lebendzellmikroskopie zur Detektion intrazellulärer Viruspartikel	45
7.9.1	Bestimmung des Doppelmarkierungsgrads und Analyse der Partikelzahl nach Tritonbehandlung	46
7.10	Fluoreszenzmarkierung von Viruspartikeln mit GPI-AGT-Tag	46
7.11	Experimente mit Liposomen	47
7.11.1	Herstellung von <i>Small Unilamellar Vesicles</i>	47
7.11.2	Herstellung von <i>Giant Unilamellar Vesicles</i>	47
7.11.3	Messung der Fluoreszenzsignalen im Lumen der GUVs mittels FCS	47
7.11.4	R18-Markierung von Viren und Detektion des Dequenching im Fluoreszenzspektrometer	47
8	Ergebnisse	49
8.1	Verfügbare provirale Plasmide	51
8.2	Klonierung von pmRFP1.Vpr	52
8.3	Zelllinien	53
8.4	Zelluläre Autofluoreszenz	54
8.4.1	Ursachen der zellulären Autofluoreszenz	54
8.4.2	Spektrales Entmischen und Ausbleichen der Autofluoreszenz	56
8.4.3	Reduktion der punktierten Autofluoreszenz	57
8.4.4	Charakterisierung der in Hybridomed 1000F kultivierten HeLaP4-Zellen	58
8.5	Charakterisierung zweifarbig fluoreszenzmarkierter Viruspartikel	59
8.5.1	Herstellung und virologisch-biochemische Analyse	59
8.5.2	Doppelmarkierungsgrad der fluoreszenzmarkierten Viruspartikel	62
8.5.3	Eintrittskompetenz von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln	65
8.5.4	Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Viruspartikeln	66
8.6	Wahl der geeigneten Mikroskoptechnik für die Beobachtung von Virus-Zell-Interaktionen	68
8.6.1	Konfokale Mikroskopie	68
8.6.2	TIRF-Mikroskopie	69
8.6.2.1	Optimierung der Zugänglichkeit von HIV-Partikeln zur Zellunterseite	70
8.6.2.2	Analyse der Partikelbewegung unterhalb der Zellen	71
8.6.3	Fluoreszenz-Weitfeldmikroskopie	72
8.7	Die Virus-Zell-Interaktion	73
8.7.1	Bewegungsverhalten von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln	73
8.7.2	Heparansulfat-abhängige Virusbindung	74
8.7.3	Quantifizierung der Virusbindung an verschiedene Zelllinien	77
8.8	Analyse der Virus-Zell-Interaktion mit VSV-G pseudotypisierten HI-Viruspartikeln	82
8.8.1	Einfluss des pH-Werts auf die Fluoreszenzintensität von Viruspartikeln	82
8.8.2	Fusionsinhibition von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln	84
8.8.3	Virus-Zell-Interaktionen von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln	85
8.8.4	Untersuchung der Virus-Zell-Interaktion mittels Semi-Automatischer Auswert-Algorithmen	86
8.8.5	Detaillierte Analyse eines Einzelereignisses	90
8.9	Analyse der Farbtrennung auf Einzelpartikelebene in fixierten Zellen	92
8.10	Einfluss der Fluoreszenzmarkierung der Viruspartikel auf die Stabilität der Matrixhülle	94
8.11	Quantitative Bestimmung der Virusstabilität in Abhängigkeit von der Prozessierung des Gag-Polyproteins	96
8.12	Fluoreszenzmarkierung der Lipidmembran der Viruspartikel	99
8.13	Tracking Software	102
8.13.1	Arbeitsprinzip der Tracking-Software	103
8.13.2	Verwendete Algorithmen und Leistungsüberprüfung der Software	104
8.13.2.1	Partikeldetektionsalgorithmen	105
8.13.2.2	Bestimmung von Trajektorien mittels eines deterministischen Ansatzes	106

Inhaltsverzeichnis

8.13.2.3	Bestimmung von Trajektorien mittels eines Wahrscheinlichkeitsansatzes	106
8.13.2.4	Experimentelle Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Tracking-Algorithmen	107
8.14	Initiale Experimente zu einem <i>in vitro</i> Fusionssystem auf Basis von <i>Giant Unilamellar Vesicles</i>	108
8.14.1	Eignung von FCS zur Detektion von Viruspartikeln	110
8.14.2	Phosphatidylserin-abhängige Virusbindung an GUVs.....	112
8.14.3	Messung von (subviralen) Partikeln im Lumen von GUVs mittels FCS.....	113
8.14.4	Messung der Fusion in Ensembleexperimenten durch R18-Dequenching	115
8.14.5	Experimente zur Fusion von R18-markierten Viruspartikeln mit GUVs	117
9	Diskussion.....	119
9.1	Produktion zweifarbiger Viruspartikel und ihre Charakterisierung	119
9.2	Untersuchung des Bindungsverhaltens von HI-Viren an die Zielzelle	122
9.3	Verbesserungen zur Detektion von Farbtrennungseignissen	124
9.4	Experimente mit VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln	126
9.5	Partikelstabilität der fluoreszenzmarkierten Viruspartikel.....	130
9.6	Alternative Fluoreszenzmarkierungen für HI-Viruspartikel.....	134
9.7	Entwicklung einer Tracking-Software zur Detektion von Viruspartikeln	136
9.8	Liposomen als kontrolliertes <i>in vitro</i> Fusionssystem	138
9.9	Fazit und Ausblick	141
10	Literaturverzeichnis	143
11	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	153
12	Danksagung.....	155

1 Veröffentlichungen

Publikationen

Marko Lampe, John A.G. Briggs, Thomas Endress, Bärbel Glass, Stefan Riegelsberger, Hans-Georg Kräusslich, Don C. Lamb, Christoph Bräuchle, Barbara Müller, “Double-labelled HIV-1 particles for study of virus-cell interaction”, *Virology*, 360(1), 92-104, 2007

Thomas Endress, **Marko Lampe**, John A.G. Briggs, Hans-Georg Kräusslich, Christoph Bräuchle, Barbara Müller, Don C. Lamb, “HIV-1-Cellular Interactions Analyzed Dual-Color Single Virus Tracing”, Manuskript in Vorbereitung

William J. Godinez, **Marko Lampe**, Stefan Wörz, Barbara Müller, Roland Eils, Karl Rohr, “Deterministic and Probabilistic Approaches for Tracking Virus Particles in Time-lapse Fluorescence Microscopy Image Sequences”, Manuskript in Vorbereitung

Publikationen in Konferenzbänden

William J. Godinez, **Marko Lampe**; Stefan Wörz, Barbara Müller, Roland Eils, Karl Rohr, (2007), „Tracking of Virus Particles in Time Lapse Fluorescence Microscopy Image Sequences“, *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2007. ISBI 2007. 4th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, pp.256-259, 12-15 April 2007

William J. Godinez, **Marko Lampe**; Stefan Wörz, Barbara Müller, Roland Eils, Karl Rohr (2007), „Tracking of Virus Particles in Time-lapse Fluorescence Microscopy Image Sequences“, *Proc. Workshop Bildverarbeitung für die Medizin 2007 -- Algorithmen, Systeme, Anwendungen --*, München/Germany, Informatik aktuell, A. Horsch, H. Handels, H.-P. Meinzer, and T. Tolxdorff (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007, pp.6-10, March 25-27, 2007

William J. Godinez, **Marko Lampe**; Stefan Wörz, Barbara Müller, Roland Eils, Karl Rohr (2008), „Tracking of Virus Particles in Time-lapse Fluorescence Microscopy Image Sequences“, *Proc. Workshop Bildverarbeitung für die Medizin 2008 -- Algorithmen, Systeme, Anwendungen --*, München/Germany, Informatik aktuell, A. Horsch, H. Handels, H.-P. Meinzer, and T. Tolxdorff (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008, April 6-8, 2008 (*im Druck*)

Vorträge

“Rapid events in HIV-1 entry analyzed by dual-color single virus tracing”, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Hannover, 2005

“Analysis of HIV-1 entry by real time microscopy and automated tracking of dual coloured virus like particles”, Workshop für Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Zeilitzheim, 2004

Posterpräsentationen

Marko Lampe, William J. Godinez, John A.G. Briggs, Bärbel Glass, Stefan Wörz, Don C. Lamb, Christoph Bräuchle, Roland Eils, Karl Rohr, Hans-Georg Kräusslich, Barbara Müller, “Analysis of HIV-1 entry by real time microscopy and automated tracking of dual coloured virus like particles”, Frühjahrstreffen der Deutschen Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 58th Mosbacher Kolloquium, Mosbach, 2007

Marko Lampe, John A.G. Briggs, Thomas Endress, Bärbel Glass, Maik Lehmann, Don C. Lamb, Christoph Bräuchle, Hans-Georg Kräusslich, Barbara Müller, “Dual-coloured HIV-1 virus like particles for live cell microscopy analyses”, Retroviruses, Cold Spring Harbour, 2006

Marko Lampe, Barbara Müller, Thomas Endress, John A.G. Briggs, Maria Anders, Bärbel Glass, Don C. Lamb, Christoph Bräuchle, Hans-Georg Kräusslich, “Dual-coloured HIV-1 virus like particles for live cell microscopy analyses”, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, München, 2006

Marko Lampe, Thomas Endress, Barbara Müller, Bärbel Glass, Don C. Lamb, Christoph Bräuchle, Hans-Georg Kräusslich, “Visualization of rapid events in HIV-1 entry using dual-color single virus tracing”, Workshop für Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Deidesheim, 2005

2 Abkürzungsverzeichnis

α -(Name)	Antikörper gerichtet gegen (Name)
μ	Mikro
A	Absorption (bei Lichtmessung) oder Ampere (Stromstärke - bei elektrischen Schaltungen)
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CA	Kapsidprotein
ca.	circa
cDNA	Komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CFP	Cyan-fluoreszierendes Protein (engl.: <i>cyan fluorescent protein</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-(Phospho-L-Serin)
engl.	englisch
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Env	Virales Hüllprotein, Genprodukt des viralen env-Gens
ER	Endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	und andere
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
Gag	Genprodukt des viralen gag-Gens
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (engl.: <i>green fluorescent protein</i>)
h	Stunde(n) (bei Zeitangaben) oder human (Herkunft von Proteinen etc. – dem Wort vorangestellt)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HPSG	Heparansulfat-Proteoglykane
Hz	Hertz
kb	Kilobasen
k	Kilo
Da	Dalton

Abkürzungsverzeichnis

l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LTR	Endsequenzen des proviralen Genoms (engl.: <i>long terminal repeats</i>)
m	Milli
M	Molar (mol/l)
MES	2-(N-morpholin)ethansulfonsäure
μ	Micro
MA	Matrixprotein
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
n	Nano
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
Primer	Starter-Oligonukleotid (z.B. bei der PCR)
rel.	relative(s)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodiumdodecylsulfate</i>)
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Trisacetat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (engl.: <i>Unit</i>)
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VSV-G	Glykoprotein des Vesikuläres Stomatitis Virus
w	Gewicht (engl.: <i>weight</i>)
wt	Wildtyp
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein (engl.: <i>yellow fluorescent protein</i>)
z.B.	zum Beispiel

3 Zusammenfassung

Der erste Schritt einer Humanen Immunodefizienz Virus (HIV)-Infektion ist die Fusion des Virus mit der Plasmamembran der Zielzelle. Eine Blockade dieses Schritts, z.B. durch Medikamente, verhindert eine Neuinfektion von Zellen im menschlichen Organismus. Für die Entwicklung neuer Medikamente ist ein genaueres Verständnis der Fusionsreaktion erforderlich.

Die bisherigen Analysen der Fusionskinetik beruhen nahezu ausschließlich auf biochemischen und virologischen Ensemblemessungen, die nur eine vergleichsweise geringe Zeitauflösung (im Minutenbereich) ermöglichen. Außerdem bedürfen diese Experimente einer artifiziellen Synchronisation des Ablaufs (z.B. Virusbindung an die Wirtszelle bei 4°C). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Virus-Zell-Fusionsreaktion fluoreszenzmikroskopisch in Echtzeit auf Einzelpartikelebene zu beobachten und deren Kinetik zu analysieren. Dazu wurden Viruspartikel verwendet, deren Hülle und Kern mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren markiert waren (MA.eGFP und mRFP1.Vpr). Das infektiöse, reife HI-Virus besteht aus einer Lipidhülle assoziiert mit Matrixproteinen (MA) und einem inneren Kapsid, das u.a. das virale RNA-Genom und das akzessorische Protein Vpr enthält. Bei Fusion sollte sich das Matrixprotein vom verbleibenden subviralen Partikel trennen, was als Farbtrennungseignis im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden sollte. Darüberhinaus könnte der Transport des subviralen Partikels über mRFP1.Vpr im Zytosol weiter verfolgt werden. Basierend auf dieser Strategie sollte ein experimentelles System etabliert werden, das die Beobachtung einzelner Fusionsereignisse in Echtzeit auflöst.

Die Charakterisierung der doppelt fluoreszenzmarkierten Viruspräparationen zeigte, dass die Virussuspension monodispers war und die Viruspartikel einen hydrodynamischen Durchmesser von ungefähr 170 nm besaßen. Die fluoreszenzmarkierten Viruspartikel waren zu über 90 % zweifarbig und wiesen eine um 80 % reduzierte Infektiosität im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Fusionskompetenz war jedoch nicht beeinträchtigt. Die biochemische Analyse ergab, dass die Inkorporation von mRFP1.Vpr in die Viruspartikel die Prozessierung des Gag-Polypeptids und damit eventuell die Virusreifung leicht beeinträchtigte.

Die Beobachtung der Interaktion der fluoreszenzmarkierten Viruspartikel mit der Zellmembran von adhärennten Modellzelllinien wie HeLaP4 erfolgte durch Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie. Als störend für die mikroskopische Analyse erwies sich eine starke Virusanheftung an den Adhäsionsfaktor Heparansulfat auf der Zelloberfläche. Es konnte gezeigt werden, dass der Beitrag von Heparansulfat auf die Infektiosität nur gering war. Daher wurde Heparansulfat in den folgenden Experimenten durch enzymatische Behandlung von der Zelloberfläche entfernt.

Mehr als 10.000 Trajektorien von HIV-Partikeln, die an die Wirtszelle gebunden waren oder diese berührten, wurden manuell analysiert, aber es konnte kein Farbtrennungseignis detektiert werden. Zur verbesserten und beschleunigten Datenauswertung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karl Rohr (Biomedical Computer Vision Gruppe, IPMB, Abteilung Bioinformatik & Funktionelle Genomik, Universität Heidelberg) eine Tracking-Software entwickelt.

Um die Wahrscheinlichkeit der Detektion eines Fusionsereignisses zu erhöhen, wurden hochfusogene VSV-G pseudotypisierte Viruspartikel eingesetzt. Im Gegensatz zur vom HIV-Hüllprotein vermittelten Fusion an der Plasmamembran fusionieren die pseudotypisierten Viruspartikel im sauren Milieu des Endosoms. Mit den VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln gelang es ein Farbtrennungseignis zu detektieren, das den Erwartungen für eine Fusion entsprach. Die Analyse des Farbtrennungseignisses ergab, dass das Partikel nach der Farbtrennung eine gerichtete Bewegung ausführte, die auf die Interaktion des

potentiell subviralen Partikels mit Motorproteinen hinweist. Obwohl nur dieses eine Farbtrennungseignis direkt mikroskopisch nachweisbar war, konnte indirekt in den Zellen eine effiziente Fusion der VSV-G pseudotypisierten Viruspartikel gezeigt werden. Die Zellen zeigten nach Inkubation mit den Viruspartikeln im Zytosol eine diffuse Färbung hervorgerufen durch MA.eGFP, während im Zellkern eine diffuse mRFP1.Vpr-Fluoreszenz zu detektieren war. Eine mögliche Ursache für die schwierige Detektion von einzelnen Fusionsereignissen könnte die experimentell nachgewiesene Stabilisierung der Viruspartikel durch inkorporiertes mRFP1.Vpr sein, die eine Trennung von Matrix und Viruskapsid beeinträchtigte.

Parallel wurde die Entwicklung eines *in vitro* Fusionssystems, basierend auf der Fusion von VSV-G pseudotypisierten fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln mit rekonstituierten Liposomen, in deren Lipidmembran Phosphatidylserin integriert war, begonnen. Die Viruspartikel wurden mit großen Liposomen (GUVs, *giant unilamellar vesicles*), die aufgrund ihres Durchmessers von 20-50 μm eine zellähnliche Membrankrümmung aufweisen, inkubiert und auf eine mögliche Virusfusion mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und R18-Dequenching analysiert. In den durchgeführten Experimenten wurden jedoch keine Fusionsereignisse mit GUVs detektiert.

In dieser Arbeit wurden die technischen Grundlagen für eine effiziente Detektion von Virus-Zell-Interaktionen durch Etablierung der Mikroskopie- und Auswertetechnik geschaffen. Die hierfür entwickelte Tracking-Software erlaubt eine schnelle und quantitative Auswertung großer Experimentreihen. Die dazu notwendigen zweifarbig fluoreszenzmarkierten Viruspartikel wurden ausführlich charakterisiert, so dass zukünftig die Fusion auf Einzelpartikelebene mit verbesserten Systemen effizienter untersucht werden kann.

4 Summary

The initial step of a human immunodeficiency virus (HIV) infection is the fusion of the virus with the plasma membrane of the host cell. The infection of new cells is abrogated if this step is blocked. Extending the knowledge of the fusion reaction is essential for the development of new drugs.

The current information about fusion kinetics relies mainly on biochemical and virological bulk measurements. These assays only allow a low temporal resolution (in the minute scale). Additionally, these experiments need to be artificially synchronized (e.g. by prebinding of the virus at 4°C).

The aim of this work was to study the virus-cell-fusion on the single particle level in real time using fluorescence microscopy techniques. Therefore a double labelling strategy was developed. One label was attached to the viral membrane (MA.eGFP) and the other was located in the viral core structure (mRFP1.Vpr). The infectious, mature HI-Virion consists of a lipid membrane and an attached matrix (MA) layer and an inner Capsid structure bearing e.g. the RNA genome and the accessory protein Vpr. These two markers should separate at the time of viral fusion and the fusion should therefore be detectable as a colour separation event using fluorescence microscopy. The tracking of the subviral particle only labelled with mRFP1.Vpr should allow to get new insights into its intracellular transport. Based on this strategy, an experimental system should be established allowing the detection of single virus fusion events with the host cell.

The characterization of the virus preparations showed that the virus suspension consisted of a single species with a hydrodynamic diameter of approx. 170 nm. More than 90% of the particles were double labelled and the infectivity was reduced by 80%. The fusion competence was equal to the wildtype. Biochemical analysis revealed that the incorporation of mRFP1.Vpr into the viral particle reduced the cleavage of the Gag-polyprotein and therefore might interfere slightly with particle maturation. The virus-cell-interaction at the plasma membrane of adherent model cell lines like HeLaP4 was studied by real time fluorescence microscopy. The binding of many virus particles at the plasma membrane mediated by the adhesion factor heparan sulfate complicated the microscopic analysis. Since it could be shown that this immobilization was not essential for productive infection, heparan sulfate on the cell surface was removed by enzymatic treatment in the following experiments. More than 10,000 trajectories of HIV-particles touching the cell or bound to the host cell were manually analyzed, but no event of colour separation was observed. In order to improve the accuracy and speed of data analysis, a tracking software was developed in collaboration with the group of Prof. Dr. Karl Rohr (Biomedical Computer Vision Group, IPMB, Abteilung Bioinformatik & Funktionelle Genomik, Universität Heidelberg).

To increase the probability of viral fusion, highly fusogenic VSV-G pseudotyped viral particles were used. In contrast to the HIV envelope protein mediated fusion at the plasma membrane these pseudotyped particles fuse in the acidified endosome. One colour separation event fulfilling the expected criteria for membrane fusion could be detected and analyzed. The directed movement of the potential subviral particle after colour separation indicated the involvement of motor proteins. Although only one colour separation event could be directly observed, an efficient fusion could be microscopically proven by the detection of a fusion dependent diffuse staining of the cytoplasm in the colour of the MA-label. At the same time, the nucleus was coloured diffusely by the Vpr-label. The possible cause for the difficulties observing single fusion events might be the experimentally detected stabilization of the virus particle by incorporated labelled Vpr, impairing the separation of the MA-layer and the viral core at the time point of fusion.

Experiments to develop an *in vitro* fusions system based on VSV-G pseudotyped particles and reconstituted liposomes containing phosphatidylserine were done in parallel. VSV-G

Summary

pseudotyped, fluorescently labelled virus particles were incubated with giant unilamellar vesicles (GUVs) and analyzed for potential virus fusion by fluorescence correlation spectroscopy and R18 dequenching. GUVs have a diameter of 20-50 μm and therefore a membrane curvature comparable to cells. The accomplished experiments did not lead to a detectable fusion with GUVs.

In this thesis an experimental system for the analysis of HIV-cell interaction dynamics was established and characterized and the technical requirements for data acquisition and analysis were implemented. Problems generated by the labelling strategy were investigated and alternative strategies evaluated. This lays the foundation to investigate the viral fusion reaction on the single particle level with a more efficient system in the future.

5 Einleitung

5.1 Das HI-Virus und AIDS

Das Humane Immunodefizienz Virus (HIV) verursacht das erworbene Immunodefizienz-Syndrom AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*). Nach Angaben der Vereinten Nationen waren im Jahr 2006 ca. 39,5 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert, darunter 2,3 Millionen Kinder unter 15 Jahren. Es gab 4,3 Millionen Neuinfektionen und 2,9 Millionen Menschen sind im vergangenen Jahr an dieser weltweiten Pandemie gestorben. Bis heute war AIDS die Todesursache von 25 Millionen Menschen (Internetquelle 1). Die medikamentöse Behandlung von AIDS führt nicht zu einer Heilung, kann aber das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen oder verhindern. Bis heute steht keine vorbeugende Impfung zur Verfügung.

Die Infektion erfolgt meist über sexuellen Kontakt oder direkten Blut-Blut Kontakt z.B. durch gemeinsamen Gebrauch von Spritzenutensilien, durch Transfusionen von Blut oder Blutprodukten und durch Übertragung des Virus von einer Mutter auf ihr Kind während der Schwangerschaft, der Geburt oder Stillzeit. Das Ansteckungsrisiko durch Transfusionen und durch Mutter-Kind-Übertragungen ist in den Industrieländern aufgrund geeigneter Vorsorgemaßnahmen gering (Prendergast *et al.*, 2007). Infektionen durch Stichverletzungen mit Nadeln oder Kontakt von Schleimhäuten und offenen Wunden mit infiziertem Blut im Gesundheitswesen sind aufgrund der geringen Virulenz des Erregers verglichen mit anderen parental übertragenen Erregern z.B. dem Hepatitis-C-Virus (HCV) oder dem Hepatitis-B-Virus (HBV) weniger häufig. Wenn ein Kontakt mit dem Virus stattgefunden hat, besteht die Möglichkeit einer vorbeugenden medikamentösen Behandlung (Postexpositionprophylaxe), die zu über 90 % eine Ansteckung verhindert (Almeda *et al.*, 2004) (Internetquelle 2).

Es gibt zwei Typen von HI-Viren, HIV-1 und HIV-2, die nach heutigen Erkenntnissen wahrscheinlich beide von Primaten auf den Menschen übertragen wurden. HIV-1 entstand vermutlich durch mehrere unabhängige Übertragungen von SIV (engl. *Simian Immunodeficiency Virus*, Affenimmunodefizienzvirus) oder einem nahe verwandten Virus von Schimpansen (*Pan troglodytes*) auf den Menschen. Dabei könnten sich die HIV-Subtypen M, N und O gebildet haben. Bei Subtyp O ist auch eine Übertragung von einem Gorilla in der Diskussion (Schindler *et al.*, 2006; Van Heuverswyn *et al.*, 2006; Van Heuverswyn und Peeters, 2007). HIV-2 ist weniger pathogen und entstammt wahrscheinlich dem Kontakt zwischen Menschen und Mangaben (*Cercocebus atys*) (Janeway und Travers, 1997). Im

Folgendes wird nur das in Europa und Nordamerika stärker verbreitete HIV-1, das auch Gegenstand dieser Arbeit ist, behandelt.

Die initiale Infektion mit dem HI-Virus verläuft asymptomatisch oder mit grippeähnlichen Symptomen. Nach Eintritt des Virus in den Körper (z.B. durch Blutkontakt) zirkuliert es in der Blutbahn des Infizierten und befällt vornehmlich CD4-T-Zellen. Diese als akute Virämie bezeichnete Phase führt zu einer Abnahme CD4-T-Zellen und im Normalfall zu einer Aktivierung der CD8-T-Zellen. Die meisten infizierten CD4-T-Zellen werden in dieser Phase abgetötet, so dass die Zahl an CD4-T-Zellen stark abfällt. Während dieser Zeit findet auch eine spezifische Antikörperproduktion gegen virale Proteine statt. Die CD4-T-Zellzahl steigt danach wieder auf fast normale Werte an und die Viruslast reduziert sich deutlich. Nun kommt es in den meisten Fällen zu einer Phase ohne Symptome (auch asymptomatische oder latente Phase genannt), während dieser die Viruslast auf niedrigem Niveau verweilt. Allerdings kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme der CD4-T-Zellen. HIV repliziert auch in CD4-positiven Monocyten und Makrophagen. In diesen sog. Reservoirs ist das Virus für therapeutische Ansätze bis heute schwer bis gar nicht zugänglich (Übersicht in (Simon und Ho, 2003)). Die latente Phase kann mehrere Jahre dauern.

Nach der latenten Phase folgt eine Phase, in der sich das Vollbild AIDS ausprägt und opportunistische Infektionen auftreten, da das Immunsystem durch den Verlust an CD4-T-Zellen stark geschwächt ist. Hierzu zählen die AIDS typischen Infektionen wie orale Candidiasis, Cytomegalovirus-Retinitis, interstitielle Pneumonie, aber auch bestimmte Krebsformen wie das Kaposi-Sarkom, ausgelöst durch eine Herpesvireninfektion (HHV-8). In dieser Phase steigt auch die Viruslast wieder an. Schließlich verstirbt der Patient aufgrund eines geschwächten Immunsystems, das nicht mehr in der Lage ist, auch leichte Erkrankungen erfolgreich abzuwehren oder zu kontrollieren.

Der Krankheitsverlauf kann durch medikamentöse Behandlung verlangsamt werden, so dass die Viruslast des Patienten über Jahre niedrig bleibt. Besonders die HAAR-Therapie (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) hat einen positiven Einfluss auf eine verlängerte Überlebenszeit der Patienten bei reduzierten Nebenwirkungen (Palella *et al.*, 1998), die jedoch immer noch ein Problem in der Behandlung darstellen. HAART ist eine Kombinationstherapie, bei der Inhibitoren aus verschiedenen Wirkstoffklassen (in der Regel zwei Reverse-Transkriptase-Inhibitoren und ein Proteaseinhibitor) eingesetzt werden. Die gleichzeitige Verabreichung mehrerer Medikamente reduziert die Wahrscheinlichkeit der Bildung resistenter Viren gegen einen oder mehrere der eingesetzten Inhibitoren. Zurzeit stehen im klinischen Bereich mehrere nukleosidische und nicht-nukleosidische Reverse-

Transkriptase-Inhibitoren (NRTI bzw. NNRTI), Proteaseinhibitoren (PI) und der Fusionsinhibitor T-20 (Fuzeon) zur Verfügung. Weiterhin wurde der Korezeptorantagonist Maraviroc im Jahr 2007 zur klinischen Verwendung zugelassen. Die Entwicklung von Resistenzen gegen die eingesetzten Medikamente ebenso wie das Vorhandensein von unzugänglichen Virusreservoirs verhindern bisher eine Heilung (Orenstein *et al.*, 1988).

5.2 Der Aufbau des HI-Virus

HIV gehört zur Familie der Retroviren (*Retroviridae*). Diese Viren enthalten ein +-Strang RNA-Genom, das durch die reverse Transkription in doppel-strängige DNA umgeschrieben wird. Die Retroviren sind in sieben Genera unterteilt: α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren, Spuma- und Lentiviren. HIV gehört zu den Lentiviren (lat. *lentus*: langsam). Diese zeichnen sich durch eine langsame und graduell verlaufende Krankheitsentwicklung aus (Flint *et al.*, 2004). HI-Viren weisen einen Durchmesser von ca. 145 nm auf und sind von einer von der Wirtszelle stammenden Lipidmembran umhüllt (Briggs *et al.*, 2004; Briggs *et al.*, 2003). In dieser Hülle ist das Hüllprotein Env integriert. Unterhalb der Lipidmembran ist beim reifen Virus eine Schicht aus Matrix-Proteinen (MA) lokalisiert. Im Inneren befindet sich das Kapsid, das aus dem Kapsid-Protein (CA) gebildet wird. Das Kapsid hat bei Lentiviren eine konische Form (Gelderblom *et al.*, 1987) und berührt mit beiden Enden die Matrixschicht (Briggs *et al.*, 2006). Im Inneren des Kapsids befinden sich das HIV-Genom und weitere virale und zelluläre Proteine.

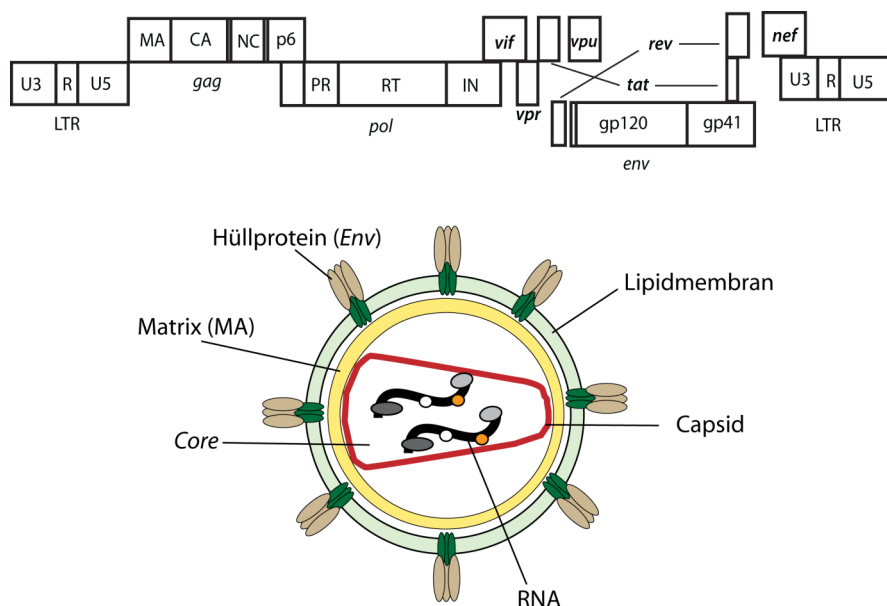


Abbildung 1: Das offene Leseraster von HIV (oben) und eine schematische Darstellung des Virions (unten).

Das HIV Genom ist ca. 9,7 kb groß (Abbildung 1) und kodiert für strukturelle und nicht-strukturelle Proteine. Vom 5' zum 3' Ende findet man *gag*- (für **Gruppen-Spezifisches-Antigen**), *pol*- (für **Polymerase**) und *env*- (für *envelope* – engl. Hüllprotein) Leseraster. Weitere Leseraster kodieren für die Proteine Vif, Vpr, Vpu, Nef und Tat. Die kodierenden Sequenzen werden am 5'- und 3'-Ende von regulatorischen Kontrollsequenzen (LTR: *long terminal repeat*) flankiert, die auch für die reverse Transkription und die Integration der Virus-DNA in das zelluläre Genom notwendig sind.

Vom *gag*-Gen wird das strukturbildende Polyprotein Pr55^{Gag} gebildet, das von der viralen Protease (PR) während der Virusreifung in Matrix (MA oder p17), Kapsid (CA oder p24), Nukleokapsid (NC oder p7) und p6 gespalten wird. Zusätzlich werden bei der proteolytischen Spaltung von Pr55^{Gag} noch zwei Peptide, SP1 und SP2 (auch *spacer peptides* genannt), gebildet. Die im *pol*-Leseraster kodierten Proteine werden als Pr160^{GagPol} Vorläufer gebildet, die das Ergebnis einer seltenen Leserasterverschiebung während der Translation sind. Die im *pol*-Leseraster kodierten Enzyme, virale Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN), werden durch Spaltung des Vorläufers Pol durch die virale Protease hergestellt, wobei sich die virale Protease autokatalytisch aus dem Vorläuferprotein schneiden kann (Freed, 2001).

Die Anzahl der Gag-Proteine wurde mittels Cryo-Elektronenmikroskopie auf ca. 5.000 Moleküle je Virion geschätzt (Briggs *et al.*, 2004; Briggs *et al.*, 2003). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Gag-Hülle nicht vollständig ist, wie es obigen Berechnungen zu Grunde liegt, sondern nur zu 40-60 % (Wright *et al.*, 2007) (und persönliche Kommunikation mit John Briggs). Bei Annahme einer zu 50 % vollständigen Gag-Hülle ergeben sich nach den in (Muller *et al.*, 2000) angegebenen Verhältnissen der viralen Proteine zueinander folgende Mittelwerte pro Viruspartikel: ca. 2.500 Moleküle Gag (entsprechend MA und CA), ca. 380 Moleküle Vpr und ca. 50 Moleküle Integrase.

Das im *env*-Leseraster kodierte Protein, das Hüllprotein (Env), welches das glykosylierte Hüllprotein des Virus ist, wird ebenfalls als Polyprotein synthetisiert und – anders als die Gag- und Pol-Vorläuferproteine – von zellulären Furin oder furinähnlichen Proteasen gespalten. Die Spaltung des Env-Vorläuferproteins resultiert in der Bildung des Oberflächen-Env-Glykoproteins gp120 und dem transmembranen Glykoprotein gp41. gp120 vermittelt die Interaktion des Virus mit den zellulären Rezeptoren beim Viruseintritt und gp41 verankert den über Disulfidbrücken verbundenen gp41/gp120-Komplex in der Virusmembran. Die Beteiligung von gp41 an der Fusion von viraler und zellulärer Lipidmembran während des

Viruseintritts ist essentiell (Freed, 2001; Freed und Martin, 1995). gp120 ist in fünf konservierte (C1-C5) und fünf hochvariable Regionen (V1-V5) unterteilt. gp41 ist in drei Domänen gegliedert: die Ectodomäne, welche essentielle Motive für die Membranfusion enthält, die transmembrane Ankerdomäne und die zytoplasmatische Domäne.

Zusätzlich zu Gag, Pol und Env besitzt HIV als komplexes Retrovirus noch eine Reihe von regulatorischen und akzessorischen Proteinen. Tat ist notwendig für eine effiziente Transkription des durch die LTR flankierten viralen Genoms und Rev ist für den Export viraler RNA vom Nukleus in das Zytoplasma wichtig. Vpu, Vif, Vpr und Nef sind akzessorische oder „Hilfs-“Proteine, die nicht unter allen Bedingungen (insbesondere in Zellkultur) für die Virusreplikation nötig sind. Vpu scheint eine Rolle bei der Virusfreisetzung zu spielen (Neil *et al.*, 2006). Vif verhindert die Restriktion des Virus durch das zelluläre APOBEC-Protein (Mariani *et al.*, 2003; Schrofelbauer *et al.*, 2004). Nef reduziert u.a. die Oberflächenkonzentration des CD4-Rezeptors auf infizierten Zellen (Geyer *et al.*, 2001). Außerdem wurde beobachtet, dass Patienten, die mit einem Nef-defizienten Virus infiziert sind, einen verlangsamten, weniger schweren Krankheitsverlauf aufweisen (Balog und Minarovits, 2006; Schrofelbauer *et al.*, 2004). Auf Vpr wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

5.3 Das Virale Protein R (Vpr)

Das Virale Protein R (Vpr) ist ein basisches Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 14 kDa (96 Aminosäuren). Es ist in HIV-1, HIV-2 und SIV stark konserviert. Vpr wird während der Virusproduktion über eine Interaktion mit p6^{Gag} in das Virion verpackt (Accola *et al.*, 1999; Bachand *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2001; Selig *et al.*, 1999). Nach Spaltung des Gag-Polypeptids zeigt Vpr eine höhere Affinität für NCp7 als für p6 (de Rocquigny *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 2001; Selig *et al.*, 1999). Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass Vpr nach der Reifung im Gegensatz zu p6 im Kapsid zu finden ist (Welker *et al.*, 2000) und dort mit der RNA, NCp7 und evtl. MA interagiert (de Rocquigny *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 2000; Selig *et al.*, 1999). Vpr verbleibt nach der Fusion zumindest teilweise am Komplex der Reversen Transkription und am Präintegrationskomplex (Bukrinsky und Adzubei, 1999; Cullen, 2001; Fassati und Goff, 2001; Fassati *et al.*, 2003; Fouchier und Malim, 1999; McDonald *et al.*, 2003; Nermut und Fassati, 2003). Vpr zeigt karyophile Eigenschaften. Es bindet, wenn es allein in der Zelle exprimiert wird, an die Kernpore und bildet einen Ring um die Kernmembran, der mittels Immunofluoreszenz detektiert werden kann (Depienne *et al.*, 2000; Kamata und Aida, 2000; Vodicka *et al.*, 1998; Waldhuber *et al.*, 2003). Vpr-

Fusionsproteine (mit BSA, β -Galaktosidase oder GFP) können in den Kern transportiert werden, obwohl Vpr kein klassisches Kernlokalisierungssignal besitzt (Di Marzio *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 1998; Karni *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1993; Mahalingam *et al.*, 1997; Subbramanian *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998). Dies deutet auf eine Beteiligung von Vpr an der Bindung des Präintegrationskomplexes an die Kernpore und evtl. an der Translokation desselben in den Zellkern hin (Le Rouzic und Benichou, 2005). In sich nicht teilenden Zellen erhöht Vpr den Transport viraler DNA in den Kern (Connor *et al.*, 1995; Heinzinger *et al.*, 1994).

Weitere Funktionen von Vpr sind: (I) Arretierung von T-Zellen in der G2-Phase der Mitose durch vom Virus eingebrachtes Vpr (de Noronha *et al.*, 2001; Jowett *et al.*, 1995; Planelles *et al.*, 1996; Poon *et al.*, 1998; Subbramanian *et al.*, 1998), (II) Erhöhung der transkriptionellen Aktivität der LTR in arretierten T-Zellen (Gummuluru und Emerman, 1999; Hrimech *et al.*, 1999; Subbramanian *et al.*, 1998) und (III) Induktion der Apoptose (Übersicht in (Alimonti *et al.*, 2003)). Die Rolle von Vpr bei der T-Zell-Depletion in Patienten wird noch kontrovers diskutiert (Ayyavoo *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 2001).

Das Verhältnis von Vpr- zu Gag-Molekülen im Virion ist ungefähr 1:7 (Muller *et al.*, 2000), so dass ca. 350-700 Vpr-Moleküle in jedes Virion inkorporiert werden. Da Vpr auch als exogen exprimiertes Fusionsprotein in das Virion verpackt wird, kann es genutzt werden, um Proteine, die an Vpr fusioniert worden sind, in das Virion zu bringen (Conti *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1995). So konnte mit Hilfe von Vpr-Integrase-Fusionsproteinen, die in *trans* in der virusproduzierenden Zelle exprimiert wurden, die Funktionen der Integrase näher charakterisiert werden (Liu *et al.*, 1999; Padow *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1997). Vpr kann auch mit eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), einem fluoreszierenden Protein, fusioniert werden, so dass Viruspartikel und der nach Fusion gebildete subvirale Komplex in der Zielzelle fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden kann (McDonald *et al.*, 2002; McDonald *et al.*, 2003). Ebenso ist es möglich, nicht virale Enzyme wie die β -Lactamase in die Zielzelle zu schleusen und damit Virusfusion nachzuweisen.

5.4 Der HIV-Replikationszyklus

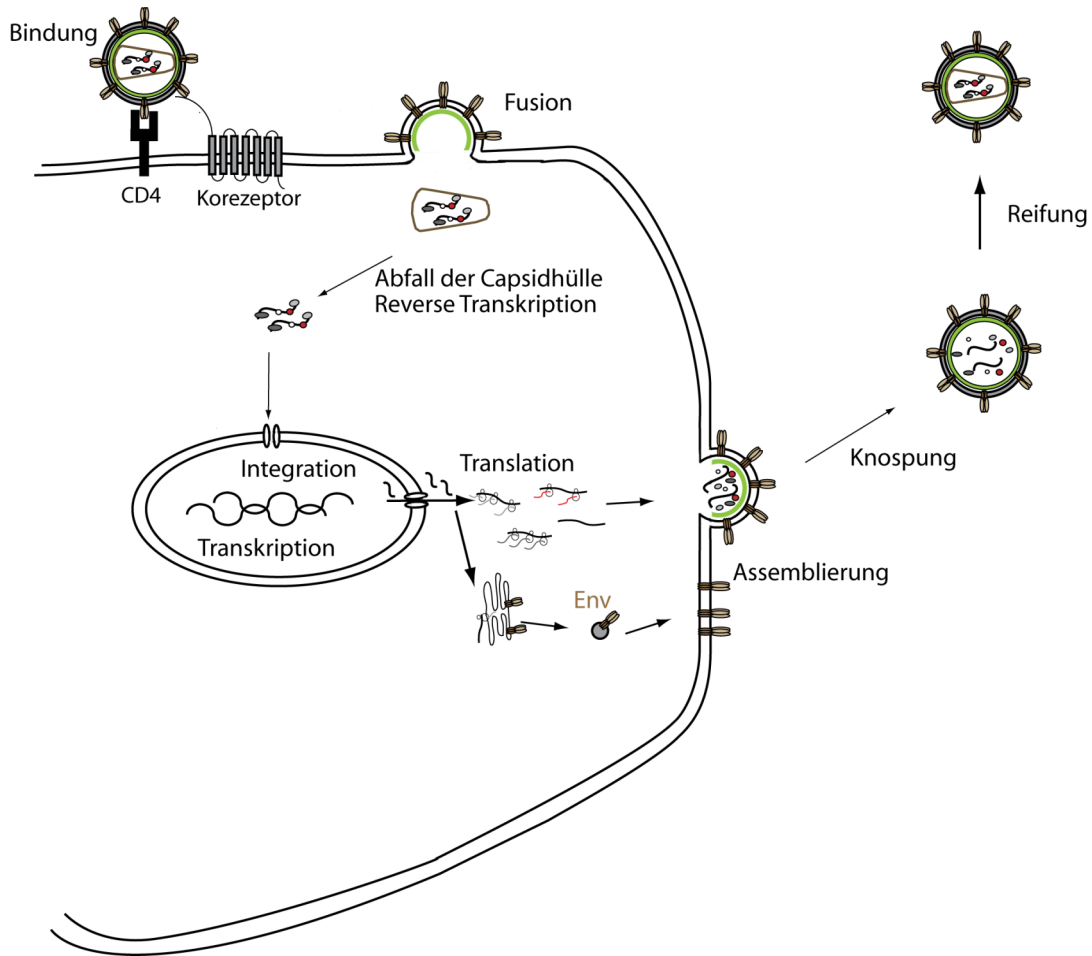


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HIV-Replikationszyklus. Das Virus bindet durch Interaktion mit dem CD4-Rezeptor an die Wirtszelle, und nach Rekrutierung eines Korezeptors erfolgt die Fusion an der Plasmamembran. Die virale RNA wird in DNA umgeschrieben und in den Kern transportiert. Dort wird die virale DNA in das Wirtsgenom integriert und die Transkription der viralen RNA beginnt. Die viralen Proteine werden im Zytosol translatiert. Schließlich formt sich an der Plasmamembran ein neues Virus, das sich von dieser abschnürt. Nach der Reifung ist ein neues, infektiöses Virion entstanden.

Die HIV-Replikation lässt sich in eine „frühe“ und eine „späte“ Phase gliedern (Abbildung 2). Die frühe Phase beginnt mit dem Viruseintritt in die Zielzelle. Da die Lipidmembranen eine stabile physikalische Barriere darstellen, ist die Fusion von Virus- und Zellmembran notwendig, um die genetische Information des Virus in die Zielzelle zu transferieren.

HIV-1 bindet zunächst über eine Interaktion zwischen Env, dessen funktionelle Struktur ein Trimer ist (Colman und Lawrence, 2003; Roux und Taylor, 2007; Weiss, 2003; Zanetti *et al.*, 2006), und dem Zelloberflächenrezeptor CD4 an die Zielzelle. CD4 allein ist jedoch nicht ausreichend, um eine Fusion der Virus- mit der Zellmembran zu ermöglichen. Zwei Mitglieder der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen fungieren als Korezeptoren für den Viruseintritt (Berger *et al.*, 1999; Doms und Peiper, 1997). Dabei handelt es sich um den α -Chemokinrezeptor CXCR4 und den

β -Chemokinrezeptor CCR5. CXCR4 wird auf T-Zellen exprimiert und CCR5 ist auf Makrophagen vorhanden. Periphere Blutmonocyten (PBMC) tragen beide Rezeptoren. Der natürliche Ligand von CXCR4 ist SDF-1, die natürlichen Liganden von CCR5 sind die Chemokine RANTES, MIP-1 α und β . CD4 ist seinerseits der Korezeptor von MHC Klasse II-Molekülen und bindet auf seiner zytoplasmatischen Seite die Kinase Lck (Janeway und Travers, 1997).

Um die Bedeutung der Korezeptoren auch in der Nomenklatur widerzuspiegeln, werden Virusstämme, die bevorzugt CXCR4 als Korezeptor nutzen als X4-trope Viren bezeichnet und Virusstämme, die CCR5 nutzen, als R5-trope Viren. Viren, die beide Rezeptoren nutzen, werden R5X4- oder Dual-trope Viren genannt.

Es gibt jedoch auch einige HI- und SI-Virusisolate, die CD4 unabhängig an die Zelle binden und mit ihr fusionieren können (Endres *et al.*, 1996). Weiterhin sind auch HI-Viren beschrieben, die andere als die oben genannten Korezeptoren benutzen. Diese haben jedoch keine klinische Relevanz (Freed, 2001). Die molekularen Details des Fusionsprozesses werden in einem gesonderten Abschnitt besprochen.

Die Schritte nach der Fusion sind biochemisch schwer zugänglich und deshalb bisher nicht vollständig verstanden. Die Analyse wird dadurch erschwert, dass nur ein Teil der Viren infektiös ist (je nach Schätzung zwischen 1:10 und 1:1.000), aber infektiöse wie nicht infektiöse Viruspartikel via Endozytose in erheblichem Umfang in die Zelle aufgenommen werden.

Bisher wird davon ausgegangen, dass nach der Fusion die Matrixhülle verloren geht und danach das Gerüst der Kapsid-Proteine, die das konische Kapsid formen, zerfällt. Es wird der Reverse-Transkriptions-Komplex (RTC, engl.: *reverse transcription complex*) gebildet. Die reverse Transkription, die Umschreibung der RNA in DNA, wird von der im RTC-Komplex befindlichen Reversen Transkriptase katalysiert. Der Prozess der reversen Transkription wird gestartet durch die Bindung von tRNA an die Primer-Bindungsstelle (PBS, engl.: *primer binding site*) in der LTR-Region der viralen RNA und führt über mehrere Zwischenstufen, in deren Verlauf ein DNA/RNA-Hybrid entsteht, zur Synthese einer doppelsträngigen DNA. Die Reverse Transkriptase besitzt keine Korrekturlesefunktion, so dass je Genomkopie etwa eine Mutation eingeführt wird (Freed, 2001). Der so entstandene Präintegrationskomplex (PIC, engl.: *preintegration complex*) mit der doppelsträngigen DNA wird in den Zellkern importiert, wo die virale DNA durch die virale Integrase in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Die genaue Zusammensetzung des PIC ist noch nicht aufgeklärt, aber es wird vermutet, dass neben der viralen DNA, Integrase und Vpr eventuell auch Nukleokapsid und

MA enthalten sind (Bukrinsky, 2004). Die in das Wirtsgenom integrierte virale DNA wird auch als Provirus bezeichnet und dient als Vorlage für die Transkription viraler RNA. Der virale Promotor, die LTR-Region, wird von zellulären Transkriptionsfaktoren erkannt und eine ineffiziente Transkription findet statt. Erst nach Bindung des viralen Tat-Proteins kommt es zu einer effizienten Transkription. Die transkribierten RNA-Spezies, über 30 an der Zahl (Fisher *et al.*, 1986), können in drei Gruppen unterteilt werden: (I) ungespleisste RNA, die die Vorläufer für Gag und GagPol darstellen und als genomische RNA in das Virion verpackt werden können, (II) partiell gespleisste RNA, die für Env, Vif, Vpu und Vpr kodieren und ungefähr 5 kb groß sind und (III) kleine, mehrfach gespleisste RNA, die in Rev, Tat und Nef translatiert werden und ungefähr 1,7 bis 2,0 kb groß sind. Den Export von un- bzw. partiell gespleissten RNAs aus dem Zellkern übernimmt das virale Protein Rev.

Die viralen mRNAs werden vom zellulären Translationsapparat im Zytosol translatiert. Die Ausnahme stellt das Env Protein gp160 dar, das am rauen Endoplasmatischen Reticulum translatiert wird. Über den sekretorischen Weg wird es zur Zelloberfläche transportiert und beim Durchgang durch den Golgi von Furin und Furin-ähnlichen zellulären Proteasen in gp120 und gp41 gespalten. Die Untereinheiten gp120 und gp41 bleiben über Disulfidbrücken verbunden und können als Trimere in die Membranhülle des Virions integriert werden. Das cytosolisch gebildete Gag-Polyprotein bindet über einen Myristylanker an die Membran, lagert sich zu größeren multimeren Komplexen zusammen und bildet die Virusknospe aus. Gag ist das hauptstrukturbildende Protein des Virus und auch ohne weitere Komponenten in der Lage virusähnliche Partikel zu formen, wenn es allein in einer Zelle exprimiert wird. Der Befund, dass Gag auch an endosomen-ähnlichen Strukturen detektiert werden kann (Pelchen-Matthews *et al.*, 2003; Sherer *et al.*, 2003), und der Nachweis von als endosomale Marker beschriebenen Proteinen in der Virusmembran, führten zu der Hypothese, dass die Freisetzung von HIV in Makrophagen an endosomalen Membranen erfolgt (Pelchen-Matthews *et al.*, 2003). Neue Erkenntnisse deuten dagegen darauf hin, dass die Freisetzung nahezu exklusiv an der Plasmamembran von T-Zellen und Makrophagen stattfindet (Deneka *et al.*, 2007; Welsch *et al.*, 2007).

Gag und weitere virale Proteine werden an die Plasmamembran rekrutiert, um ein neues Virus zu formen. Während dieses Prozesses können auch zelluläre Proteine über spezifische und unspezifische Wechselwirkungen assoziiert werden. Es formt sich eine Virusknospe an der Plasmamembran, die nur noch über einen Stiel mit der Wirtszelle verbunden ist. Schließlich sorgt der zelluläre ESCRT-Komplex (*endosomal sorting complex required for transport*) (Morita und Sundquist, 2004; von Schwedler *et al.*, 2003), der mit der p6 (*Late-Domäne*) von

Gag interagiert, für die Abschnürung des Virions. Dieser zelluläre Komplex ist für die Abschnürung von zellulären Vesikeln in das Lumen von Endosomen zur späteren Degradierung oder Freisetzung derselben verantwortlich.

Während der Abschnürung des Virions oder kurz danach spaltet die virale Protease das Gag-Polyprotein sequentiell in seine Untereinheiten: (I) Die erste Spaltung erfolgt zwischen SP1 und NC. (II) Anschließend werden die Matrix- und Kapsid-Domäne getrennt, ebenso SP2 und p6 und schließlich (III) NC-SP2 und CA-SP1 (Wieggers *et al.*, 1998). Kommt es zu keiner Reifung der Viren, so sind diese nicht infektiös. Folglich ist die virale Protease ein therapeutisches Angriffsziel, sie kann durch eine Reihe spezifischer Proteaseinhibitoren (z.B. Lopinavir) blockiert werden. Diese Inhibitoren sind Bestandteil der verbreiteten HAAR-Therapie (siehe oben).

5.5 Allgemeine Viruseintrittsmechanismen

Im folgenden Abschnitt werden verschiedenen Strategien dargestellt, die allgemein von Viren verwendet werden, um Zugang zum Zytosol der Zielzelle zu erlangen.

Zum Einbringen der genetischen Information des Virus in das Zytosol der Wirtszelle muss eine zelluläre Membran durchdrungen werden. Man unterscheidet Viren, die an der Plasmamembran fusionieren, von Viren, die zuerst in die Zielzellen endozytiert werden, um dann im Endosom zu fusionieren. Die Mehrheit der Viren nutzt die zelluläre Endozytose als Einfallstor in die Zelle, wobei die Ansäuerung im Endosom und die Protonierung des die Fusion auslösenden Proteins oft als Auslöser der Fusion genutzt wird (Smith und Helenius, 2004).

Adenoviren, nicht umhüllte DNA-Viren mit einem icosahedralen Kapsid, nutzen die Clathrin-vermittelte Endozytose, um in das Endosom zu gelangen, wo sich bei Ansäuerung die Konformation der Kapsidproteine ändert und das Virus das Endosom durch Lyse desselben verlassen kann. SV40, ein weiteres nicht umhülltes DNA-Virus, nutzt oft die Caveolin-abhängige Endozytose, um in das pH-neutrale Caveosom und später zum glatten Endoplasmatischen Reticulum zu gelangen, wo es die Membran passiert und in das Zytosol eintritt. SV40 kann aber auch nicht Caveolin- und nicht Clathrin-abhängige Endozytosewege nutzen (Damm *et al.*, 2005). Influenza-A-Viren, umhüllte negativ-strängige RNA Viren, nutzen die Clathrin-vermittelte Endozytose, um im Endosom bei Ansäuerung mit der endosomalen Membran zu fusionieren und ihr Genom ins Zytosol zu transferieren. Influenza-Viren sind ein beliebtes Modellsystem, um den Ablauf der Fusion und die Rolle der an der

Fusion beteiligten Proteine zu untersuchen (Bullough *et al.*, 1994a; Bullough *et al.*, 1994b; Chan *et al.*, 1997).

Viele Details der Eintrittswege dieser drei Viren wurden mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden aufgeklärt. In den letzten Jahren erlaubte die Verfolgung von einzelnen Viren mittels Lebendzellmikroskopie eine detaillierte Charakterisierung des zeitlichen Ablaufs der Virusendozytose und der zellulären Interaktionspartner. Die Technik, einzelne Viruspartikel mittels Fluoreszenzmikroskopie in ihrer Interaktion mit der Zelle zu verfolgen, wird Einzel(virus)partikel-Tracking (SVT, engl. für *Single Virus Tracking/Tracing*) genannt (Lakadamyali *et al.*, 2003; Lakadamyali *et al.*, 2004; Meier *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2000; Nakano und Greber, 2000; Pelkmans *et al.*, 2001; Pelkmans *et al.*, 2002; Rust *et al.*, 2004; Suomalainen *et al.*, 1999). Ein weiteres umhülltes Virus, das über Clathrin vermittelte Endozytose in die Zelle eintritt und pH-abhängig fusioniert, ist das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV).

HIV fusioniert vom pH-Wert unabhängig an der Plasmamembran. Diese Fusion ist von einer Interaktion mit zellulären Rezeptoren abhängig, die die konformationellen Änderungen im viralen Hüllprotein auslösen, damit dieses eine fusionskompetente Form einnehmen kann. HIV-1 kann aber - zumindest in HeLaP4-Zellen - auch über Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden und mit der Endosomenmembran vom pH-Wert unabhängig fusionieren (Daecke *et al.*, 2005). Die Fusion des Maus-Leukämie Virus (MLV), einem weiteren Retrovirus, erfolgt bei amphotropen ML-Viren pH-unabhängig an der Plasmamembran, hingegen nutzen ecotrope ML-Viren einen pH-abhängigen Weg über Endozytose (Andersen und Nexø, 1983; McClure *et al.*, 1990).

5.5.1 Der Mechanismus der HIV-1 Fusion an der Plasmamembran

HIV fusioniert an der Plasmamembran der Zielzelle. Hierzu bindet das Virus mit Hilfe des viralen Hüllproteins, welches sich in einer nichtfusogenen Konformation befindet, an den CD4-Rezeptor. Erst durch die Bindung des Virus an CD4 und den Korezeptor werden eine Reihe von Konformationsänderungen im Hüllprotein ausgelöst, die schließlich zur Bildung eines fusogenen Komplexes führen, der schließlich die Virus- und die Zellmembran verschmelzen lässt. Diese Konformationsänderungen bei HIV werden allein durch die Rezeptorbindung ausgelöst. Die Bindung von gp120 an CD4 führt zu einer ersten konformationellen Änderung, wobei die Bindungsstelle für den Korezeptor freigelegt wird. Durch Bindung des Korezeptors erfolgt die Bildung der aktiven Konformation von gp41 und die Spitze des Fusionspeptids inseriert in die Zellmembran. Nun wird eine Struktur aus sechs

helikalen Bündeln, analog zu der für das Fusionprotein des Influenzavirus HA beschriebenen Struktur, ausgebildet (Bullough *et al.*, 1994a; Bullough *et al.*, 1994b; Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997). Diese Struktur bringt die virale und die zelluläre Membran in räumliche Nähe, so dass diese miteinander verschmelzen.

Es gibt eine Reihe von Inhibitoren, die die Virusfusion blockieren. Eine Übersicht ist in (Este und Telenti, 2007; Leonard und Roy, 2006) zu finden. Man kann zur Zeit zwei Hauptklassen von Fusionsinhibitoren mit klinischer Potenz unterscheiden: Zur ersten Klasse gehören Inhibitoren, die versuchen, die Bildung des Sechs-Helix-Bündels (*six-helix-bundle*) zu verhindern. Hierzu gehört T20 (auch bekannt als Fuzeon oder Enfuvirtide), der erste Fusionsinhibitor mit klinischer Zulassung. Bei T20 handelt es sich um ein synthetisches Peptid, das die Ausbildung des Sechs-Helix-Bündels verhindert. Die zweite Klasse stellen die Korezeptorinhibitoren dar, die mit der Bindung des Korezeptors an den gp120-CD4-Komplex kompetitieren. Sie sind eine aussichtsreiche Inhibitorenklasse, auch wenn von einem Inhibitor jeweils nur die Bindung an einen der beiden Korezeptoren verhindert werden kann. Etliche Substanzen befinden sich in klinischen Tests. Der erste Korezeptorinhibitor, der in klinischen Tests evaluiert wurde, war AMD3100, ein CXCR4-Inhibitor. Dieser Inhibitor wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt und ist gut charakterisiert. Allerdings wurden die klinischen Tests wegen schlechter pharmakologischer Eigenschaften und Nebenwirkungen eingestellt (Leonard und Roy, 2006). Im September 2007 wurde Maraviroc, ein CCR5-Korezeptorinhibitor, für den europäischen Markt zugelassen.

5.5.2 Methoden zur Detektion der HIV-1 Fusionskinetik

Die Kinetik der HI-Virusfusion konnte bisher nur in Ensemblemessungen studiert werden. Folglich basieren die bisherigen Erkenntnisse auf Ensembleexperimenten mit ihren spezifischen Limitationen. Im Folgenden werden die wichtigsten experimentellen Systeme und ihre Grundlagen kurz dargestellt.

Grundlage für die meisten Experimente ist eine Synchronisierung der Fusion, um dieses stochastische Ereignis in einer Ensemblemessung erfassen zu können. Die meistgenutzte Möglichkeit der Synchronisation ist die Ausnutzung der Temperaturabhängigkeit der Virusfusion. Die HI-Viren werden dazu bei einer nichtfusogenen Temperatur (von 4°C bis ca. 23°C ist keine Fusion mit Zellen detektierbar (Frey *et al.*, 1995; Gallo *et al.*, 2004; Henderson und Hope, 2006; Markosyan *et al.*, 2005; Melikyan *et al.*, 2000)) an die Zielzelle gebunden und die Fusion zeitgleich durch eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C ausgelöst. Dieser artifizielle Temperatursprung kann grundsätzlich auch Auswirkungen auf zelluläre

Funktionen haben, wie Membranfluidität und Beweglichkeit von Rezeptoren in der Membran, Integrität des Zytoskeletts usw. und damit das Messergebnis gegenüber der Situation *in vivo* verändern.

Die einfachste Methode um Daten zur Fusionskinetik zu gewinnen, besteht darin, den Viren nur ein bestimmtes Zeitfenster zur Fusion zu geben. Hierzu wird die Fusion nach einem bestimmten Zeitintervall nach Infektionsstart durch Verwendung eines Fusionsinhibitors (z.B. T20 oder AMD3100) abgestoppt und die Zahl der produktiv infizierten Zellen später (24-72 h nach Infektion) analysiert. Die Genauigkeit der Messung hängt hierbei stark von der Effizienz des Inhibitors ab, die Virusfusion nach der Zugabe schnell und vollständig zu blockieren. Die Interpretation der Ergebnisse wird erschwert, wenn sich Viren in dem für den Inhibitor unzugänglichen zellulären Kompartimenten befinden und erst zu einem späteren Zeitpunkt fusionieren. Auch können Post-Fusions-Schritte, wie Reverse Transkription, Integration usw. das Messergebnis beeinträchtigen, da erst nach diesen Schritten die eigentliche Messung erfolgt.

Die weit verbreiteten Zell-Zell-Fusionassays basieren auf der Tatsache, dass Zellen, die das virale Env-Protein auf der Zelloberfläche tragen, mit Zellen, die CD4- und Korezeptor tragen, fusionieren können. Um die Bildung der Syncytien verfolgen zu können, werden die beiden Zelltypen z.B. mit unterschiedlichen organischen Farbstoffen beladen. Dieses ermöglicht die Analyse der Fusionskinetik mittels Fluoreszenzmessung auf Basis einzelner Zellpaare (im Mikroskop) und ganzer Populationen (im Fluoreszenzspektrometer) (Dimitrov *et al.*, 1991; Dimitrov *et al.*, 1992). Enzymbasierte Zell-Zell-Fusionsassays bieten meist nicht die zeitliche Auflösung, um genaue kinetische Informationen zu gewinnen (Rucker *et al.*, 1997). Die Virus-Zell-Fusion basiert auf der Verschmelzung eines ca. 145 nm im Durchmesser großen Viruspartikels mit einer Zelle. Hingegen sind bei der Zell-Zell-Fusion Membrankrümmung, Rezeptordichte, Lipidkomposition und Interaktionsfläche deutlich verändert.

Ein neuerer Ansatz, die Virus-Zell Fusion direkt zu untersuchen, nutzt das Virus als Transporter des Enzyms β -Lactamase, das als Vpr-Fusionsprotein in das Virion inkorporiert wird (Cavrois *et al.*, 2002; Cavrois *et al.*, 2004a; Cavrois *et al.*, 2004b; Munk *et al.*, 2002). Dieses Enzym kann nach erfolgter Virusfusion im Zytosol der Zielzelle ein geeignetes Substrat spalten. Im Gegensatz zu Zell-Zell-Fusionsassays ist die direkte Interaktion zwischen Virus und Zelle gegeben, und es sind keine weiteren Schritte der Virusreplikation wie die Reverse Transkription erforderlich, um eine Messung durchführen zu können. Nachteilig wirkt sich die lange Inkubationszeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff CCF2 aus, in der dieser von

der β -Lactamase gespalten wird, so dass bei Kinetiken wiederum auf Fusionsinhibitoren zur definierten Beendigung der Virusfusion zurückgegriffen werden muss.

Zahlreiche mit diesen Methoden durchgeführte Untersuchungen zur Kinetik der HIV-1 Fusion deuten darauf hin, dass zwischen initialer Virusbindung an CD4 bis zur Rekrutierung des Korezeptors eine Verzögerungs- oder *lag*-Phase von mehreren Minuten liegen könnte und somit in dieser Phase keine Fusion möglich ist. Bei Env-Proteinen, die unabhängig von CD4 und nur in Abhängigkeit vom Korezeptor mit der Zielzelle fusionieren können, ist keine Verzögerungsphase zu beobachten (Gallo *et al.*, 2006; Platt *et al.*, 2005; Raviv *et al.*, 2002).

Die meisten Fusionsstudien sind mit den oben genannten Assays und ihren spezifischen Limitationen durchgeführt worden. Bisher ist es nicht gelungen, die Fusion eines einzelnen HI-Viruspartikels mit einer Zielzelle ohne artifizielle Synchronisation kinetisch aufzulösen.

5.5.3 Adhäsionsfaktoren (*attachment factors*) von HIV-1

Die erste Interaktion eines Virus mit einer Zelle muss nicht über den primären Rezeptor erfolgen, oft unterstützen zusätzliche Adhäsionsmoleküle die Bindung. Sie führen zu einer hochaffinen Bindung an die Zelle und erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Interaktion mit dem primären Rezeptor CD4. Hierfür gibt es mehrere Beispiele, so können Virionen an LFA1 (*Leucocyte function associated antigen 1*) binden (Hildreth und Orentas, 1989), wenn sie ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), das sich auf der virusproduzierenden Zelle befand, inkorporiert haben. Dies erhöht die Infektiosität gegenüber nicht ICAM1 tragenden Viren (Cantin *et al.*, 1997; Fortin *et al.*, 1997). Diese Interaktionen sind oft spezifisch für die Arbeit mit immortalisierten Modellzelllinien und muss daher nicht notwendigerweise die *in vivo* Situation widerspiegeln. Ein weiteres Adhäsionsmoleküle dieser Gruppe ist ICAM-3 (eine Übersicht ist in (Tremblay *et al.*, 1998) zu finden).

Die Interaktion von Virus und Zelle kann auch direkt über gp120 vermittelt werden. So bindet gp120 u.a. an das Glykolipid GalCer, an den Mannose-Rezeptor oder Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG; engl. *heparan sulfate proteoglycans*).

Heparansulfat-Proteoglykane werden von einer Reihe von Protozoen, Bakterien und Viren benutzt, um an die Zelloberfläche zu binden. Diese Interaktion wird wahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen basischen Strukturen auf der Oberfläche des Mikroorganismus und den polyanionischen sulfatierten Seitenketten der HSPG vermittelt. Für HIV-1 konnte gezeigt werden, dass die Hauptinteraktion zwischen der V3-Region von gp120 (bei X4-Viren) und HSPG stattfindet. Diese Interaktion ist jedoch nur in der Tertiärstruktur als Trimer auf der Virusoberfläche ausgeprägt, lösliches monomeres gp120 zeigt diese

Interaktion nicht (Hildreth und Orentas, 1989; Mondor *et al.*, 1998; Ugolini *et al.*, 1997). T-Zelllinien weisen variierende Mengen HSPG auf der Oberfläche auf. Hingegen ist auf primären CD4-positiven T-Zellen nur sehr wenig HSPG detektierbar (Ohshiro *et al.*, 1996). Auf Epithel- und Endothelzellen (z.B. auch HeLa-Zellen und Derivate derselben) sind hohe Mengen an HSPG vorhanden (Mondor *et al.*, 1998). Die Behandlung HSPG-tragender Zellen mit Heparinase, einem Enzym, das selektiv die Heparansulfat-Zuckerketten von den Membranproteinen abspaltet, führt in den meisten experimentellen Ansätzen zu einer Reduktion der Infektiosität. Systematisch wurde diese Frage von Zhang und Kollegen (Zhang *et al.*, 2002) adressiert: Die Interaktion von gp120 und HSPG ist abhängig vom gp120-Isolat und seiner Ladung in der V3-Region. Die Effizienz der HSPG vermittelten Bindung korreliert nicht mit der Infektiosität des Virusisolats auf demselben Zelltyp. Gerade Primärisolate zeigen im Allgemeinen eine niedrigere Infektiosität bei hohen HSPG-Konzentrationen auf der Zelloberfläche.

Eine besondere Interaktion zeigen dendritische Zellen mit HIV-1. Sie exprimieren das Lectin DC-SIGN auf der Zelloberfläche, das HIV binden kann. Es scheint eine wichtige Rolle bei der Infektion von Dendritischen Zellen zu spielen, aber auch bei der Übertragung von HIV-1 an T-Zellen in *trans* (Baribaud *et al.*, 2002; Geijtenbeek und van Kooyk, 2003; Wu und KewalRamani, 2006).

5.6 Methodische Einleitung

Die Fluoreszenzmikroskopie nimmt eine bedeutende Stellung in dieser Arbeit ein, da mit dieser Technik die Interaktion von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln mit Zielzellen untersucht werden soll. Deshalb werden im Folgenden kurz die biophysikalischen Grundlagen der Fluoreszenz thematisiert und einige fluoreszierende Proteine vorgestellt. Dann werden die mikroskopischen Methoden, die in dieser Arbeit Anwendung fanden, kurz skizziert.

5.6.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Bei der Fluoreszenz wird Licht einer bestimmten Wellenlänge von einem Molekül absorbiert und anschließend wieder abgestrahlt, wobei die Farbe (Wellenlänge) des emittierten Lichtes rotverschoben ist, d.h. das Licht hat eine geringere Energie. Die Absorption von Licht, einer elektromagnetischen Welle, durch Moleküle beruht auf einer resonanten Wechselwirkung, im Gegensatz z.B. zur Lichtstreuung, einer nichtresonanten Wechselwirkung.

Bei resonanten Wechselwirkungen wird das Licht in ca. 10^{-15} s von einem geeigneten Molekül absorbiert. Die Kernabstände der Atome im Molekül können sich aufgrund der kurzen Zeit nicht ändern. Stattdessen wird ein Elektron in ein höheres Schwingungsniveau angehoben. Die Anhebung erfolgt in den ersten oder einen höheren Singulettzustand. Aus dem zweiten oder einem höheren Schwingungsniveau kehrt das Elektron durch strahlungslose Energieabgabe zuerst in den ersten Singulettzustand zurück. Dieser Prozess dauert ungefähr 10^{-12} s und wird auch als interne Konversion bezeichnet. Aus dem ersten Singulettzustand gibt es drei Wege, die wieder zum Grundzustand führen: Fluoreszenz, strahlungslose Energieabgabe und Phosphoreszenz. Bei der Fluoreszenz erfolgt die Emission eines Lichtquants nach ca. 10^{-8} s, wobei die eigentliche Emission des Lichtquants nur ungefähr 10^{-15} s dauert. Die strahlungslose Emission findet ebenfalls nach ca. 10^{-8} s statt. Der dritte Prozess ist die um bis zu 10^2 s zeitverzögerte Emission des Lichtquants, die Phosphoreszenz.

Die Effektivität der Umsetzung des Anregungs- zu Fluoreszenzlicht wird über die Quantenausbeute bestimmt. Die Quantenausbeute ist der Quotient aus emittierten zu absorbierten Photonen; der theoretische Maximalwert ist 1. (Holde *et al.*, 1998; Jameson *et al.*, 2003).

5.6.2 Fluoreszierende Proteine

Das grün-fluoreszierende Protein (GFP) wurde in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt. In diesem Organismus bildet es einen Komplex mit Aequorin, einem chemilumineszenten Protein. Das Kalzium induzierte Photoprotein Aequorin emittiert alleine blaues Licht, im Komplex mit GFP findet ein Energietransfer von Aequorin auf GFP statt, das daraufhin grünes Licht emittiert (Lippincott-Schwartz und Patterson, 2003; Palm und Wlodawer, 1999). Es hat sich herausgestellt, dass GFP bei Anregung mit blauem Licht selbst fluoresziert und hierfür keine weiteren Substrate oder Coenzyme benötigt werden. Nach der Klonierung von GFP (Prasher *et al.*, 1992) und der Optimierung der Expression in anderen Spezies entwickelte es sich zu einem nützlichen Werkzeug zur Erforschung der Lokalisation von Proteinen *in vivo*. Hierbei wird es als Hybrid mit einem Zielprotein rekombinant exprimiert. Das Zielprotein kann folglich durch das Fluoreszenzsignal des GFP lokalisiert werden (Lippincott-Schwartz und Patterson, 2003; Patterson *et al.*, 1997; Verkman, 1999). Durch zufällige und zielgerichtete Mutagenese wurden verschiedene GFP-Derivate erzeugt u.a. mit dem Ziel, die Quantenausbeute zu steigern und spektrale Varianten zu erzeugen (Tsien, 1998; Zacharias und Tsien, 2006). Hierunter sind die „verbesserten“ (*enhanced*) Varianten wie eGFP, eBFP, ein blaufluoreszierendes Protein, eYFP, das gelb fluoresziert, und viele andere.

In Abbildung 3 sind verschiedene spektrale Varianten von GFP aufgeführt. Sie sind besonders dann hilfreich, wenn mehrere Proteine gleichzeitig beobachtet werden sollen (z.B. bei Kolokalisationsexperimenten). Von den GFP-Mutanten ist besonders eGFP hervorzuheben. Es besitzt eine S65T-Mutation, wodurch eine höhere Quantenausbeute im Vergleich zu wtGFP erzielt wird. Im Gegensatz zum wtGFP, das Anregungsmaxima bei 395 nm und 475 nm hat, weist eGFP nur ein Anregungsmaximum bei 489 nm auf (Palm und Wlodawer, 1999; Patterson *et al.*, 1997). Das Emissionsmaximum liegt bei 509 nm.

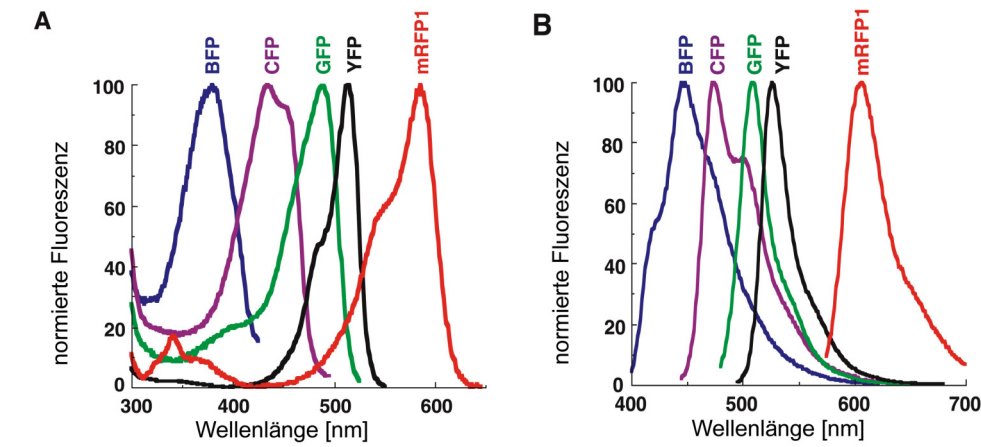


Abbildung 3: Excitations- und Emissionsspektren verschiedener fluoreszierender Proteine. (Abbildung modifiziert aus (Lippincott-Schwartz und Patterson, 2003)).

Mit den von *Aequorea* GFP abstammenden fluoreszierenden Proteinen war es jedoch nicht möglich, weiter in den roten Emissionsbereich vorzustoßen.

Aus anderen marinen Organismen (Korallen) wurden inzwischen fluoreszierende Proteine isoliert und modifiziert (Shaner *et al.*, 2005), die eine rote Fluoreszenz zeigen. Das erste rot fluoreszierende Protein konnte aus einer Koralle der Gattung *Discosoma* isoliert werden (Zacharias, 2002). Dieses Protein, DsRed, hat ein Emissionsmaximum von 583 nm. Es weist jedoch Nachteile für die praktische Anwendung auf, da es ein Tetramer ist und damit mit großer Sicherheit zur Bildung von Tetrameren der gekoppelten Fusionsproteine führt. Zusätzlich dauert die Reifung des Fluorophors selbst bei 37°C 30 h (Tsien, 1999; Zacharias, 2002). Besondere Bedeutung im biologischen Anwendungsbereich hat das monomere, schnell reifende Protein mRFP1 erlangt (Campbell *et al.*, 2002), das durch 33 Mutationen im DsRed erzeugt wurde. mRFP1 weist eine um 25 nm ins Rote verschobene Emission auf. Seine Photostabilität und Quantenausbeute sind gegenüber DsRed leicht vermindert. Dieser Nachteil konnte durch Mutagenese von mRFP1 überwunden werden, durch die das neue Fluoreszenzprotein mCherry erzeugt wurde (Shaner *et al.*, 2004).

Bisher ist es noch nicht gelungen ein Protein zu entdecken oder zu entwickeln, das ein Emissionsmaximum jenseits der 650 nm aufweist.

5.6.3 Fluoreszenzmarkierte HIV-Proteine

Es gibt eine Reihe von HIV-Proteinen, die mittels Fusion mit einem fluoreszierenden Protein, meist eGFP, der Fluoreszenzmikroskopie zugänglich gemacht wurden. Hierzu zählen Vpr, aber auch Nef (Greenberg *et al.*, 1997; Haller *et al.*, 2006) und Vpu (Neil *et al.*, 2006). Aufgrund der Tatsache, dass die Gag-kodierende mRNA Rev als Exporthilfe benötigt, war es nicht möglich, fluoreszenzmarkiertes Gag alleine effizient in Zellen zu exprimieren. Ein erster Fortschritt war die Klonierung von *synGag* (Kotsopoulou *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2000) als eGFP-Fusionprotein. Hierbei handelt es sich um ein Codon-optimiertes Gag-Protein, das Rev-unabhängig in Zellen exprimiert wird und C-terminal eine eGFP-Domäne trägt (Perez-Caballero *et al.*, 2004). Hiermit konnte die Lokalisierung des Gag-Proteins in der Zelle in Abwesenheit von weiteren viralen Proteinen studiert werden. Es wurden sogar unreife Virus-ähnliche Partikel, bestehend aus nur einer Gag-Sphäre mit Membranhülle freigesetzt.

In unserer Arbeitsgruppe gelang es innerhalb des Leserasters von Gag ein Fluorophor im proviralen Kontext einzufügen. Die Infektiosität der erhaltenen Viruspartikel ist reduziert, kann jedoch durch Kotransfektion im Verhältnis 1:1 mit Wildtyp-proviralen Konstrukten für unmarkiertes MA wieder auf das Niveau des Wildtyps angehoben werden (Muller *et al.*, 2004). Die C-terminale Fusion von eGFP an das Matrix-Protein erlaubt es, die Lokalisierung des Matrix- bzw. des Gag-Vorläuferproteins in Anwesenheit der übrigen HIV-Bestandteile zu verfolgen. Dieses Konstrukt ermöglicht auch die Produktion infektiöser Viruspartikel, die dann fluoreszenzmarkiert sind.

5.6.4 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie, die Detektion und Lokalisation von fluoreszierenden Spezies mittels vergrößernder optischer Techniken, entwickelte sich seit Beginn der 1980iger Jahre rasant. Die Weitfeldmikroskopie ist eine heute weit verbreitete Standardmethode, bei der mittels eines optischen, vergrößernden Linsensystems ein Abbild einer Ebene in der Probe dem Auge oder einem Detektor (z.B. einer CCD-Kamera) zugeführt wird. Die Einführung des konfokalen Mikroskops, erlaubte es, dreidimensionale Spezies mittels optischer Schnitte zu untersuchen.

Die Entwicklung von fortschrittlichen CCD (*charge coupled device*)-Kameras in den 1990er Jahren ermöglichte die sensitive und zeitlich hochaufgelöste Beobachtung dynamischer Prozesse im Mikroskop, da der Wissenschaftler nicht mehr auf analoge Kameras mit wenig sensitiven Silberhalogenidfilmen angewiesen war (Internetquelle 3).

Aufgrund einer physikalischen Limitation, der Diffraktion, ist die laterale Auflösung eines Mikroskopsystems auf ca. 200-300 nm begrenzt. Wird eine punktförmige Lichtquelle mittels eines optischen Systems abgebildet, so verbreitert sich das Signal. Dieses Verhalten kann durch die Punktverwaschungsfunktion (*Point-Spread-Funktion*) beschrieben werden. Mittels dieser und unter Berücksichtigung des Rayleigh-Kriteriums lässt sich die unter optimalen Bedingungen erreichbare laterale Auflösung r_{lateral} mit:

$$r_{\text{lateral}} = 0.6 \lambda / NA$$

bestimmen, wobei λ die Wellenlänge des emittierten Lichts und NA die numerische Apertur des Objektivs sind. Für ein Objektiv mit einer numerischen Apertur von 1,45 und Licht einer Wellenlänge von 510 nm (typisch für GFP Emission) ergibt sich eine Auflösungsgrenze von maximal 210 nm (Internetquelle 3).

Eine Auflösungssteigerung ist neuerdings durch Techniken wie 4π -Mikroskopie oder STED-Mikroskopie möglich geworden (Bahmann *et al.*, 2001; Egner und Hell, 2005; Egner *et al.*, 2004; Gugel *et al.*, 2004; Willig *et al.*, 2006).

Durch das Anpassen einer Gaußfunktion an ein im Weitfeldmikroskop gemessenes Fluoreszenzsignal lässt sich rechnerisch nach Bildaufnahme die Position des Fluoreszenzsignals mit deutlich höherer Auflösung bestimmen (Brauchle *et al.*, 2002; Seisenberger *et al.*, 2001). Auch kann mittels sogenannter Deconvolutionssoftware die Auflösung rechnerisch gesteigert werden. Ihre praktischen Anwendungsbereiche sind jedoch begrenzt und gerade die Deconvolution ist nicht frei von Artefakten, was unter Umständen die Interpretation erschwert.

Das konfokale Mikroskop ermöglicht durch den Einbau einer Lochblende im Emissionsstrahlengang das Ausblenden von Fluoreszenzlicht, das nicht aus der Fokusebene stammt. Dieses Verfahren ist sinnvoll bei Proben, die dicker als 2 μm sind. Das Bild wird hierdurch klarer und feinere Strukturen lassen sich erkennen, die grundsätzliche Auflösung des Systems wird aber nur unwesentlich gesteigert. Der Hauptvorteil liegt in der Möglichkeit optische Schnitte anzufertigen und diese bei Bedarf zu einem dreidimensionalen Modell zu kombinieren. Wie auch beim Weitfeldmikroskop ist die optimale axiale Auflösung schlechter als die laterale. Allerdings ist die tatsächliche Auflösung in stark fluoreszierenden Proben mit

einer Dicke von deutlich größer als 2 μm durch die Begrenzung auf Fluoreszenzsignale aus dem Fokus besser (Internetquelle 3).

Bei der konfokalen Mikroskopie fällt das Licht einer kleinen Region durch die Lochblende auf den Detektor, der das Licht in eine Spannung umwandelt. Da es nur möglich ist, einzelne Punkte aufzunehmen, wird das Bild Punkt für Punkt gerastert. Hierdurch tritt eine Zeitverzögerung auf, die sich bei sehr schnellen Prozessen nachteilig auswirken kann. Das sogenannte *Spinning Disk*-Mikroskop besitzt eine rotierende Scheibe mit Löchern, die als Lochblenden fungieren. Die Abbildung erfolgt durch einen CCD-Chip (Davidovits und Egger, 1973; Egger und Petran, 1967). Für extrem sensitive Messungen wird die Weitfeldmikroskopie der konfokalen Mikroskopie oft vorgezogen, da selbst bei optimaler Justierung an der Lochblende 25-50 % der emittierten Fluoreszenz verloren gehen (Internetquelle 3).

5.6.5 TIRF-Mikroskopie

Für etliche Anwendungen ist es sinnvoll, nur in einem kleinen Teilvolumen der Messkammer oberhalb des Deckglases im wässrigen Medium Fluorophore anzuregen und somit ausschließlich diese beobachten zu können. Eine Möglichkeit der Realisierung ist die Verwendung des totalen internen Reflexions-(*total internal reflection* - TIRF) Fluoreszenzmikroskops (Abbildung 4) (Axelrod, 1989; Axelrod, 2003; Axelrod *et al.*, 1983; Sako und Uyemura, 2002). Hiermit konnten fluoreszenzmarkierte Viren oder Membranrezeptoren an der dem Deckglas zugewandten Seite der Zellmembran untersucht werden (Brandenburg und Zhuang, 2007; Pelkmans *et al.*, 2002). Mit dieser Methode ist eine Unterscheidung von membrannahen und klar zytoplasmatischen Regionen möglich.

Das Grundprinzip beruht auf der Totalreflexion eines Lichtstrahls am Übergang von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium, z. B. an einer Glas/Wasser-Grenzfläche. Obwohl eine totale Reflexion des Lichtstrahls stattfindet, dringt ein elektromagnetisches Feld in die Flüssigkeit ein. Dieses elektromagnetische Feld wird auch *evanescent field* (dahinschwindendes Feld) genannt und ist in der Lage, Fluorophore in der Nähe der Grenzfläche anzuregen. Aus praktischen Gründen werden zur Anregung Laser verwendet, aber auch andere Lichtquellen wären prinzipiell geeignet (Axelrod, 1989; Axelrod *et al.*, 1983).

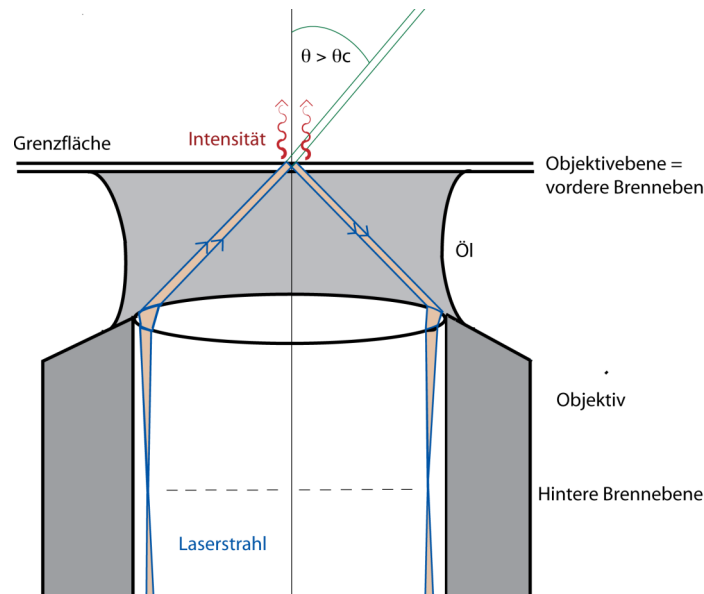


Abbildung 4: Skizze zum Grundprinzip eines TIRF-Mikroskops vom Objektivtyp mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur (Erläuterungen siehe Text).

Die Reichweite des *evanescent field* ist unendlich. Die Intensität unterliegt jedoch einem exponentiellen Abfall der Form:

$$I(z) = I_0 e^{-z/d}$$

mit

$$d = \frac{\lambda}{4\pi} [n_1 \sin \theta - n_2]^{-1/2}$$

d: Abfallskonstante des elektromagnetischen Feldes

z: Abstand senkrecht zur Grenzfläche

I(z): Intensität des Lichtes in der Flüssigkeit im Abstand z von der Grenzfläche

I₀: Intensität des Lichtes in der Flüssigkeit an der Grenzfläche

λ: Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes

n₁: Brechungsindex des Festkörpers (optisch dichteres Medium)

n₂: Brechungsindex der Flüssigkeit (optisch dünneres Medium)

θ: Winkel des einfallenden Lichtstrahles gemessen zur Normalen auf der Grenzfläche

In der Praxis weist das *evanescent field* bis zu einem Abstand von etwa 150 nm von der Grenzfläche eine ausreichende Intensität auf, um Fluorophore anzuregen. Der genaue Wert hängt vom Aufbau des Mikroskops und der Intensität sowie der Wellenlänge des anregenden Lichtes ab. Für den Winkel θ ist zu beachten, dass er größer sein muss als der kritische Winkel θ_c, ab dem Totalreflektion auftritt. Der kritische Winkel ist definiert als

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right)$$

mit

n₁: Brechungsindex des Festkörpers (optisch dichteres Medium)

n₂: Brechungsindex der Flüssigkeit (optisch dünneres Medium)

Je größer der Winkel θ wird, desto kleiner wird d und die Intensität der elektromagnetischen Welle in einem definierten Abstand zur Grenzfläche nimmt zu. Des Weiteren ist zu beachten, dass für Winkel $\theta \approx \theta_c$ d gegen ∞ strebt und die Intensität minimiert wird. Im Aufbau können zwei Typen von *TIRF*-Mikroskopen unterschieden werden: der Prisentyp und der Objektivtyp. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem Mikroskop vom Objektivtyp gearbeitet. Beim Objektivtyp erfolgen Anregung und Beobachtung durch dasselbe Objektiv. Der Laserstrahl wird so eingerichtet, dass er genau am Rand des Objektivs verläuft, allerdings ist nun nicht mehr das gesamte Sichtfeld ausgeleuchtet, sondern nur ein kleiner Teil davon. Für diesen Aufbau ist ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur (NA) erforderlich, da der Laserstrahl an der Glas/Flüssigkeitsgrenzfläche mit einem Winkel größer als dem kritischen Winkel auftreffen muss. Mit der Gleichung zur Berechnung des kritischen Winkels und den Brechungsindizes für Glas ($n_1=1.53$) und Wasser ($n_2=1.33$) ergibt sich $\theta_c= 60,4^\circ$. Die Vereinfachung, den Brechungsindex von Wasser anstelle des Brechungsindex des tatsächlichen Puffers zu verwenden, ist aufgrund der geringen Abweichungen zwischen beiden zulässig. Mit

$$NA = n_1 \sin \theta$$

ergibt sich eine minimale numerische Apertur von 1,33. Aus bautechnischen Gründen ist jedoch eine Apertur von 1,45 und größer vorzuziehen.

5.6.6 Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist eine Einzelmoleküldetektionsmethode, mit der die Konzentration und der Diffusionskoeffizient einer Molekülspezies in Lösung und innerhalb von Zellen bestimmt werden können. Diese Methode basiert auf einem konfokalen Aufbau, bei dem in einem kleinen Volumen Fluorophore angeregt und detektiert werden können. Die Detektion erfolgt mit Avalanche-Photodioden (APD), die in der Lage sind, einzelne Photonen zu detektieren. Diffundiert ein Molekül durch das Anregungsvolumen, so steigt die gemessene Fluoreszenzintensität erst an, erreicht ein Maximum, wenn sich das Molekül genau im Fokus befindet und fällt dann wieder ab. Typische Messungen werden mit einer Fluorophorkonzentration im nanomolaren Bereich durchgeführt, so dass sich immer mehrerer Fluorophore im Konfokalvolumen befinden. Dies führt zu einer nahezu konstanten Signalstärke mit Fluktuationen, wenn Moleküle in das Konfokalvolumen eintreten, sich innerhalb diesem bewegen oder es verlassen. Aus den gemessenen Schwankungen der Fluoreszenzintensität wird mittels der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ die Konzentration aus der Auftragung $G(\tau)$ gegen τ (Zeitintervall) als y-Achsenabschnitt bestimmt. Die

Diffusionszeit ist definiert durch das τ bei dem $G(\tau)$ 50 % vom Maximalwert erreicht. Aus der Diffusionszeit lässt sich unter Kenntnis des Detektionsvolumens der Diffusionskoeffizient bestimmen. Sollten mehrere Spezies in der Lösung vorhanden sein, so verhalten sich die Funktionen additiv.

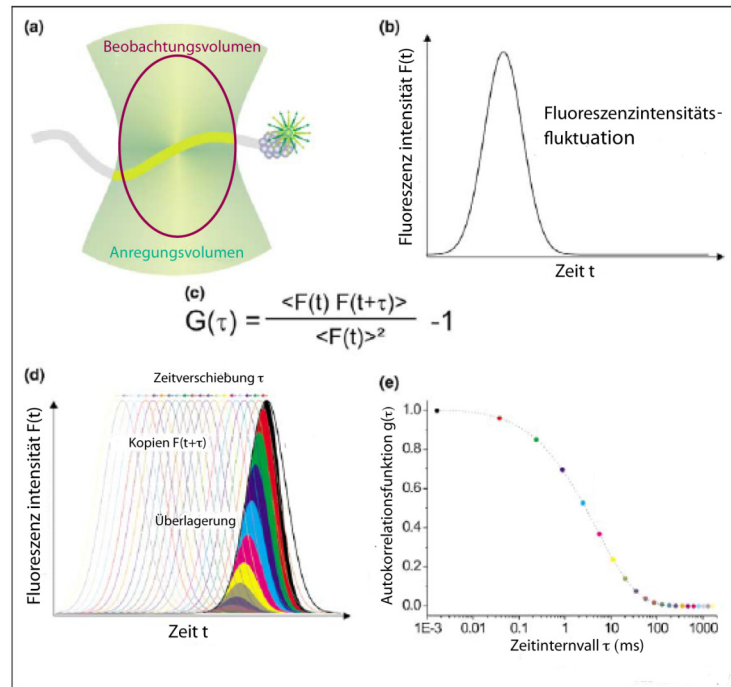


Abbildung 5: Grundprinzip der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Ein Molekül, das durch das Anregungsvolumen diffundiert (a), ergibt in der zeitlichen Darstellung erst einen Anstieg und anschließend einen Abfall der Signalstärke (b). Moleküle, die sich durch das Anregungsvolumen bewegen, zeigen ein additives Verhalten, das zu geringen Schwankungen in der gemessenen Fluoreszenzintensität führt (d). Diese Schwankungen können mit der Autokorrelationsfunktion (AKF) analysiert werden (c). Aus der Auftragung der AKF gegen das Zeitintervall (e) kann die Konzentration und die Diffusionszeit der Moleküle ermittelt werden. (Abbildung modifiziert nach (Haustein und Schwille, 2004)).

Die Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie ist eine Weiterentwicklung der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Bei dieser Methode werden zwei spektral getrennte Fluorophore gleichzeitig in überlappenden Konfokalkvolumen detektiert. Sind diese Fluorophore an verschiedenen Proteinen lokalisiert, so kann über die Kreuzkorrelationsfunktion der Anteil an Molekülen, die aneinander gebunden sind, bestimmt werden. Diese Methode ist hilfreich, um den Gleichgewichtszustand zu bestimmen. Die Aufnahme von Kinetiken sind nur schwer möglich (Bacia *et al.*, 2006; Bacia *et al.*, 2004a; Bacia und Schwille, 2003; Kim *et al.*, 2004; Kim und Schwille, 2003).

6 Fragestellung

Die Untersuchung des HI-Viruseintritts in die Wirtszelle auf Einzelpartikelebene erlaubt, detaillierte Erkenntnisse über den zeitlichen Ablauf stochastischer Prozesse wie Virusanheftung an die Zielzelle und Fusion sowie über das Bewegungsverhalten subviraler Partikel im Zytosol zu erlangen. Dazu sollen Untersuchungen mit Viruspartikeln, bei denen die viralen Proteine MA und Vpr fluoreszenzmarkiert sind, mittels Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Diese Markierung erlaubt, die Fusion eines Viruspartikels durch Separation der Fluorophore anzuzeigen. Weiterhin ist mit dieser Markierungsstrategie eine Unterscheidung zwischen fusionierten und endozytierten Viruspartikeln möglich. Das anzuwendende System erfordert keine artifizielle Synchronisation, wie sie für biochemische Experimente notwendig ist.

Um sicherzustellen, dass die fluoreszenzmarkierten Viruspartikel eine dem Wildtyp ähnliche Proteinzusammensetzung und Infektiosität aufweisen, sollen diese mit biochemischen und virologischen Methoden charakterisiert und optimiert werden. Weiterhin ist die Virusherstellung so anzupassen, dass die Viruspartikel für Virus-Zell-Interaktionsexperimente verwendet werden können. Es ist ein Doppelmarkierungsgrad von mehr als 90 % anzustreben, um damit die Vergleichbarkeit von Einzelpartikel- und Ensemblemessungen sicherzustellen. Für die mikroskopischen Experimente sollen geeignete Zelllinien ausgewählt und nachfolgend die Interaktion mit Viruspartikeln untersucht werden. Dazu ist es notwendig, die optimale fluoreszenzmikroskopische Technik auszuwählen. Zur Analyse der gewonnenen Daten soll ein geeigneter Arbeitsablauf entwickelt werden, um eine objektive und quantitative Auswertung der Interaktion der Viruspartikel mit den Zielzellen zu ermöglichen.

Komplettiert werden soll dieser Ansatz durch die Etablierung eines *in vitro* Fusionssystems mit dem die Interaktion zwischen fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln und Liposomen untersucht werden kann.

7 Material und Methoden

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien

7-AAD	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) (40%ige Stammlösung)	Roth, Karlsruhe
Agar (Bacto-Agar)	Becton-Dickinson (BD), Heidelberg
Agarose	Cambrex, Oberhaching
Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
Amino-N-Caprinsäure	Biomol, Hamburg
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
AZT	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
BG-Fluorescein	Covalys, Luzern (Schweiz)
Bovines Serumalbumin (Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Chroma, Fürstfeldbruck
CCF2-AM	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform (#25690)	Fluka, Steinheim
Collagen A (#L7220)	Biochrom, Berlin
Dextran (10 kDa)-Alexa Fluor 647	Invitrogen, Karlsruhe
DiD	Invitrogen, Karlsruhe
DOPS	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisessig	JT Baker, Deventer (Niederlande)
Ethanol (absolut)	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fibronectin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum	BioWhittaker Europe, Heidelberg
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Beckman, Krefeld
Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Riedel de Haen, Seelze
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MES	Biomol, Hamburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Methanol (absolut)	Merck, Darmstadt
N,N,N,N-Tetramethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Karlsruhe
Natronlauge (2 N)	Merck, Darmstadt
Natriumperchlorat	Merck, Darmstadt
OrangeG	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
PBS (ohne Magnesium- und Kalziumchlorid)	Biochrom, Berlin
Paracoumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatidsäure	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Phosphatidylinositol	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Propanol	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Invitrogen, Karlsruhe
Octadecyl-rhodamin-B-chlorid (R18)	Invitrogen, Karlsruhe
Schwefelsäure	Fluka, Steinheim
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylrhodamin (TMR)	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsininhibitor (aus der Sojabohne) (#6522)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypton (Bacto-Trypton)	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

7.1.2 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Kits

CL-Xposure Film Clear Blue	Perbio, Bonn
Filterpapier	Whatman, Dassel
Fugene 6 Transfektions Reagenz	Roche, Mannheim
8-Kammer-Deckgläser (Lab-Tek, Nr. 155411)	Nunc, Wiesbaden
Spritzenfilter Membrex 25CA Filter (0,45 µm Poren)	Membra Pure, Bodenheim
Spritzenfilter steril 0,22 µm Zellulosemischmembran	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose Transfer Membran Protran BA85	Whatman, Dassel
Nucleobond AX (Plasmid Preparation (Mini-, Midi- und Maxi-Kit))	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Polyethylinimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturmaterialien (Flaschen, Schalen, Platten)	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Zentrifugenröhrchen (15 ml bzw. 50 ml, "Falcons")	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Einwegpipetten, gestopft für Zellkultur (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

<i>Immuno Maxisorb</i> 96-Loch-Platte	Nunc, Wiesbaden
ECL-Lösung pico	Perbio, Bonn

7.1.3 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurde Wasser in Millipore-Qualität (entspricht Aqua bidest.) eingesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
1/20MT-Puffer	1 mM MES 1,5 mM Tris 355 mM Sucrose pH-Wert auf 7,5 eingestellt
Acrylamid-Stammlösung für Trenngele	30 % (w/v) Acrylamid 0,15 % (w/v) Bisarylamid
Acrylamid-Stammlösung für Sammelgele	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
6 x Agarosegel-Ladepuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,6 60 mM EDTA 60 % (w/v) Glycerin 0,15 % (w/v) Orange G 0,03 % (w/v) Xylencyanol FF
CaCl ₂ -Lösung	Wenn nicht anders angegeben: 2,5 M CaCl ₂ in H ₂ O
ECL-Lösung (vor Gebrauch frisch ansetzen)	100 mM Tris-HCl pH 8,5 400 µM Paracoumarinsäure 2,5 mM Luminol 5,4 mM H ₂ O ₂
Färbelösung für p24 ELISA	0,1 M Natriumacetat pH 6,0 0,006 % (v/v) Wasserstoffperoxid 1 % (w/v) Tetramethylbenzidin
HBS-Lösung	50 mM Hepes 0,28 M Natriumchlorid 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH-Wert auf 7,05 eingestellt
Laufpuffer für SDS-Polyacrylamidgele	Für 1 l Gebrauchslösung: 1 g SDS 3,03 g Tris 14,4 g Glycin
MT150-Puffer	20 mM MES 30 mM Tris 150 mM NaCl pH-Wert auf 6,0 bzw. 7,5 eingestellt
Natriumacetat-Lösung	Wenn nicht anders angegeben:

Material und Methoden

	1 M Natriumacetat in H ₂ O (pH 6,0)
Paraformaldehyd (PFA) 3%	3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
Ponceau S-Lösung	2 % (w/v) Ponceau S 30 % (w/v) Trichloressigsäure 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure
4 x Sammelgelpuffer für SDS-Polyacrylamidgele	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4 % SDS
3 x SDS Probenpuffer	125 mM Tris-HCl pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % (w/v) Glycerin 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol
50 x Laufpuffer für Agarosegele (TAE)	Für 1 l Lösung: 242 g Tris-HCl pH 8,0 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA
TBST	1 x TBS 0,1 % (v/v) Tween-20
10 x TBS	500 mM Tris-HCl pH 7,5 1,5 M NaCl
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA
Transferpuffer für Westernblot I (WB I)	300 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Transferpuffer für Westernblot II (WB II)	25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Transferpuffer für Westernblot III (WB III)	25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol 40 mM Amino-N-Caprinsäure (DL-Norleucin)
Trenngelpuffer für SDS-Polyacrylamidgele	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS

7.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Heparinase I	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pfu-Polymerase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Macherey-Nagel, Düren
T4-DNA Ligase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

7.1.5 DNA- und Protein-Standardmarker

1 kb-DNA Molekulargewichtsmarker (Invitrogen, Karlsruhe)

Proteinmarker „Mix6“ (Invitrogen, Karlsruhe)

7.1.6 Antiseren

Die folgenden Kaninchen-Antiseren, hergestellt durch Immunisierung mit aufgereinigten Proteinen oder Peptiden, wurden für Westernblotanalysen in der jeweils angegebenen Verdünnung eingesetzt. Als Zweitantikörper wurde ein kommerzieller Ziege- α -Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg, *cross absorbed* #111-035-045) gerichtet gegen den konstanten Teil der Kaninchen-Antikörper verwendet, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Die Verdünnung des Zweitantikörpers betrug 1:10.000.

Bezeichnung des Antikörpers	Verdünnung	Spezies
α -CA3	1:5.000	Kaninchen
α -Env/gp120	1:4.000	Kaninchen
α -GFP	1:5.000	Kaninchen
α -MA	1:5.000	Kaninchen
α -Vpr	1:2.000	Kaninchen

7.1.7 Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Hergestellt aus / Erhalten von	Fluorophor/ Tag
pCHIV (#353)	Proviraies Plasmid	Siehe 8.1*	-
pNLC	Proviraies Plasmid	HIV-Sequenz aus pKHIV (Muller <i>et al.</i> , 2004) durch Restriktion mit <i>XhoI/XbaI</i> umklontiert in pcDNA3.1(Zeo)-*	-
pNLC.eGFP	Proviraies Plasmid	HIV-Sequenz aus pKHIV.eGFP (Muller <i>et al.</i> , 2004) durch Restriktion mit <i>XhoI/XbaI</i> umklontiert in pcDNA3.1(Zeo)-*	eGFP
pCHIV.eGFP (#355)	Proviraies Plasmid	Siehe 8.1*	eGFP
pCHIV.CFP (#354)	Proviraies Plasmid	Austausch von eGFP durch CFP*	CFP
pCHIV.YFP (#356)	Proviraies Plasmid	Austausch von eGFP durch YFP*	YFP
pCHIV.mCherry	Proviraies Plasmid	Austausch von eGFP durch mCherry*	mCherry
pCHIV Δ ENV	Proviraies Plasmid	Env-defizientes proviraies Plasmid* (Lampe <i>et al.</i> , 2007)	-
pCHIV.mCherry Δ ENV	Proviraies Plasmid	Env-defizientes proviraies Plasmid*	mCherry
pCHIV.eGFP Δ ENV	Proviraies Plasmid	Env-defizientes proviraies Plasmid* (Lampe <i>et al.</i> , 2007)	eGFP
peGFP.Vpr	Fluoreszenzmarkiertes Vpr-Fusionsprotein	(McDonald <i>et al.</i> , 2002)*	eGFP

Material und Methoden

pmRFP1.Vpr	Fluoreszenzmarkiertes Vpr-Fusionsprotein	siehe 8.2	mRFP1
pmCherry.Vpr	Fluoreszenzmarkiertes Vpr-Fusionsprotein	Austausch von eGFP durch mCherry*	mCherry
pKHIV.eGFP	Proviraies Plasmid	(Muller <i>et al.</i> , 2004)*	eGFP
pMM310	β -Lactamase-Vpr-Fusionsprotein für Fusionsassay	Nedd Landau*	-
pGPI-AGT	GPI-Anker fusioniert mit AGT	Covalys, Luzern (Schweiz)*	AGT
pVSVG	Plasmid kodierend für VSV-G (eingesetzt zur Pseudotypisierung von HI-Viren)	(Emi <i>et al.</i> , 1991)*	-

* in der Abteilung vorhanden oder zur Verfügung gestellt

7.1.8 Synthetische Oligonukleotide für PCR

Primername	Nukleotidsequenz 5' → 3'
mRFP1Nhe_fwd	GGC CGG CTA GCA TGG CCT CCT CCG AGG ACG
mRFP1Sca_rev	CGC CCT GAG TAC TTG GCG CCG GTG GAG TGG CG

7.1.9 Sterilisation

Medien für die Bakterienkultur wurden bei 121°C und einem Druck von 1 bar für 20 min autoklaviert. Waren Komponenten der Lösungen hitzelabil, so wurden diese unter sterilen Bedingungen durch einen Filter mit 0,22 μ m Porengröße sterilfiltriert und anschließend den Medien zugesetzt.

7.1.10 Bakterienkulturen

Für Bakterienkulturen in Flüssigmedium wurde Luria Bertani (LB)-Medium eingesetzt:

1,0 % (w/v) Bacto-Trypon

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

170 mM NaCl

5 mM NaOH

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert.

Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurden dem LB-Medium 1,25 % (w/v) Agar zugesetzt, die Mischung autoklaviert und im noch flüssigen Zustand in 10 cm Schalen gegossen. Je nach Bedarf wurden im noch flüssigen Zustand Selektionsantibiotika zugesetzt. Die finale Konzentration bei Ampicillin betrug 100 μ g/ml bzw. bei Kanamycin 50 μ g/ml.

7.1.11 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α

F⁻ 80d/lacZM15 (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1*
hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44*⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*

7.1.12 Zelllinien

Name	Beschreibung	Verwendung	Herkunft
293T	Humane embryonale Nierenfibroblastenzelllinie, immortalisiert, transformiert mit großem T-Antigen von SV40	Virusproduktion (gute Transfizierbarkeit, hohe Proteinproduktion nach Transfektion)	ATCC (Pear <i>et al.</i> , 1993; Sena-Estevés <i>et al.</i> , 1999)
HeLaP4	HeLa-Zelle, u.a. stabil transfiziert mit CD4 und CXCR4	Standardmodellzelllinie, Virus-Zell-Interaktionsexperimente, Infektionsexperimente	abgeleitet von HeLa (Charneau <i>et al.</i> , 1992)
HeLa	Menschliche Cervikalkarzinom-Zelllinie	Kontrollzelllinie für Virus-Zell-Interaktionsexperimente	ATCC; (Scherer <i>et al.</i> , 1953)
HeLa JC53	HeLa-Zelllinie, u.a. mit hoher CD4-Oberflächenkonzentration	Virus-Zell-Interaktionsexperimente	abgeleitet von HeLa (Platt <i>et al.</i> , 1998)
HeLa RC25	HeLa-Zelllinie, u.a. mit niedriger CD4-Oberflächenkonzentration	Virus-Zell-Interaktionsexperimente	abgeleitet von HeLa (Trkola <i>et al.</i> , 2002)
TZM	HeLa-Zelllinie, u.a. stabil transfiziert mit CD4, CXCR4 und Luciferase unter LTR-Kontrolle	Infektionsexperimente	abgeleitet von HeLa (Wei <i>et al.</i> , 2002)
CHO K1	Ovarienzelllinie des Chinesischen Hamsters (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)	Virus-Zell-Interaktionsexperimente (Virusbindung)	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
CHO K1 CD4 CXCR4	Ovarienzelllinie des Chinesischen Hamsters (<i>Chinese Hamster Ovary</i>), stabil transfiziert mit CD4 und CXCR4	Virus-Zell-Interaktionsexperimente (Virusbindung)	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
pgsA745	Ovarienzelllinie des Chinesischen Hamsters (<i>Chinese Hamster Ovary</i>), mit Defekt im Heparansulfatstoffwechsel	Virus-Zell-Interaktionsexperimente (Virusbindung)	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
pgsA745 CD4 CXCR4	Ovarienzelllinie des Chinesischen Hamsters (<i>Chinese Hamster Ovary</i>) mit Defekt im Heparansulfatstoffwechsel, stabil transfiziert mit CD4 und CXCR4	Virus-Zell-Interaktionsexperimente (Virusbindung)	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
SupT1	CD4 und CXCR4 positive T-Zelllinie	Virus-Zell-Interaktionsexperimente (Virusbindung)	(Sei <i>et al.</i> , 1990)

7.1.13 Nährmedien und Zusatzreagenzien

Name	Zusätze
DMEM high (Invitrogen) / FKS (BioWest)	2 mM Glutamin 50 U/ml Penicillin 50 mg/ml Streptomycin 10 % (v/v) FKS
Hybridomed 1000F (Biochrom)	50 U/ml Penicillin 50 mg/ml Streptomycin
DMEM ohne Phenolrot (Invitrogen) / FKS (BioWest)	2 mM Glutamin 5 % (v/v) FKS
Ultra Culture (AthenaES)	50 U/ml Penicillin 50 mg/ml Streptomycin
Ultra CHO (AthenaES)	50 U/ml Penicillin 50 mg/ml Streptomycin
ExVivo (AthenaES)	50 U/ml Penicillin 50 mg/ml Streptomycin
Hams F12K (Invitrogen) / FKS (BioWest)	2 mM Glutamin 50 U/ml Penicillin 50 mg/ml Streptomycin 10 % (v/v) FKS
RPMI (Invitrogen) / FKS (BioWest)	2 mM Glutamin 50 U/ml Penicillin 50 mg/ml Streptomycin 10 % (v/v) FKS

7.2 Technische Geräte

Name	Hersteller	Verwendung
Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer	Aminco, Yale (USA)	Fluoreszenzspektren und -kinetiken
DU 640 Spectrophotometer	Beckman, Krefeld	Absorptionsspektren und DNA-Konzentrationsbestimmung
ELISA-Reader Multiscan EX	Thermo, Dreieich	Absorptionsmessung von 96-Loch-Platten für p24-ELISA
Sterilbank Steril Guard Class II Typ A/B 3	Labotec, Wiesbaden	Zellkulturarbeiten
Safire Platten-Fluorimeter	TECAN, Crailsheim	Fluoreszenzmessung von 96-Loch-Platten z.B. für β -Lactamase-Fusionsassay
Tischzentrifugen Biofuge pico und fresco	Hereaus, Dreieich	Allg. Laborarbeiten (z.B. DNA-Aufreinigung)
UZ L8-60M Ultrazentrifuge mit Rotor SW28 und SW41	Beckman, Krefeld	Virusaufreinigung
XL-70 Ultrazentrifuge mit Rotor SW32 und SW60	Beckman, Krefeld	Virusaufreinigung
IX70 mit Monochromator	Olympus/Till Photonics, Hamburg	Allgemeine Fluoreszenzdetektion mit Zellen im Weitfeld

Konfokales Mikroskop Leica SP2 AOBS	Leica, Wetzlar	Konfokale Mikroskopie von Zellen (Standort EMBL-Heidelberg)
Konfokales Mikroskop Zeiss LSM 510 FCS	Zeiss, Jena	Konfokale Mikroskopie von Zellen, FCS-Messungen
Olympus IX-80 TIRF	Olympus, Hamburg	Allg. Weitfeldmessungen von Zellen, Evaluierung von TIRF-Mikroskopie (Standort EMBL-Heidelberg)
PCR-Maschine	Biometra, Göttingen	Klonierung
semi-dry Blotting Apparatur	Biometra, Göttingen	Proteindetektion
FACSCalibur	Becton-Dickinson, Heidelberg	Durchflußzytometrie
Gelapparatur „mighty small“	Hoefer, Almstetten	Proteinauftrennung
Wobble-Frequenzgenerator	Conrad, Hirschau	Elektroformation von GUVs
ITO-Platten	GeSiM, Dresden	Elektroformation von GUVs

7.3 Software für allgemeine Anwendungen

Adobe CS2 (Photoshop, Illustrator etc.)
 ImageJ Version 1.34
 Invitrogen Vector NTI advance
 Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint etc.)
 Nikon FreeViewer EZ-C1 3.20
 Zeiss Free-Viewer
 Universal Imaging Metamorph Vers. 6.3r7

7.4 Molekularbiologische Methoden

7.4.1 Transformation von Bakterien

Zur Transformation von Bakterien mit Plasmiden wurden chemisch kompetente Bakterien eingesetzt, die durch Hitzeschock transformiert wurden. Dazu wurden die Bakterien auf Eis für 15 min mit 1 µg Plasmid-DNA-Lösung inkubiert und anschließend für 45 s im Wasserbad bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Nach Zugabe von 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium wurden die Bakterien 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend 100 µl der Bakteriensuspension auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank wurden einzelne Kolonien zum Ansetzen von Bakterienkulturen für Plasmid-DNA-Präparationen (Mini- bzw. Maxi-Präparationen) verwendet.

7.4.2 Präparation von Plasmid-DNA

7.4.2.1 Mini-Präparation

Geringe Mengen an Plasmid-DNA für analytische Zwecke wurden durch Aufreinigung der Plasmid-DNA von 1 ml Bakterienkultur durch alkalische Lyse mit anschließender Anionenaustauschchromatographie gewonnen. Dazu wurde 1 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt und mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Nach Inkubation über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 37°C unter Schütteln wurden die Bakterien für 3 min bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl Puffer S1 (Machery-Nagel, aus „Nucleo-

Bond-Kit“) resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer (Puffer S2), fünfmaligem Invertieren und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen lysiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer S3 wurde 5 min auf Eis inkubiert und feste Bestandteile durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 Upm abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 480 µl Isopropanol versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde erneut für 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 4°C-kaltem 80 %igem Ethanol gewaschen und das Pellet danach in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

7.4.2.2 Maxi-Präparation

Die Herstellung von größeren Mengen an Plasmid-DNA erfolgte ebenfalls durch alkalische Lyse und anschließender Anionenaustauschchromatographie. Hierfür wurde das Kit „Nucleo Bond 500“ (Macherey-Nagel) verwendet. Die Bakterien wurden als 200 ml Übernachtskultur unter Schütteln bei 37°C unter aeroben Bedingungen herangezogen und mittels Zentrifugation (20 min bei 5.000 x g und 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 11 ml S1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 11 ml S2-Puffer zur Bakterienlyse wurde durch fünffaches Invertieren vorsichtig gemischt und nach 3 min zur Neutralisation 11 ml kalter S3-Puffer zugegeben. Nach erneutem fünffachem Invertieren und Inkubation für 5 min auf Eis wurde die Suspension filtriert und die filtrierte Lösung auf eine mit 6 ml N2-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschchromatographie-Säule geladen. Nach Waschen mit 18 ml Puffer N3 wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer N5 eluiert und mit 11 ml Isopropanol versetzt und vorsichtig gemischt. Die DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert (15 min bei 15.000 x g und 4°C) und in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 800 µl 100 %igem Ethanol wurde die Lösung 15 min bei -20°C inkubiert und die ausgefallene DNA bei 13.000 Upm für 12 min in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Ethanol-freie DNA in 300 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt und die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

7.4.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA in TE-Puffer erfolgte photometrisch durch Absorptionsmessung bei 260 nm. Verunreinigungen wurden durch Absorptionsmessung bei 280 nm und Bildung des $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ -Verhältnisses bestimmt. DNA mit einem Verhältnis $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ von 1,8-2,0 wurde als rein betrachtet. Die Konzentration der DNA wurde über die Relation 1 $OD_{260\text{ nm}}$ entspricht 50 ng/µl bestimmt.

7.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung des DNA-Fragments für die Klonierung von pmRFP1.Vpr erfolgte mittels PCR. Der Reaktionsansatz für die PCR enthielt 40 ng Template-DNA, je 40 pmol für jeden Primer, 0,5 nmol dNTPs und 1 U Pfu-Polymerase (MBI-Fermentas) in einem Volumen von 20 µl in Pfu-Puffer. Die PCR-Reaktion wurde beginnend mit 3 min bei 95°C und anschließend mit 25 Zyklen von jeweils 40 s bei 95°C, 40 s bei 50°C und 1,5 min bei 72°C durchgeführt. Abschließend wurde 3 min auf 72°C erhitzt und der PCR-Ansatz bei 4°C gelagert. Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte mittels NucleoSpin-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll.

7.4.5 DNA-Restriktion und Ligation

Für die Restriktion von Plasmid-DNA wurden Restriktionsenzyme von MBI-Fermentas verwendet. Die Restriktion der Plasmid-DNA wurde in einem Volumen von 15 µl für 2 h bei 37°C durchgeführt. Für die analytische Restriktion wurden 1 µg DNA eingesetzt. Die verwendete Menge an Restriktionsenzymen richtete sich nach den Herstellerangaben.

Um ungewollte Religierung eines geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde das 5' Ende der DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, *calf intestinal alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Dazu wurde die geschnittene Plasmid-DNA in 40 µl Puffer (gemäß Hersteller) mit 1 µl CIAP für 30 min bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend durch Hitzebehandlung für 15 min bei 65 °C inaktiviert.

Für die Ligation von geschnittener Plasmid-DNA (Vektor-DNA) mit einem *Insert* wurde ca. 30 ng DNA eingesetzt mit einem molaren Vektor:*Insert*-Verhältnis von 1:3. Die DNA-Konzentrationen für die geschnittene Plasmid-DNA und das *Insert* wurde im Ethidiumbromidgel anhand des Vergleichs mit dem Molekulargewichtsmarker abgeschätzt. Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 15 µl mit Plasmid-DNA, *Insert* und 1 µl T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas) in T4-DNA-Ligasepuffer über Nacht bei 16°C durchgeführt. Parallel wurde jeweils ein Ligationsansatz ohne *Insert* als Kontrolle mitgeführt. 1 µl der DNA-Lösung wurde für die Transformation von Bakterien eingesetzt.

7.4.6 Elektrophoretische Separation von DNA

Für die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele mit 0,8-1 % (w/v) Agarose und 0,7 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer verwendet. Nach Zugabe von 6 x Agarosegel-Ladepuffer zu den Proben und Probeauftrag erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente bei 80 V für 45 min (bei Bedarf z.B. zur exakten Auftrennung von großen Fragment auch bis zu 90 min). Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde zusätzlich der 1 kb-DNA-Molekulargewichtsmarker (Invitrogen) geladen. Die Visualisierung der DNA erfolgte unter UV-Licht (Wellenlänge 254 nm).

7.4.7 Klonierung von pmRFP1.Vpr

Für die Klonierung von pmRFP1.Vpr wurde das mRFP1-Gen aus dem Vektor pRSET-mRFP1 (Campbell *et al.*, 2002) mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NheI* und *ScaI* in den Vektor peGFP.Vpr (McDonald *et al.*, 2002) anstelle des eGFP-Gens integriert.

Die Amplifizierung des mRFP1-Gens erfolgte durch PCR mit dem *Template* pRSET-mRFP1. Dazu wurden die Starter-Oligonukleotide mRFP1Nhe_fwd und mRFP1Sca_rev (siehe oben) eingesetzt, die gleichzeitig zur Generierung der Schnittstellen für *NheI* und *ScaI* dienen. Die Restriktion erfolgte sequenziell zuerst mit *NheI* und anschließend mit *ScaI* (MBI-Fermentas). Parallel wurde der Vektor peGFP.Vpr mit denselben Enzymen geschnitten und dephosphoryliert. Die Fragmente wurden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und mit dem Gelextraktions-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Nach Ligation wurde die DNA in *E.coli* DH5α transformiert. Die Plasmid-DANN aus verschiedenen Klonen wurde isoliert und mittels *NcoI* (und *PstI*)-Restriktion auf den korrekten Einbau des *Inserts* überprüft.

7.5 Biochemische Methoden

7.5.1 p24-ELISA

Zur Quantifizierung und Standardisierung von Viruspräparationen wurde die Konzentration des Kapsidproteins p24 mittels *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Um die Zugänglichkeit der Epitope in p24 in unreifen oder teilprozessierten Viruspartikeln (unvollständige Spaltung des Gag-Polypeptids) zu verbessern, wurden die Probe in SDS-Probenpuffer für 10 min aufgekocht und in einer Verdünnung von mindestens 1:500 eingesetzt, um störende Effekte von SDS auf die p24-Detektion auszuschließen.

Der Assay wurde in einer *Immuno Maxisorb* 96-Loch-Platte (Nunc) durchgeführt. Dazu wurden in jedes Loch 100 µl Antikörperlösung (1:1.000-Verdünnung des Hybridoma-Überstands von Aszites 183, der den monoklonalen Antikörper gegen p24 enthielt, in PBS) gegeben und die Platte über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Jedes Loch der Platte wurde zweimal mit je 200 µl PBS/Tween-20 gewaschen (Die Tween-20-Konzentration betrug bei den Waschrufen 0,05 % (v/v)). Unspezifische oder noch nicht besetzte Bindungsstellen wurden durch Inkubation für mindestens 2 h bei 37°C mit 150 µl 10 % (v/v) FKS in PBS je Loch blockiert. Anschließend wurden die Löcher der Platte zweimal mit 200 µl PBS/Tween-20 gewaschen und je Loch 100 µl der Probenverdünnungen aufgetragen. Es wurde eine Verdünnungsreihe der Proben hergestellt, bei der zuerst die Stammlösung 1:500 verdünnt wurde und diese anschließend jeweils um den Faktor 5. Zur Verdünnung wurde PBS mit 0,1 % (v/v) Tween-20 verwendet. Als Standard wurde rekombinant hergestelltes p24 eingesetzt, mit dem eine Verdünnungsreihe von 6,25 ng bis zu 0,09 ng p24 je ml hergestellt wurde, wobei jeweils um den Faktor 2 verdünnt wurde. Als Negativkontrolle wurden zwei Löcher nur mit PBS mit 0,1% (v/v) Tween-20 befüllt. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und dann dreimal mit PBS/Tween-20 gewaschen. 100 µl einer α -Kapsid-Antikörperlösung (1:1.000 in PBS mit 10 % (v/v) FKS und 0,1 % (v/v) Tween-20, polyklonal, Kaninchen) wurden in jedes Loch gegeben und die Platte 1 h bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit PBS/Tween-20 wurden in jedes Loch 100 µl einer Ziege- α -Kaninchen-Antikörperlösung (1:10.000 Verdünnung in PBS mit 10 (v/v) FKS und 0,1 % (v/v) Tween-20, der Ziege- α -Kaninchen-Antikörper war mit einer Meerettich-Peroxidase gekoppelt) gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert (zeitkritischer Schritt). Nach zweimaligem Waschen mit PBS/Tween-20 und dreimaligen Waschen mit VE-Wasser wurden in jedes Loch 100 µl der Färbelösung gegeben. Die Färbelösung bestand aus 0,1 M Natriumacetat (pH 6,0), 0,006 % (v/v) Wasserstoffperoxid und 1 % (w/v) TMB (Tetramethylbenzidin). Nach 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 0,5 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Platte wurde photometrisch bei 450 nm ausgelesen und der lineare Bereich des Standards ermittelt. Mit Hilfe des Standards wurde die p24-Konzentration in der Ausgangslösung ermittelt.

7.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von denaturierten Proteinen wurde die SDS-PAGE verwendet (Laemmli, 1970). Für die Auftrennung von viralen Proteinen hat sich ein niedrig kreuzverbundenes Gel (*Low-crosslinking-Gel*) als vorteilhaft erwiesen. Dazu wurden 17,5 %ige Trenngele verwendet, wobei pro Ansatz (4 Gele) 17,5 ml Acrylamidstammlösung (30:0,15 %), 7,5 ml 4 x Trenngelpuffer, 5 ml Wasser sowie 250 µl APS und 50 µl TEMED zum Start der Polymerisation eingesetzt wurden. Das Sammelgel bestand aus 1,5 ml Acrylamidstammlösung (30:0,8 %), 2,5 ml Sammelgelpuffer, 6 ml Wasser sowie 200 µl APS und 20 µl TEMED. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol versetzt und zur Denaturierung für 5 min auf 95°C erhitzt. Nach Probenauftrag wurde zur Auftrennung der Proteine pro Gel eine Stromstärke von 28 mA angelegt.

7.5.3 Westernblot

Die spezifische Detektion von Proteinen, die durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend elektrophoretisch auf eine Membran übertragen wurden, erfolgte mittels Antikörperdetektion. Hierzu wurde ein Drei-Puffer-System (Westernblot-Puffer (WB) I-III) verwendet. Zuerst wurden drei Filterpapiere (Whatman), getränkt in Westernblot-Puffer I, und 4 Filterpapiere, getränkt in WB II, auf die Kathode der Blotting-Apparatur gelegt. Auf die Filterpapiere wurde die mit WBII befeuchtete Nitrocellulosemembran (Protran BA85, Schleicher & Schuell) gelegt und darauf das Gel platziert. Auf das Gel wurden 5 Filterpapiere, die mit WBIII befeuchtet waren, gelegt und darauf die Anode platziert. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte bei $0,5 \text{ mA/cm}^2$ (typischerweise 28 mA je Blot) für 1 h. Die Membran wurde danach in Ponceau S-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure) gefärbt, mehrfach mit Wasser gewaschen und die Banden des Proteinstandards markiert. Danach wurde die Membran für 30 min in 10 % (w/v) Milchpulver in TBST unter Schütteln blockiert und über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper in 2 % (w/v) Milchpulver in TBST unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in TBST wurde die Membran mit dem Meerettich-Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper (1:10.000 in 2 % (w/v) Milchpulver in TBST) für 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran mit TBST wurde einmal mit VE-Wasser gewaschen und zur Visualisierung der Banden mit der Entwicklerlösung „ECL (Enhanced ChemiLuminescence) pico“ (Pierce) nach Herstellerangaben bzw. selbst hergestellter ECL-Lösung inkubiert.

7.5.4 pH-Stabilität von Fluorophoren in Viruspartikeln

Um den Einfluss von Veränderungen des pH-Werts auf die Fluoreszenzintensität der Fluorophore eGFP und mRFP1 zu bestimmen, wurden Viruspartikel nach 15 min Inkubation in 10 mM Puffer mit dem entsprechenden pH-Wert (siehe unten) im Fluoreszenzspektrometer analysiert. Die Anregungswellenlänge war für eGFP 488 nm bzw. für mRFP1 595 nm mit jeweils einem Bandpass von 4 nm. Die Verstärkereinstellung betrug 750 V für die eGFP-Fluoreszenzmessung bzw. 850 V für die mRFP1-Fluoreszenzmessung. Die Nulllinie wurde ohne Viruszugabe gemessen. Es wurden folgende Puffer-Stammlösungen verwendet: 100 mM Natriumacetat pH 4,0; 4,5; 5,0 bzw. 5,5; 100 mM MES pH 6,0 bzw. 6,5; 100 mM Hepes pH 7,0 bzw. 7,5 und 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 8,5 bzw. 9,0. Die eingesetzte Viruspartikelmenge betrug 100 ng p24 pro 100 μl Puffer.

7.6 Zellbiologische und virologische Methoden

7.7 Zellkultur

Adhärente Zellen wurden gewöhnlich in 75 cm^2 Zellkulturflaschen mit 10 ml des jeweiligen Kulturmediums kultiviert. Das Standardmedium DMEM, das Vitamine, Aminosäuren, Salz, Glukose und Phenolrot als pH-Indikator enthielt, war mit Glutamin, FKS und Antibiotika komplettiert. Die Zellen wurden bei 37°C , 95 % Luftfeuchte und 5 % Kohlendioxid inkubiert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen) vom Boden abgelöst. Die Trypsin-Behandlung wurde durch Zugabe von komplettiertem DMEM-Medium gestoppt. 1/10 der Zellen wurde erneut ausgesät und mit 10 ml frischem komplettiertem Medium versetzt. HeLaP4- bzw. TZM-Zellen, die in Hybridomed 1000F kultiviert wurden, wurden zweimal pro Woche subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls mit Trypsin/EDTA abgelöst, die Trypsinbehandlung jedoch nicht durch die Zugabe eines FKS-haltigen Mediums, sondern durch 0,2 mg/ml Trypsininhibitor (aus Sojabohne, Sigma) unterbunden. Anschließend

erfolgte die Aussaat und Kultivierung in 10 ml frischem Hybridomed 1000F mit Antibiotikazusatz.

7.7.1 Cryo-Konservierung von Zelllinien

Das Einfrieren der Zellen erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen. Hierzu wurden die Zellen normal ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 75 % mit Trypsin/EDTA abgelöst. Ca. 2×10^6 Zellen je Cryo-Gefäß wurden in 90 % (v/v) FKS mit 10 % (v/v) DMSO langsam auf -80°C abgekühlt und am Folgetag in flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Lagerung transferriert.

Zellen, die in Hybridomed 1000F kultiviert wurden, wurden nicht in FKS, sondern in Hybridomed 1000F mit 10 % (v/v) DMSO eingefroren.

7.7.2 Adaption von HeLaP4-Zellen an Hybridomed 1000F

Die Anpassung der Zellen ist beispielhaft für HeLaP4-Zellen in Hybridomed 1000F beschrieben. Die Adaption der TZM-Zellen verlief ähnlich. HeLaP4-Zellen in der dritten Passage wurden im Standardzellkulturmedium (DMEM mit 10 % (v/v) FKS) 1:10 gesplittet und für 24 h kultiviert. Danach wurde das Standardzellkulturmedium gegen Hybridomed 1000F ausgetauscht und die Zellen täglich beobachtet. Erreichten die Zellen 80-90 % Konfluenz, so wurden sie 1:3 gesplittet. Wiesen die Zellen eine Konfluenz von weniger als 80 % auf und es zeigte sich eine Ansäuerung des Mediums, so wurden 50 % des Mediums verworfen und 50 % frisches Medium zugesetzt, um einerseits immer frische Nährstoffe zu Verfügung zu stellen, andererseits autokrine Wachstumsfaktoren nicht zu verwerfen. Diese Vorgehensweise führte zu folgendem Adaptionsrhythmus der Zellen: Bis zur ersten Passage verging ca. 1 Woche. Die zweite Passage erfolgte nach weiteren 4-5 Tagen bereits 1:5 und die dritte nach weiteren 4-5 Tagen wieder im Verhältnis 1:5. Danach erfolgten zwei Passagen 1:5 im Abstand von 3-4 Tagen, bevor das Passagierverhältnis auf 1:10 angehoben wurde. Nach weiteren 1-2 Passagen mit 4-5 Tagen Zeitabstand wurden die Zellen im normalen Rhythmus von zwei Passagen pro Woche mit einer Verdünnung von 1:10 kultiviert.

Da das Medium Hybridomed 1000F für Suspensionszellen optimiert ist, hatten die Zellen Adaptionsprobleme, so dass sich viele Zellen während der Anpassungsphase abrundeten und in Suspension übergingen. Diese Subpopulation wurde durch den regelmäßigen Medienwechsel entfernt, so dass mit Erreichen eines normalen Zellwachstums nur noch adhärente Zellen mit normaler Morphologie kultiviert wurden. Zu diesem Zeitpunkt wurden Aliquots eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

7.7.3 Transfektion von Zelllinien

Die Transfektion der 293T-Zellen für die Virusproduktion erfolgte mittels der Kalziumphosphatmethode. Hierzu wurde 2×10^6 Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät und am Folgetag ein Mediumwechsel durchgeführt. Der Transfektionsmix wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt. Hierzu wurden je zu transfizierender 10 cm-Schale 1 ml Transfektionsmix hergestellt, wobei die Plasmid-DNA vorgelegt und mit doppeltdestilliertem und autoklaviertem Wasser auf ein Volumen von 0,45 ml gebracht wurde. 50 μl 2,5 M Kalziumchloridlösung wurden hinzugefügt und 0,5 ml HBS-Lösung unter Vortexen hinzutropft. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung auf das Zellkulturmedium in der Schale getropft und vorsichtig durch Bewegungen der Schale gemischt. 5 h nach Zugabe des Transfektionsmixes erfolgte ein Mediumwechsel.

Zellen für die Mikroskopie wurden mittels Lipofektion transfiziert. Hierzu wurde 1 μg Plasmid-DNA zur Transfektion einer Kammer eines 8-Kammer Deckglases (Labtek, Nunc)

verwendet. Die Transfektion erfolgte mit Fugene (Roche) im Verhältnis DNA zu Transfektionreagenz von 1:3. Es erfolgte kein Mediumwechsel und die Zellen wurden in der Regel zwischen 16 bis 22 h nach Transfektion mikroskopiert.

7.7.4 Viruspartikelproduktion und –aufreinigung

Die Virusproduktion erfolgte durch Transfektion von 293T-Zellen mittels Kalziumphosphatmethode. Zur Transfektion einer 10 cm-Schale mit ca. 2×10^6 Zellen wurden folgende Plasmidmengen eingesetzt: Die Gesamtmenge an proviralen Plasmiden betrug 15 μg , die sich für die Produktion zweifarbiger Partikel aus 7,5 μg pCHIV und 7,5 μg pCHIV.eGFP bzw. pCHIV.mCherry zusammensetzte, zu der noch 1 μg pmRFP1.Vpr bzw. peGFP.Vpr hinzugefügt wurde. Daraus resultierte ein molares Verhältnis von 1:1:0,4 von pCHIV:pCHIV.XFP:pXFP.Vpr. pMM310, VSV-G (Emi *et al.*, 1991) (in Kombination mit Env-defizienten proviralen Plasmiden), GPI-AGT oder Src.NLS.eGFP wurden zu je 2,5 μg Plasmid-DNA je 10 cm-Schale hinzugefügt.

Die Virusüberstände wurden 44 h nach Transfektion geerntet, durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit und durch einen Filter mit 0,45 μm Porengröße (Membrex 25 CA) filtriert. Das Medium wurde auf ein Sucrosekissen (20 % (w/w) in PBS) von 8 ml geschichtet. Nach Zentrifugation in der Ultrazentrifuge für 2 h bei 24.000 Upm bei 4°C (Rotor SW28) wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, Flüssigkeit an den Gefäßwänden entfernt und das Pellet in 100 μl PBS mit 10 mM Hepes (pH 7,3) und 10 % (v/v) FKS aufgenommen. Daraus ergab sich ein Verhältnis von 3,3 μl PBS mit 10 mM Hepes (pH 7,3) und 10 % (v/v) FKS zu 1 ml Zellkulturüberstand. Die Virussuspension wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

7.7.5 Infektion von TzM-Reporterzellen

TzM-Reporterzellen, die ein Luciferasegen unter Kontrolle des viralen LTR-Promotors trugen, wurden verwendet (Wei *et al.*, 2002), um die Infektiosität von zweifarbigen fluoreszenzmarkierten Viren zu bestimmen. 5×10^3 Zellen wurden in jedes Loch einer 96-Loch-Platte ausgesät und am folgenden Tag die Zellen mit einer Verdünnungsreihe der Virusstammlösung infiziert. Als Stammlösung wurde der durch einen 0,45 μm Filter gefilterte Zellkulturüberstand von Virus-produzierenden Zellen verwendet. 48 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luciferase mittels *Steady Glow Assay* (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt. Zur Auswertung wurde nur der lineare Bereich der Verdünnungsreihe herangezogen.

Um den Einfluss der Heparinase-Behandlung auf die Infizierbarkeit der Zellen zu testen, wurden die Zellen wie oben beschrieben ausgesät und am Folgetag mit Heparinase I (Sigma-Aldrich) behandelt. Hierzu wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit 0,1 ml PBS mit 2 U Heparinase I versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Heparinase-Lösung entfernt und aufgereinigtes Virus (7.7.4) in PBS mit 1 mM Kalziumchlorid und 0,5 mM Magnesiumchlorid oder DMEM mit 10 % (v/v) FKS zugegeben. Die Virusmenge entsprach 50 ng p24. Nach der Virusinkubation für 30 min bzw. 5,5 h wurde das Medium abgenommen und durch DMEM mit 10 % (v/v) FKS-, Antibiotika und Glutamin-Zusatz mit 10 ng/ml AMD3100 (erhalten durch das *NIH AIDS Research and Reference Program*) ersetzt, um die weitere Infektion der Zellen zu inhibieren. 18 h nach Infektion wurde 10 μM AZT (Azidothymidin) (Sigma-Aldrich) zugegeben, um weitere Infektionsrunden durch neuproduziertes Virus zu verhindern. 48 h nach initialer Infektion wurde das Medium entfernt und die Zellen lysiert. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte wie oben beschrieben.

7.7.6 Durchflußzytometrie zur Bestimmung der Virusbindung und Oberflächenkonzentration von Rezeptormolekülen

Für die Bestimmung der Virusbindung an verschiedene Zelllinien und die Bestimmung der relativen Konzentrationen von Oberflächenrezeptoren wurde die Durchflußzytometrie angewandt. Zur Bestimmung der Oberflächenkonzentration der HIV-Rezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5 sowie von Heparansulfat, wurden 1×10^6 Zellen je Ansatz verwendet. Adhärente Zellen wurden mit 0,7 mM EDTA in PBS von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt.

Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 100 µl Antikörperlösung für 30 min auf Eis inkubiert. Die Antikörper für CD4, CXCR4 und CCR5 waren alle APC-fluoreszenzmarkiert (Becton-Dickinson) und wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Der gegen Heparansulfat gerichtete Antikörper (Klon 10E4, Seikagaku) war mit FITC-fluoreszenzmarkiert und wurde in einer Verdünnung von 1:20 verwendet. Nach zweimaligem Waschen wurden die Proben im Durchflußzytometer FACSCalibur (Becton-Dickinson) analysiert und die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Als Kontrolle wurden ungefärbte Zellen verwendet, die nach dem gleichen Protokoll behandelt wurden. Die Autofluoreszenz dieser Zellen wurde als Referenz mit Hilfe des Histogrammplots der Fluoreszenzintensität so justiert, dass diese Zellen in der ersten Dekade des Histogramms detektierbar waren. Zur Messung der Effektivität der Heparinase-Behandlung wurden die Zellen 30 min bei 37°C mit 2 U/ml Heparinase I (Sigma-Aldrich) in PBS bzw. zur Kontrolle nur in PBS inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit der Standardprozedur fortgefahren (siehe oben).

Für die Virusbindungsstudien wurden jeweils 1×10^6 Zellen wie oben beschrieben abgelöst und gewaschen. Danach erfolgte entweder die Heparinase- oder Mock-Behandlung und nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 100 µl mit Viruspartikeln, die 60 ng p24 nach ELISA enthielten, für 30 min auf Eis inkubiert. Ungebundene Viruspartikel wurden durch zweimaliges Waschen entfernt und die Viruspartikel im Durchflußzytometer analysiert.

Bei Bedarf wurde die Vitalität der Zellen durch Zugabe von Propidiumiodid oder 7-aminoactinomycin D (7-AAD) bestimmt.

7.7.7 β -Lactamase-Fusionsassay

Für den β -Lactamase-Fusionsassay wurden Viruspartikel nach Standardprotokoll für zweifarbige Viruspartikel hergestellt, die jedoch anstelle von mRFP1.Vpr ein β -Lactamase-Vpr-Fusionsprotein (Plasmid: pMM310) enthielten. Dieses wurde durch Transfektion in der virusproduzierenden Zelle überexprimiert und in das Virion inkorporiert. Zwischen Vpr und der β -Lactamase war eine Schnittstelle für die virale Protease eingefügt, so dass bei der Virusreifung Vpr und β -Lactamase getrennt wurden. Bei der Fusion gelangt die β -Lactamase in das Zytosol der Zielzelle. Die Zielzelle wurde später mit dem membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff CCF2 inkubiert, welcher bei Anregung mit 409 nm Licht einer Wellenlänge von 520 nm emittiert. Wird der Farbstoff von der β -Lactamase gespalten, ändert sich die Emissionswellenlänge auf 447 nm. Die Änderung des Fluoreszenzsignals zeigt somit eine erfolgte Fusion der Viruspartikel an, die im Mikroskop, im Fluoreszenzspektrometer oder mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen werden kann (Cavrois *et al.*, 2002; Cavrois *et al.*, 2004a; Cavrois *et al.*, 2004b; Munk *et al.*, 2002).

Für die Analyse der Eintrittskompetenz der Viruspartikel mittels β -Lactamase-Fusionsassay wurden HeLaP4-Zellen in einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Loch einer schwarzen 96-

Lochplatte mit transparentem Boden (Costar # 3603) oder auf runden 12 mm Deckgläsern ausgesät. 24 h später erfolgte die Inkubation mit gemischten Viruspartikeln, die zusätzlich β -Lactamase-Vpr enthielten, für 3,5 h bei 37°C in DMEM mit 10 % (v/v) FKS. Anschließend wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CCF2 für 12 h bei Raumtemperatur in CO₂-unabhängigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden eine halbe Stunde in 3 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und anschließend in PBS mikroskopiert. Da die mikroskopische Unterscheidung zwischen grünen und schwach blauen Zellen subjektiv und schwer quantifizierbar ist, wurde die Auswertung im Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Dazu wurden 4×10^4 Zellen je Loch in schwarzen 96-Loch-Zellkulturplatte mit transparentem Boden für 24 h kultiviert und danach Virussuspensionen unterschiedlicher Verdünnungen mit bis zu 380 ng p24 pro Loch inkubiert. Sowohl nicht-infektiöse gemischte Partikel als auch nicht-infektiöse Wildtyp-Partikel wurden jeweils mit inkorporiertem β -Lactamase.Vpr eingesetzt. Nach Zugabe von CCF2 und PFA-Fixierung wurde die Fluoreszenz für beide Emissionswellenlängen im Spektralfluorimeter gemessen.

Als Maß für die Fusionsrate wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 447 nm zu 520 nm ermittelt und von diesem der errechnete Wert für die Kontrollzellen, die nicht mit Viruspartikeln inkubiert worden waren, subtrahiert. Der so errechnete Wert kann als Maß für die Fusionsrate angesehen werden.

Die mikroskopische Bestimmung erfolgte analog zu obigem Protokoll mit Zellen, die am Tag der Virusinkubation eine ungefähre Konfluenz von 50 % aufwiesen. Die Fluoreszenz der Zellen wurden nach Fixierung mit PFA eingebettet und mit einem geeigneten Filtersatz (Chroma) im Mikroskop Olympus IX70 mit 60facher Vergrößerung analysiert. Der Filtersatz ließ sowohl die blauen als die grüne Fluoreszenz passieren, so dass mit einer angeschlossenen Farbkamera (SIS) die Färbung der Zellen detektiert werden konnte.

7.8 Mikroskopie

7.8.1 Mikroskopbeschaffung

Dieses Projekt basierte stark auf fluoreszenzmikroskopischen Techniken. In unserer Abteilung war kein ausreichend leistungsfähiges Mikroskop für die Beobachtung der Virus-Zell-Interaktionen vorhanden. Die Messungen wurden daher mit Kooperationspartner an der LMU München oder der ETH Zürich durchgeführt. Um auch in unserer Abteilung diese Arbeiten durchführen zu können, sollte ein Mikroskop beschafft werden, das die Beobachtung der Interaktion von Viruspartikeln mit lebenden Zellen ermöglichte. Hierbei wurde ein auf unsere Bedürfnisse abgestimmtes kommerziell erhältliches System favorisiert.

Das Mikroskop sollte in der Lage sein folgende Aufgaben zu erfüllen: Die Beobachtung von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln bei der Interaktion mit adhären Zellen bei 37°C mit einer Zeitauflösung von mindestens 10 Hz (100 ms Belichtungszeit pro Bild), um eine Analyse mittels MSD-Plots zu ermöglichen. Bei Bedarf sollten auch höhere Bildraten möglich sein. Langzeitbeobachtungen von Virus-Zell-Interaktion sollten über Stunden oder Tage möglich sein. Ebenso sollen transient transfizierte Zellen über mehrere Tage beobachtet werden können, um so die unterschiedliche Lokalisation von Proteinen zeitlich verfolgen zu können (z.B. zur Untersuchung des Gag-Traffickings). Das Gerät sollte die Option besitzen, mehrere Zellen nacheinander zu beobachten und damit die Möglichkeit eröffnen, Bilder von Zellen vor der Viruszugabe zu erstellen, um diese dann später nach Viruszugabe wieder aufzusuchen. Bei Langzeitaufnahmen könnten mit dieser Option mehrere Sichtfelder regelmäßig angesteuert werden und somit die Zellenzahl im Langzeitexperiment erhöht werden, um auch die statistische Signifikanz des Experiments zu steigern. Um auch bei Lebendzellaufnahmen eine 3D-Rekonstruktion zu ermöglichen, sollte z-Stapel mit hoher Zeitauflösung möglich sein. Die TIRF-Mikroskopie ermöglicht die selektive Untersuchung

der Zellularseite und des dortigen Viruseintritts, wie es schon erfolgreich für andere Viren wie SV40 angewandt wurde (Pelkmans *et al.*, 2002) und sollte deshalb auch in System integriert werden.

Die Zellen sollten während der Messung unter optimalen Zellkulturbedingungen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert werden können, um nicht auf einen Wechsel des Medium zu CO₂-unabhängigen Medien oder Zusatz weitere Puffersubstanzen angewiesen zu sein.

Das Anregungslicht sollte eine möglichst geringe Intensität aufweisen, um das Ausbleichen der Fluorophore zu minimieren und lichtbedingte Schäden an den Zellen zu minimieren. Das schwache Anregungslicht soll über eine sensitive Kamera kompensiert werden.

7.8.2 Aufbau des Mikroskops

Die Grundlage bildete das vollautomatisierte, inverse Mikroskop Zeiss Axiovert 200M mit motorischem Wechsel aller optischen Komponenten inkl. der Filterhalter. Auf eine Motorisierung des Kondensors wurde verzichtet, da hierfür für die geplanten Experimenten keine Notwendigkeit bestand. Das System wurde über die Software Metamorph gesteuert. Als Objektive wurde ein Zeiss EC-Plan Neofluar 20x/0,5 DIC Objektiv und ein alpha Plan-Fluar 100x/1,45 DIC Öl-Immersionsobjektiv gewählt. Dieses Objektiv lies auch TIRF-Messungen zu. Zusätzlich konnte motorisiert eine 1,6fache Vergrößerungsoptik (Optovar) in den Strahlengang eingeschwenkt werden. Die Detektion erfolgte mit einer EMCCD-Kamera (Cascade II) von RoperScientific, die 512 x 512 Pixel auflöste. Die vergleichsweise geringe Auflösung wurde jedoch durch die hohe Sensitivität der Kamera kompensiert (Quanteneffizienz bis zu 92 % nach Herstellerangaben). Außerdem entsprach die Kantenlänge eines Pixels in der Objektebene 160 nm (rechnerischer Wert mit 100 x Optik). Dieser Wert lag bereits unterhalb des Diffraktionslimits. Die 1,6 x Vergrößerungsoptik ermöglicht eine Pixelgröße von 100 nm x 100 nm. Der Sensor war in der Lage Bilder mit voller Auflösung in einer Frequenz von ca. 30 Hz zu liefern, bei Beschränkung auf geringere Auflösung bzw. reduziertes Sichtfeld waren bis zu 300 Bilder pro s möglich. Die Belichtungszeit betrug bei 30 Hz 30 ms und die Bilddaten (elektrische Ladungen) wurden innerhalb von 3 ms in einen zweiten Bildspeicher verschoben, aus dem sie mit 10 MHz ausgelesen wurden, was wiederum 30 ms dauerte. Dies war gegenüber konventionellen CCD-Kameras ein entscheidender Vorteil, da diese nicht über einen zweiten Bildspeicher verfügten und eine (in diesem Fall 30 ms) Wartezeit einhalten müssen, bevor das nächste Bild aufgenommen werden kann. Dies bedeutete aber auch, dass alle weiteren Vorgänge wie Wechsel der z-Position in 3 ms durchführbar sein sollten. Um dies zu ermöglichen wurde zusätzlich zu dem bereits im Mikroskop integrierten z-Trieb ein Mikroskoptisch mit Höhenverstellung um 100 µm in z-Richtung mittels Piezokristallen beschafft. Dieser ermöglichte präzise und schnelle Veränderungen der z-Position und beeinträchtigte, im Gegensatz zu einer Piezolagerung des Objektivs, das DIC-Bild nicht. Der Tisch ermöglichte präzise Positionierung in x und y mit Linearmotoren. Somit ist es möglich automatisch mehrere Positionen auf dem Deckglas nacheinander aufzusuchen. Die Anregung der Fluorophore ermöglichte die Fluoreszenzlichtquelle Sutter DG4. Dies war eine Lichtquelle mit multispektraler Xenon-Lampe, die mittels Flüssigkeitsleiter an das Mikroskop angeschlossen wird. Im Gerät befanden sich vier Filterpositionen, in die Excitationsfilter eingeschraubt werden konnten. Der Lichtstrahl wurde mittels galvanometrisch gelagerter Spiegel durch jeweils einen dieser Filter gelenkt. Der Wechsel zwischen benachbarten Filtern war in ca. 3 ms möglich. Wir haben uns entschieden, die Fluorophore sequentiell anzuregen, da hierdurch Überstrahlen zwischen den Kanälen reduziert werden konnte und keine Verlust von Emissionslicht durch weitere Filter bzw. Glas-/Luft-Grenzflächen auftraten. Somit war die maximale Lichtausbeute gewährleistet.

TIRF-Mikroskopie wurde ebenfalls integriert und erfolgte über die Einkopplung der Fa. Visitron Systems. Für die TIRF-Mikroskopie war eine relativ starke, kohärente Lichtquelle von Vorteil, deshalb wurde ein Melles Griot Laser verwendet, der eine Leistung von 20 mW (Herstellerspezifikation) bei 488 nm und bei 568 nm lieferte. Die Steuerung erfolgte über einen akustooptischen Filter (AOTF), der den Laser mit einer Zeitverzögerung von weniger als 1 ms schalten konnte.

Das System wurde auf die Nutzung der Fluorophorkombination eGFP und mRFP1/mCherry optimiert, die im Wellenlängenbereich um 488 nm bzw. von 560 bis 595 nm optimal angeregt werden können. Für diesen Wellenlängenbereich wurde ein entsprechender Filtersatz (Chroma) beschafft. Diese Kombination weist eine sehr gute spektrale Trennung in der Emission auf, und die Fluorophore haben gute Eigenschaften bezüglich Quantenausbeute, Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen - wie Ionenstärke oder pH-Wert - und sind verhältnismäßig stabil gegenüber Ausbleichen. Diese Eigenschaften wurden momentan von keiner anderen Fluorophorkombination auf Basis fluoreszierender Proteine erreicht. Zusätzlich ist es möglich, einen organischen Farbstoff wie Cy5, Alexa 633 oder 647 im nahen Infrarot mit der Epifluoreszenzlichtquelle Sutter DG4 anzuregen. Für Farbkombinationen wie CFP/YFP/DsRed bzw. mRFP1, standen geeignete Filter zur Verfügung, um diese mittels Epifluoreszenz zu beobachten. Die Excitationsfilter (Chroma) waren für die Anregung des jeweiligen Fluorophors optimiert, während emissionsseitig der Farbteiler und der Emissionsfilter jeweils zwei oder drei Wellenlängenbereiche (die Emission der jeweiligen Fluorophore) passieren ließen. Um Überstrahlungen (*crosstalk*) in den Experimenten ausschließen zu können, wurde noch ein Filtersatz für eGFP (Chroma) beschafft, der nur die Emission von eGFP und nicht von mRFP1 passieren ließ, so dass ein Signal, das mit diesem Filtersatz aufgenommen wurde, nur von eGFP und nicht von einer Überstrahlung durch mRFP1 stammen konnte. Ebenso wurde ein Einzelbandfilter für mRFP1 beschafft. Hierdurch war es möglich, jederzeit den Grad der Überstrahlung zwischen den Kanälen abzuschätzen.

Das Mikroskop ist auf einem luftgefederten Tisch gelagert, der Erschütterungen effizient abfing. Die Temperierung erfolgt über eine Inkubationskammer (Maßanfertigung EMBL, Heidelberg, Deutschland), die sowohl eine präzise Temperatursteuerung im Bereich von ca. 16°C (optional) bis über 37°C bietet. Die Einspeisung von CO₂ ist ebenfalls möglich.

Um bei 3D-Aufnahmen die Auflösung zu verbessern wurde zusätzlich die Deconvolutionsoftware Autoquant beschafft, die es auf Basis einer errechneten oder vorher experimentell bestimmten Punktverwaschungsfunktion (PSF) erlaubte, nicht im Fokus befindliche Fluoreszenzsignale zu erkennen und zu eliminieren. Hierdurch erscheint das Bild klarer und höher aufgelöst.

7.8.3 TIRF-Mikroskopie

Die TIRF-Einkopplung wurde bei Einbau und anschließend nach Bedarf gemäß Herstellerangaben justiert. Dazwischen waren nur noch Feinjustagen nötig. Mittels Drehknopf wurde die Position des Laserstrahls zum Objektiv verändert. Außer zur TIRF-Illumination konnte der Laser auch zu einer epifluoreszenzähnlichen Beleuchtung der Probe eingesetzt werden. Da der Laser jedoch auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert war, ist der Laserstrahl in der Objektebene nicht vollständig achsenparallel. Dies hatte aber in der praktischen Arbeit keine negativen Auswirkungen. Die Ausleuchtung war homogen und etwas stärker als mit der Epifluoreszenzlichtquelle Sutter DG4.

In der TIRF-Einstellung konnte bei Schließen einer Streulichtblende ein homogenes Feld erreicht werden, die den nutzbaren Bereich des Kamerasensors auf ca. $\frac{1}{4}$ einschränkte. Wurde diese Blende geöffnet, so war eine geringe Vignettierung sichtbar. Bei nicht vollständiger Planarität oder leichter Verschmutzung des Deckglases war kein oder nur ein minderwertiges TIRF-Bild zu erreichen. Bei Testaufnahmen waren die in dieser optischen Anordnung

typischen konzentrischen Interferenzmuster zu beobachten. Dieses ist ein typisches Problem von objektivbasierten TIRF-Systemen. Die in unserem System aufgetreten Interferenzmuster sind im üblichen Rahmen für kommerziell erhältliche Einkopplungen.

7.8.4 Mikroskopische Bestimmung der Partikeldiffusion und Virus-Zell-Bindung

Für die Arbeiten zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius des HI-Virus und der Virus-Zell-Bindung wurde eine Eigenbau-Mikroskop unseres Kooperationspartners in Zusammenarbeit mit Thomas Endress und John Briggs in der Abteilung von Prof. Bräuchle genutzt. Die Basis bildete ein Weitfeldmikroskop Nikon Te300. Die Anregung erfolgte mit Lasern der Wellenlängen 477 nm bzw. 532 nm. Als Objektiv wurde ein Ölimmersionsobjektiv 100 x DIC mit einer numerischen Apertur (N.A.) von 1,4 (Nikon) verwendet. Die Anregung erfolgt mit beiden Wellenlängen gleichzeitig und die Auftrennung von Emissionslicht und Anregungslicht erfolgte über einen Dichroiten (AHF Analysetechnik, F53-007). Da das emittierte Fluoreszenzlicht beider Fluorophore überlagert war, wurde das Emissionslicht durch einen Dichroiten (AHF Analysetechnik 580 DCXR) aufgespalten und auf zwei Bereiche des CCD-Chips der Kamera (I-PentaMax, Princeton Instruments) abgebildet. Dies erlaubte die simultane Beobachtung beider Fluorophore mit Zeitaufösungen von bis zu 100 Hz. Die beiden Bildhälften wurden zur Analyse wieder überlagert. Die Seitenlänge eines Pixels betrug 156 nm. Die Signalposition wurde in Metamorph unter Verwendung einer 2D-Gauss-Anpassung bis auf 40 nm genau bestimmt.

7.8.5 Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Viruspartikeln in Suspension

Die Größenverteilung der Partikel wurde durch Analyse der Mobilität der Viruspartikel unter Berücksichtigung der Diffusionstheorie bestimmt. Im Experiment wurden Viruspartikel verdünnt in verschiedenen Flüssigkeiten (Tris-Puffer oder 10 % (v/v) Glycerin in bidest. Wasser) verwendet und die Trajektorien der Viruspartikel aufgezeichnet. Dies war die Grundlage zur Berechnung des Verschiebungsquadrats r^2 . Die Distanz, die ein Partikel in zwei aufeinander folgenden Aufnahmen des Films zurückgelegt hat, wurde bestimmt und quadriert. Diese Werte wurden in aufsteigender Reihenfolge sortiert und anschließend akkumuliert, um so die akkumulierte Häufigkeitsfunktion $P(r^2, t)$ zu bilden. Diese Funktion wurde dann mit einem Zweikomponenten-Modell gefittet:

$$P(r^2, t) = 1 - \left[\alpha e^{\frac{-r^2}{\langle r_1^2 \rangle}} + (1 - \alpha) e^{\frac{-r^2}{\langle r_2^2 \rangle}} \right]$$

wobei α den Anteil der ersten Komponente an der Gesamtheit und $\langle r_i^2 \rangle$ das mittlere Verschiebungsquadrat der i -ten Komponente beschrieb. Die akkumulierte Häufigkeitsfunktion wurde für längere Zeitintervalle berechnet. Anschaulich betrachtet, wurde nun das Verschiebungsquadrat nicht mehr für die Distanz zwischen jedem Bild eines Films, sondern nur noch jedes zweite, dritte usw. ermittelt. Die daraus gebildete akkumulierte Häufigkeitsfunktion wurde gefittet und das mittlere Verschiebungsquadrat der Hauptkomponente gegen das Zeitintervall Δt aufgetragen und linear gefittet. Die Linearität dieses MSD-Plots (mittleres Verschiebungsquadrat, *mean square displacement*) deutete auf eine freie Diffusion (Brown'sche Bewegung) hin und konnte daher unter der Annahme einer freien Diffusion in der Ebene mit

$$\langle r_1^2 \rangle = 4Dt$$

mit D als dem gesuchten Diffusionskoeffizienten und t als Zeitintervall gefittet werden. Die Diffusion fand zwar im dreidimensionalen Raum statt, jedoch war das Mikroskopbild nur die zweidimensionale Projektion der Bewegung eines Partikels, der sich innerhalb des Schärfebereichs des Objektivs, also mit begrenzter Auflösung in der z -Achse, bewegte. Da sich im Mikroskopbild die z -Position nicht durch Veränderungen der x - und y -Position, sondern nur in einer Signalverbreiterung niederschlug, die in der Auswertung nicht bewertet werden konnte, galt der zweidimensionale Fall. Hieraus ergab sich nach Mittelung über mehrere Experimente ein Diffusionskoeffizient D von $1,78 \pm 0,11 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Da es sich bei HI-Viren um sphärische Partikel handelte, spiegelte der hydrodynamische Radius den Partikelradius wider. Mittels der Stokes-Einstein-Gleichung

$$R = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

mit k als Boltzmann Konstante, T als Temperatur und η als Viskosität des Tris Puffers mit 12 % Volumenprozent Tris und pH 7.4, in dem diese Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt wurden.

7.8.6 Bestimmung der Virusbindung und Virus-Zell-Kontaktzeit

Die verschiedenen Zelllinien wurden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Kammer eines 8-Kammer-Deckglases (Nunc) ausgesät und am folgenden Tag für Experimente verwendet. Hierzu wurde das Kulturmedium abgezogen und durch CO_2 -unabhängiges Medium (Invitrogen) oder PBS mit 1 mM Kalziumchlorid und 0,5 mM Magnesiumchlorid ersetzt und die Viruspartikel entsprechend 60 ng p24, bestimmt mittels ELISA, zugesetzt.

Ein Kontakt eines Viruspartikels mit der Plasmamembran wurde über zwei Kriterien definiert: (I) das Viruspartikel kam bis auf einen Pixel der Zellmembran, ermittelt über ein direkt vor der Bildsequenz aufgenommenes Durchlichtbild, nahe. (II) Es kam zu einer Änderung in der Bewegungsrichtung des Partikels, die über mehr als 6 Pixel (936 nm) anhielt. Ein Partikel wurde als an der Plasmamembran immobilisiert betrachtet, wenn er sich nach seiner Anheftung an die Plasmamembran bis zum Ende der Bildsequenz um nicht mehr als 2 Pixel (312 nm) bewegte.

7.9 Lebendzellmikroskopie zur Detektion intrazellulärer Viruspartikel

Zur Bestimmung der Eigenschaften intrazellulärer Viruspartikel wurde das Weitfeldmikroskop Zeiss 200 M (7.8.2) verwendet. HeLaP4-Zellen mit niedriger, diffuser zellulärer Autofluoreszenz, kultiviert in Hybridomed 1000F, wurden am Vortag der Messung in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Kammer eines 8-Kammer-Deckglases (Labtek, Nunc) ausgesät. Die Glasoberfläche wurde hierzu mit Collagen-Gebrauchslösung (Biochrome) 20 min bei Raumtemperatur beschichtet und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden trypsinisiert, die Reaktion durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor in PBS (0,2 mg/ml PBS, Sigma) abgestoppt und in einem Volumen von 300 μl Hybridomed 1000F in die Kammer gegeben. Die Zellen wurden am Folgetag für die Messung verwendet. Kurz vor der Messung wurde das Medium durch PBS mit 1 mM Kalziumchlorid und 0,5 mM Magnesiumchlorid ersetzt und Zellen zur Kontrolle der Autofluoreszenz dokumentiert. Danach wurden die Viruspartikel (entsprechend ca. 60 ng p24) hinzugefügt und die Messung sofort begonnen. Die EMCCD-Kamera Cascade II (Roper Scientific) wurde im *stream*-Modus von Metamorph bei maximaler Verstärkung betrieben. Nach einer Sequenz von 400 Aufnahmen mit 50 ms Belichtungszeit je Fluorophor, resultierend in einer 40 s Sequenz mit einer Belichtungszeit von 100 ms je Zweifarbenbild (Grün/Rot), wurde eine neue Zelle bzw. Zellgruppe aufgesucht. Dies war notwendig, da das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzsignale durch

ungleichmäßiges Ausbleichen der beiden Fluorophore sonst verändert würde. Die Analyse der Bildsequenzen erfolgte mit MetaMorph, ImageJ oder der entwickelten Tracking-Software.

7.9.1 Bestimmung des Doppelmarkierungsgrads und Analyse der Partikelzahl nach Tritonbehandlung

Zur Bestimmung des Doppelmarkierungsgrads wurden Viruspartikel in PBS verdünnt und in Labtek-Kammern (Nunc) für 15 min inkubiert, so dass die Viruspartikel an die Glassoberfläche binden konnten. Das Medium wurde abgenommen, um ungebundene Viruspartikel zu entfernen, und frisches PBS zugegeben. Es wurde auf Viruspartikel fokussiert und das Sichtfeld verschoben, so dass nur ungebleichte Viruspartikel aufgenommen wurden. Um leichte Fokusunterschiede bedingt durch chromatische Abberation auszugleichen, wurden z-Stapel mit 0,1 μm Abstand aufgenommen. Das schärfste Bild aus jedem Stapel wurde identifiziert, da es die maximale Standardabweichung im Bildstapel aufwies, und mittels ImageJ analysiert. Hierzu wurden manuell die Partikel im roten und grünen Kanal markiert und die Intensität in jedem Kanal in einem Kreis von 5 Pixeln Radius um das manuell gefundene Zentrum aufgezeichnet. Es wurden mindestens 500 Partikel je Präparation ausgewertet. Der Hintergrund wurde als Mittelwert durch 100 Messungen an Positionen, wo keine Partikel sichtbar waren ermittelt. Ein Partikel wurde als einfach-fluoreszenzmarkiert gewertet, wenn die Fluoreszenzintensität in einem Kanal unterhalb der Summe des Mittelwertes der Hintergrundintensität addiert mit einer Standardabweichung der Hintergrundintensität war.

Die Auswertung der Partikelanzahl bei Experimenten mit Triton X-100-Behandlung von Viruspartikeln erfolgte mittels eines modifizierten ImageJ Makros (ursprüngliche Version von John Briggs), das Signale im Bild automatisch auffinden konnte. Hierzu wurden zuerst eine Mittelwertbildung über drei Ebenen des z-Stapels vorgenommen und anschließend eine Maximumsprojektion ausgeführt. Die Signale wurden über einen Schwellenwert vom Hintergrund separiert und ihr Mittelpunkt bestimmt. Bei Experimenten mit Triton X-100 war ein diffuser Hintergrund auf dem Deckglas sichtbar, so dass der Schwellenwert manuell so gewählt wurde, dass der Hintergrund von der Messung ausgeschlossen war. Zusätzlich wurde jede Analyse manuell überprüft, ob die Signale korrekt identifiziert wurden. Die Intensität der Signale wurde wie oben beschrieben bestimmt. Der Hintergrund wurde jedoch nicht separat bestimmt, sondern über einen Ring von 3 Pixeln um den Messkreis, wodurch der lokale Hintergrund ermittelt werden konnte.

7.10 Fluoreszenzmarkierung von Viruspartikeln mit GPI-AGT-Tag

Die Viruspartikel wurden wie in 7.7.4 beschrieben durch Transfektion von 293T-Zellen mit pCHIV, pCHIV.mCherry und pGPI-AGT hergestellt und aufgereinigt. Viruspartikel entsprechend 1 μg p24 wurden in 500 μl PBS mit 50 nM BG-Fluorescein (Covalys), gelöst in DMSO (finale DMSO-Konzentration 1 %), für 30 min bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken inkubiert. Freier Farbstoff wurde durch Ultrazentrifugation für 40 min bei 41.000 Upm im Rotor SW60 durch ein 1 ml Sucrosekissen (20 % (w/w) in PBS) abgetrennt. Das Pellet wurde in 50 μl PBS mit 10 % FKS und 10 mM Hepes pH 7,3 aufgenommen und für die Mikroskopie verwendet.

7.11 Experimente mit Liposomen

7.11.1 Herstellung von *Small Unilamellar Vesicles*

Kleine Liposomen (*Small Unilamellar Vesicles*, SUV) mit einem Durchmesser von ca. 50 nm wurden durch Sonifikation hergestellt. Hierzu wurden insgesamt 2,5 μmol Lipid bestehend aus DOPC und POPS in einem 1:1 Verhältnis gelöst in Chloroform unter Stickstoffstrom in einem Glasgefäß eingetrocknet und mit 1 ml 1/20-MT-Puffer versetzt. Nun wurde mit einem Tip-Sonikator solange sonifiziert, bis erst eine trübe und dann eine klare Suspension entstand. Die Lipidsuspension wurde während der Sonifikation regelmäßig auf Eis gekühlt, um eine Erwärmung über 50°C zu vermeiden.

7.11.2 Herstellung von *Giant Unilamellar Vesicles*

Gigantische unilamellare Liposomen (*Giant Unilamellar Vesicles*, GUV) mit einem Durchmesser von $>10 \mu\text{m}$ wurden durch Elektroformation (Angelova und Dimitrov, 1986) hergestellt. Dazu wurde ein Lipidmix mit einer Konzentration 15 mM bestehend aus 89,9 % POPC und 10 % DOPS mit 0,1 mol% DiD (nur für FCS-Messungen) in Chloroform hergestellt. 75 nmol Lipid wurden auf zwei ITO-*(Indium Tin Oxide)* beschichtete Deckgläser aufgetragen. Die Lipide wurden auf einem Heizblock bei 50°C eingetrocknet und die Deckgläser gegenüberliegend in eine Apparatur eingebaut, die das Einspülen von Pufferlösungen erlaubte. Die Kammer wurde mit 1/20-MT-Puffer befüllt und eine Wechselspannung mit 10 Hz und 1,2 V angelegt. Die GUVs wurden für 2 h geschwollen und anschließend erfolgte der Austausch des Puffers 1/20-MT durch den Assaypuffer MT150 (pH 7,5).

Die Herstellung der GUVs für Experimente mit R18-fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln erfolgte in einer Apparatur mit Platindrähten statt ITO-Elektroden. Es wurden pro Experiment 15 nmol Lipid in einem Volumen von 400 μl Puffer eingesetzt.

7.11.3 Messung der Fluoreszenzsignalen im Lumen der GUVs mittels FCS

Zur Messung von Signalen im Lumen der GUVs wurde die in 7.11.2 hergestellten GUVs mit Virussuspensionen von VSV-G pseudotypisierte Viruspartikel mit 500 ng p24 für 30 min bei Raumtemperatur in Puffer MT (pH 7,5) inkubiert, um eine Verbindung zu ermöglichen.

Der Puffer wurde nun gegen den Puffer MT (pH 6,0) ausgetauscht, um die Fusion zu starten und die Kammer zusätzlich für 15 min auf 37°C erwärmt. Nach 15 min Abkühlung wurde der Puffer gegen den Puffer MT (pH 7,5) ausgetauscht, um pH-Effekte auf die Fluorophore zu vermeiden, und die Kammer in das FCS-Mikroskop (Zeiss Confocor 2, 3 oder Eigenbau von Wolfgang Staroske, TU Dresden) eingesetzt. Das Mikroskop wurde vor der Messung mit Alexa Fluor 488 und TMR (Tetramethylrhodamin) kalibriert. Es wurden Messungen sowohl im Lumen der GUVs, als auch an der Membran und in Lösung durchgeführt. Pro Kammer wurden 10-30 GUVs im Lumen auf (subvirale) Viruspartikel untersucht.

7.11.4 R18-Markierung von Viren und Detektion des Dequenching im Fluoreszenzspektrometer

Viruspartikel wurden mit R18 (Octadecyl-rhodamin-B-Chlorid) gefärbt, indem 1 μg Viruspartikel in 500 μl PBS mit 21 μM R18 in PBS für 30 min unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Das R18 war in 100 % Ethanol gelöst und die Ethanolkonzentration in der Viruslösung betrug final 0,5 %. Freier Farbstoff wurde durch Gelfiltration (Sephadex G75, Sigma) in einer Säule von 21 cm Höhe und 1 cm Durchmesser

abgetrennt. Die Säule wurde mit Puffer MT150 (pH 7,5) equilibriert und die Elution erfolgte mit dem gleichen Puffer in 500 μ l Fraktionen. Die *Peak*-Fraktionen wurden durch Messung einer 1:10 Verdünnung im Fluoreszenzspektrometer (TECAN Sapphire) bestimmt und die beiden Fraktionen mit der höchsten Fluoreszenz verwendet. Die Messung des Dequenchings von R18 erfolgte im Fluoreszenzspektrometer (Aminco) in einem Gesamtvolumen von 1 ml unter leichtem Rühren, um eine gleichmäßige Mischung herzustellen. Zuerst wurde der Puffer vorgelegt, dann die SUVs oder GUVs (20 bzw. 10 nmol Lipid) hinzugegeben. Nach Zugabe von R18-fluoreszenzmarkierten VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln (entsprechend ca. 5 - 10 ng p24) wurde der pH-Wert durch Zugabe von 16 μ l 1 N Salzsäure auf pH 6,0 abgesenkt. Die Messung wurde beginnend mit reinem Puffer über alle Zugaben aufgezeichnet. Die Anregung des R18 erfolgte bei 560 nm und die Detektion des Emissionslichts bei 585 nm (Bandpass 4 nm). Die Spannung der Verstärker variierte (je nach Signalstärke) zwischen 750 und 1.000 V. Zu Ermittlung der Fusionsrate wurde das Fusionsignal auf das jeweilige Endsignal (erhalten durch Detergenzlyse) normiert nach

$$F_{\text{normiert}} [\%] = \left[\frac{(F - F_{\text{min}})}{(F_{\text{max}} - F_{\text{min}})} \right] * 100$$

wobei F das jeweilige gemessene Fluoreszenzsignal, F_{min} die minimale Fluoreszenzintensität bzw. F_{max} die maximale Fluoreszenzintensität der Messung darstellen.

8 Ergebnisse

Die experimentellen Ergebnisse werden wie folgt gegliedert: Zuerst wird das verwendete System zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion einer Virus-Zell-Fusion erläutert, danach die dazu verwendeten Plasmide und Zelllinien besprochen. Anschließend folgen die Charakterisierung der zweifarbig markierten Viruspartikel und die Auswahl der für unsere Zwecke optimalen Mikroskoptechnik. Die Interaktion zwischen HI-Viruspartikeln und VSV-G-pseudotypisierten HI-Viruspartikeln mit Wirtszellen wird ausführlich beschrieben. Weitergehend folgt die Darstellung der zur Datenauswertung entwickelten Tracking-Software. Abschließend wird ein *in vitro* Fusionssystem auf Basis großer Liposomen (*Giant Unilamellar Vesicles*) erläutert.

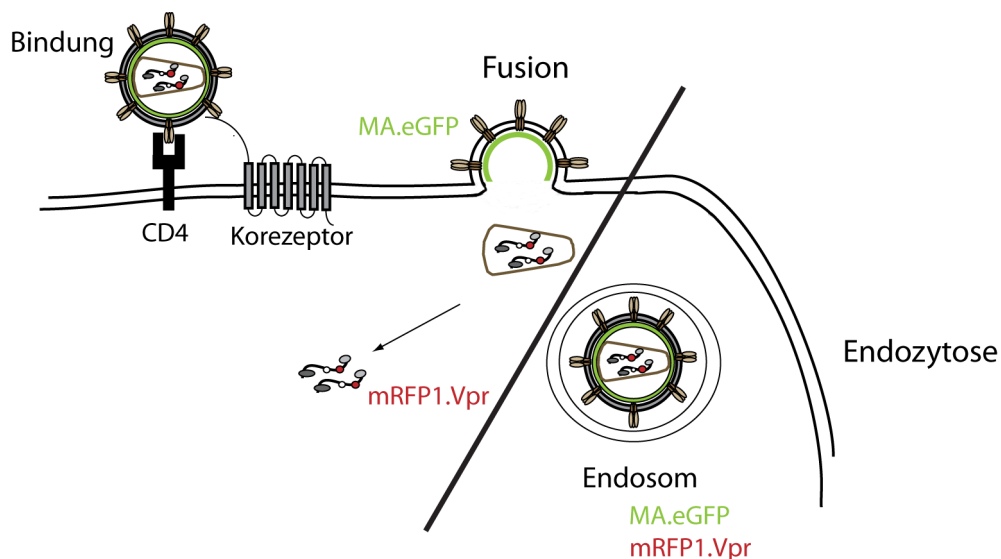


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Detektionssystems zur Virus-Zell-Fusion. Bei der Fusion des Viruspartikels an der Plasmamembran sollten sich das MA.eGFP-Signal und das mRFP1.Vpr-Signal trennen, so dass ein einfarbiges subvirales Partikel entsteht. Im Gegensatz dazu bleibt ein über Endozytose aufgenommenes Viruspartikel zweifarbig.

Zielstellung dieser Arbeit war es, die kinetischen Vorgänge der Virusfusion in Echtzeit auf Einzelpartikelebene mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden zu studieren. Dafür war es essentiell, ein eindeutig detektierbares Signal zu erzeugen, das den Zeitpunkt der Membranfusion definierte. Um subvirale Viruspartikel, die an einer Membran fusioniert hatten, von kompletten Partikeln, die sich noch außen an der Plasmamembran und im Endosom befanden, unterscheiden zu können, sollten die Viruspartikel mit zwei spektral verschiedenen Fluorophoren so markiert werden, dass eines der Fluorophore bei der Fusion verloren ging (Abbildung 6). Hierzu wurde die Kombination zweier fluoreszenzmarkierter Markerproteine gewählt. Ein fluoreszenzmarkiertes Vpr wurde bereits als adäquater Marker

für den subviralen Komplex nach Fusion beschrieben (McDonald *et al.*, 2002). Der zweite Marker war das virale MA-Protein, das unterhalb der Lipidmembran lokalisiert ist. MA wird nicht (in größeren Mengen) in das Kapsid eingebaut. Die Matrixhülle verbleibt nach der Fusion entweder an der Plasmamembran oder diffundiert in Bruchstücken in das Zytosol, wenn der Myristylanker des MA nicht mehr in die Lipidmembran des Virus inseriert ist („Myristyl-Switch“ bei Reifung des Virus) (Spearman *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2004).

In unserer Abteilung wurde ein infektiöses HIV-Derivat entwickelt, das ein fluoreszenzmarkiertes Matrixprotein enthält (Muller *et al.*, 2004) (Abbildung 7). Der Einbau von MA.eGFP in das Virion erfolgte als Gag.eGFP Vorläuferprotein, das bei der Virusreifung durch die virale Protease gespalten wird. Allerdings wurde für mit MA.eGFP markierte Viren gezeigt, dass ihre spezifische Infektiosität ca. 100fach gegenüber dem Wildtyp reduziert ist. Wird jedoch ein provirales wt-Plasmid im Verhältnis 1:1 mit dem für MA.eGFP kodierenden proviralen Plasmid kotransfiziert, so erreicht die Infektiosität wieder Wildtyp-Niveau. Folglich wurden diese beiden proviralen Plasmide in Kombination eingesetzt, um eine effiziente Virusfusion sicherzustellen (Muller *et al.*, 2004).

Erste Experimente zur Detektion von Farbtrennungseignissen mit nicht-infektiösen aber fusionskompetenten Viruspartikeln, die mit Ma.CFP und YFP.Vpr markiert waren, brachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da die Fluorophore während der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung schnell ausbleichen und aufgrund der spektralen Überlappung ihrer Emissionsspektren die Detektion einer eindeutigen Farbtrennung nicht möglich war (durchgeführt von Barbara Müller und Thomas Endress).

Daher sollten fluoreszenzmarkierte Viruspartikel hergestellt werden, deren Fluorophore eine verbesserte spektrale Trennung aufwiesen. Die Kombination von eGFP, einem Fluorophor mit Emission im grünen Spektralbereich (Emissionsmaximum bei 509 nm), und mRFP1, einem Fluorophor mit Emission im roten Bereich (Emissionsmaximum bei 611 nm), sollte dies ermöglichen. Weiterhin besitzen die Fluorophore eGFP und mRFP1 verglichen mit anderen fluoreszierenden Proteinen eine gute Quantenausbeute und bleichen langsamer aus als CFP oder YFP.

Das Fusionsprotein mRFP1.Vpr stand noch nicht zur Verfügung. Daher musste das für dieses Protein kodierende Plasmid kloniert werden.

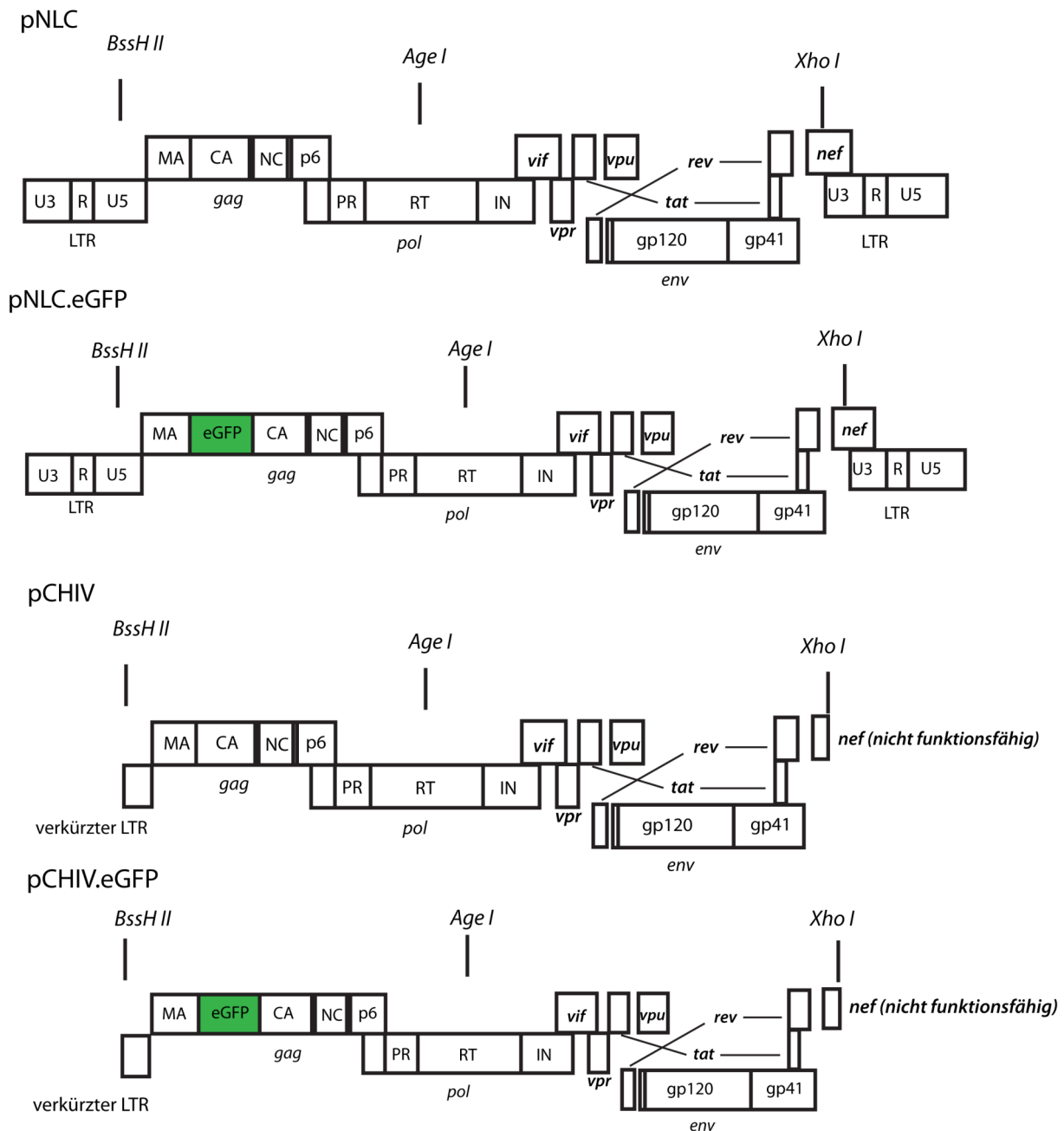


Abbildung 7: Schematische Darstellung verwendeter proviraler Plasmide. Die Plasmide pNLC und pNLC.eGFP kodieren für replikationskompetente Viren. Die an den Restriktionsschnittstellen *BssH II* und *Xho I* verkürzten offenen Leseraster, kodieren für fusionskompetente aber nicht mehr zur Reversen Transkription fähige Viruspartikel. Letztere Plasmide wurden zur Herstellung der Viruspartikel für mikroskopische Experimente verwendet.

8.1 Verfügbare provirale Plasmide

Für die Herstellung von Viruspartikeln standen provirale Plasmide basierend auf dem Virusklon NL4-3 (Adachi *et al.*, 1986) zur Verfügung. Für die Produktion von infektiösen Viren wurden die Plasmide pNLC bzw. pNLC.eGFP verwendet (Abbildung 7). Diese kodierten für alle viralen Proteine und das Vollängen-RNA-Genom des Virus, so dass Viruspartikel, die durch Transfektion mit diesen Plasmiden hergestellt wurden, ihre

genetische Information in das Genom einer geeigneten Wirtszellen integrieren konnten und erneut replikationskompetente Viren in diesen Zellen produziert wurden. Diese Konstrukte sind in die Sicherheitsstufe S3 nach GenTG einzuordnen und wurden nicht für mikroskopische Lebendzelleexperimente verwendet.

Für die Produktion von fluoreszenzmarkierten, nicht replikationskompetenten aber fusionskompetenten Viren standen verschiedene provirale Plasmide zu Verfügung. Es handelte sich hierbei um die Plasmide pCHIV und pCHIV.eGFP für die Produktion von virusähnlichen Partikeln und ihre schwächer exprimierenden Vorläuferkonstrukte pKHIV und pKHIV.eGFP (Bohne und Krausslich, 2004; Muller *et al.*, 2004). Die proviralen Plasmide pKHIV und pKHIV.eGFP bzw. pCHIV und pCHIV.eGFP unterscheiden sich im Plasmidrückgrat. pCHIV und pCHIV.eGFP basierten auf dem Vektor pcDNA3.1(Zeo)-minus (Stratagene), der eine effektivere Translation ermöglichte als das pKHIV-Rückgrat (Bohne und Kräusslich 2004). In beiden Varianten fehlten große Teile der LTR-Regionen in der proviralen Sequenz (Abbildung 7), so dass nach Transfektion in 293T-Produzentenzellen die freigesetzten Viruspartikel keine funktionellen LTR-Regionen mehr aufwiesen. Somit war nach Eintritt in eine Zielzelle keine reverse Transkription mehr möglich und damit der Infektionszyklus unterbrochen.

8.2 Klonierung von pmRFP1.Vpr

Zur Produktion zweifarbig fluoreszenzmarkierter Viruspartikel standen alle Plasmide mit Ausnahme eines Plasmids kodierend für ein Fusionsprotein aus mRFP1 und Vpr zur Verfügung. Zur Herstellung des Plasmids pmRFP1.Vpr wurde das Ausgangsplasmid peGFP.Vpr (McDonald *et al.*, 2002) verwendet, in dem die kodierende Sequenz von eGFP gegen die Sequenz kodierend für mRFP1 ausgetauscht wurde. Die Restriktion des hergestellten Plasmids pmRFP1.Vpr zeigte im analytischen Agarosegel die erwarteten Banden (Abbildung 8).

Nach Transfektion des Plasmids pmRFP1.Vpr in 293T Zellen konnte nach 18 h eine rote Fluoreszenz detektiert werden. Die Westernblotanalyse des Zelllysats mit einem gegen Vpr gerichteten Antikörper ergab die erwartete Bande bei apparenten 39 kDa (Vpr 14 kDa und mRFP1 25 kDa) (Daten nicht gezeigt).

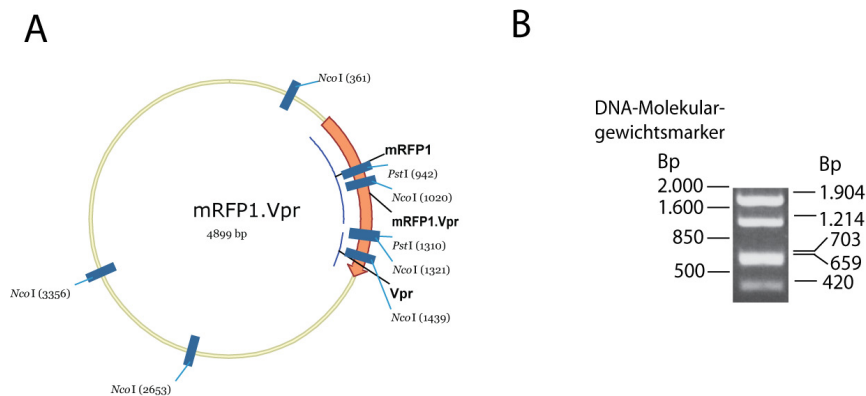


Abbildung 8: Plasmidkarte (A) und Kontrollrestriktion (B) des hergestellten Plasmids pmRFP1.Vpr. Die Restriktion mit *NcoI* ergab die erwarteten Banden (420, 659, 703, 1214 und 1904 bp).

8.3 Zelllinien

Die Hauptzielzelle von HIV *in vivo* ist die CD4-positive T-Zelle. Primäre CD4-positive T-Zellen können aus humanem Blut isoliert werden. Es treten jedoch zwischen den einzelnen Spendern große Schwankungen in Bezug auf die Infizierbarkeit der Zellen auf. Diese treten jedoch bei immortalisierten T-Zellen nicht auf. T-Zellen weisen generell verschiedene Nachteile für die lichtmikroskopische Verwendung auf. Hierzu gehört ein geringes Zytosolvolumen, das sich lediglich auf einige Mikrometer zwischen Plasmamembran und Zellkern erstreckt. Dieses erschwert die fluoreszenzmikroskopische Detektion von subviralen Partikeln nach Fusion, da die Zellmembran im Durchlichtbild nur auf ca. 1 μm genau lokalisiert werden kann. Weiterhin handelt es sich bei T-Zellen um Suspensionszellen, die zur Mikroskopie erst am Deckglas immobilisiert werden müssen.

Die Modellzelllinie für die anfänglichen Experimente der Virus-Zell-Interaktion sollte daher eine adhärente, mit HIV infizierbare Zelllinie sein, die ein großes Zytosolvolumen aufwies. Unsere Wahl fiel auf die in zahlreichen Studien zum HI-Viruseintritt eingesetzte Zelllinie HeLaP4 (Charneau *et al.*, 1992; Daecke *et al.*, 2005; Marechal *et al.*, 1998). Diese Zelllinie wurde aus HeLa-Zellen (Scherer *et al.*, 1953) abgeleitet und u.a. mit dem CD4-Rezeptor und dem CXCR4-Korezeptor stabil transfiziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die meisten mikroskopischen Untersuchungen an HeLaP4-Zellen durchgeführt. Für bestimmte Fragestellungen wurden jedoch auch andere Zelllinien eingesetzt. Ergänzend zu HeLaP4-Zellen wurden die HeLa-Derivate JC53 (Platt *et al.*, 1998) und RC25 (Trkola *et al.*, 2002) verwendet. JC53-Zellen wiesen eine deutlich höhere CD4-Konzentration auf der Zelloberfläche auf als HeLaP4-Zellen, wohingegen bei RC25-

Zellen die CXCR4-Korezeptorkonzentration auf der Plasmamembran erhöht und die CD4-Konzentration im Vergleich zu JC53-Zellen reduziert war. Für Infektionsexperimente wurden TZM-Zellen (Wei *et al.*, 2002) bevorzugt, die ein Luciferase-Reportergen unter Kontrolle der viralen LTR-Promotoren besaßen. Wird eine TZM-Zelle mit HIV infiziert, steigert das virale Tat-Protein die Transkription der den LTR nachgeschalteten Gene und damit auch des Luciferasegens. Die Infektionseffizienz konnte somit über die Luciferase-Aktivität bestimmt werden.

Für die Untersuchung der Virusbindung (8.7.3) wurden verschiedene CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-Derivate herangezogen. In Hamsterzellen ist kein Viruseintritt möglich, da die humanen Rezeptoren CD4 und CXCR4 bzw. CCR5 nicht exprimiert werden. Eine effiziente Virusproduktion von HI-Viren, z.B. nach Transfektion von proviralen Plasmiden, ist in Hamsterzellen aufgrund mehrerer z.T. nicht identifizierter Blockaden nicht möglich (van Maanen und Sutton, 2003). Allerdings können mit CD4- und Korezeptor stabil transfizierte CHO-Zellen für Viruseintritts- und Virusbindungsstudien verwendet werden (Zhang *et al.*, 2002). Zusätzlich zu den parentalen CHO K1-Zellen und ihren mit CD4 und CXCR4 stabil transfizierten Derivate (CHO K1 CD4 X4) wurden in dieser Arbeit CHO-Derivate verwendet, die einen Defekt im Heparansulfatstoffwechsel aufweisen. Die pgsA745-Zellen tragen keine Heparansulfat-Proteoglykane auf der Zelloberfläche und waren auch als mit CD4- und CXCR4-stabil transfizierte Derivate (pgsA745 CD4 X4) verfügbar (Zhang *et al.*, 2002).

8.4 Zelluläre Autofluoreszenz

Die als Modellzelllinie verwendeten HeLaP4-Zellen sowie auch HeLa RC25-, HeLa JC53-, TZM-Zellen und die beschriebenen CHO-Derivate zeigten eine starke, multispektrale Autofluoreszenz, die in punktförmigen Strukturen im Zytosol lokalisierte (Abbildung 9). Die Signalintensität dieser Strukturen war ähnlich hoch wie die von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln und konnte von diesen nur schwer unterschieden werden. Im Gegensatz zu Viruspartikeln war jedoch die Autofluoreszenz auch im ultravioletten und im nahen infraroten Bereich zu detektieren.

8.4.1 Ursachen der zellulären Autofluoreszenz

Um die Ursache der zellulären Autofluoreszenz zu identifizieren, sollte diese spektral charakterisiert werden. Die Autofluoreszenz trat in Form von punktförmigen Fluoreszenzsignalen im Zytosol auf. Die genaue Analyse der spektralen Eigenschaften

einzelner autofluoreszenter Signale war technisch nicht möglich, da kein Spektralfluorimeter zur Verfügung stand, das in ein konfokales Mikroskop eingekoppelt werden konnte.

Alternativ wäre die Analyse der gesamten Zellpopulation im Fluoreszenzspektrometer denkbar, wobei jedoch auch diejenigen fluoreszierenden Stoffwechselprodukte, die diffus im gesamten Zytosol verbreitet sind, detektiert würden und dadurch die spektrale Analyse verfälschen könnten. Deshalb wurde mittels verschiedener Filtersätze das Excitations- und Emissionsspektrum der punktierten Autofluoreszenz mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (Zeiss LSM 510 und Leica SP2 AOBS) abgeschätzt. Die fluoreszierende(n) Substanz(en) konnten mit Wellenlängen von 405, 454, 488, 514, 543 und 633 nm angeregt werden. Die Detektion von Fluoreszenzlicht war im Bereich von 430 nm bis über 670 nm möglich.

Tabelle 1: Aufstellung verschiedener Quellen zellulärer Autofluoreszenz und ihrer spektralen Eigenschaften. Modifiziert nach (Billinton und Knight, 2001).

Allgemeine Autofluoreszenzquellen	Typische Excitationswellenlänge (nm)	Typische Emissionswellenlänge (nm)
Flavine	380 - 490	520 - 560
NADH und NADPH	360 - 390	440 - 470
Lipofuscin	360 - 647	430 - 670
Fortgeschrittene Endprodukte der Glykosylierung (<i>Advanced glycation end-products</i>)	320 - 370	385 - 450
Elastin und Kollagen	440 - 480	470 - 520

Die spektralen Eigenschaften deuteten auf eine Lipofuscin-ähnliche Autofluoreszenz hin (siehe Tabelle 1). Lipofuscin ist ein Sammelbegriff für eine bisher nicht näher charakterisierte Mischung aus Proteinen, Zuckern und Lipiden, die normalerweise in kleinen, punktförmigen intrazellulären Strukturen auftauchen und eine starke Fluoreszenz bei Anregung von 360 bis 670 nm aufweisen (Billinton und Knight, 2001). Lipofuscin findet sich hauptsächlich in Neuronen, Gliazellen und kardialen Muskelzellen, ist aber auch in anderen Zelltypen vorhanden. Lipofuscin wird unter oxidativem Stress, der z.B. durch Lichteinstrahlung hervorgerufen werden kann, verstärkt gebildet (Billinton und Knight, 2001). Deshalb wurde die Lichteinstrahlung während des Passagierens der Zellen minimiert und während der Messung Ascorbinsäure (1 mg/ml) zum Medium zugesetzt. Dies führte jedoch nicht zu einem Rückgang der Autofluoreszenz.

8.4.2 Spektrales Entmischen und Ausbleichen der Autofluoreszenz

Theoretisch wäre es möglich, die Autofluoreszenz aufgrund ihrer Emission im ultravioletten bzw. infraroten Bereich zu erkennen und das Autofluoreszenzsignal von den Aufnahmen im grünen bzw. roten Kanal, in denen die Viruspartikel detektiert werden, abzuziehen (*Spectral Unmixing*). Da die punktförmigen Autofluoreszenzsignale jedoch keine gleichmäßige spektrale Verteilung ihrer Fluoreszenzemission aufwiesen, war ein automatisches spektrales Entmischen der Aufnahmen nicht möglich. Es blieb daher nur die Möglichkeit, identifizierte Autofluoreszenzsignale zu markieren und von der weitergehenden Analyse auszuschließen. Dieses Verfahren könnte aufgrund der nicht vollständig stabilen Farbzusammensetzung der Autofluoreszenz zu Artefakten führen und wurde deshalb nicht weiterverfolgt.

Das Ausbleichen der Autofluoreszenz vor der eigentlichen Messung war keine Alternative, da diese resistenter gegen Ausbleichen war als die Viruspartikel und intensive Lichteinstahlung in Zellen apoptotische Prozesse auslösen kann (König, 2000).

Tabelle 2: Ausgetestete Zellkulturmedien zur Reduktion der punktierten Autofluoreszenz. + : gutes Wachstum, O : mäßiges Wachstum, - : kein Wachstum

Medium	Zelllinie	Diffuse Autofluoreszenz	Punktierte Autofluoreszenz	Zellwachstum
DMEM (10 % (v/v) FKS und Antibiotika)	HeLaP4, TZM	-	+	+ (Referenz für HeLaP4, TZM)
DMEM ohne Phenolrot (5 % (v/v) FKS, ohne Antibiotika)	HeLaP4	-	+	+
Hybridomed 1000F	HeLaP4, TZM	-	-	+ (nach Adaption)
Ultra Culture	HeLaP4, CHO 745 CD4	-	+	+ (HeLaP4) +/O (CHO)
Ultra CHO	HeLaP4, CHO 745 CD4	-	+	+ (CHO) +/O (HeLaP4)
ExVivo	HeLaP4, CHO 745 CD4	-	+	+ /O (HeLaP4) - (CHO)
Hams F12K mit 10 % (v/v) FKS und Antibiotika	CHO 745 CD4	-	+	+ (Referenz für CHO)

8.4.3 Reduktion der punktierten Autofluoreszenz

Es wurde angestrebt, die Ursache der Autofluoreszenz zu identifizieren und zu beheben, da weder eine spektrales Entmischen noch ein Ausbleichen der Autofluoreszenz möglich war.

Die punktierten Autofluoreszenzsignale könnten auf in Organellen angereicherte Zwischen- oder Endprodukte des zellulären Stoffwechsels zurückzuführen sein. Zu Substanzen, die von anderen bereits als autofluoreszenzverstärkend erkannt wurden und in den Zellstoffwechsel gelangen können, gehören Antibiotika und Phenolrot (persönliche Kommunikation mit Dr. Rainer Pepperkok, EMBL Heidelberg). Um den Einfluss dieser Komponenten zu untersuchen, wurden die Zellen für 7 Wochen in DMEM mit 5 % (v/v) FKS ohne Phenolrot und ohne Antibiotikazusatz kultiviert. Eine Reduzierung der Autofluoreszenz konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Da das fötale Kälberserum (FKS) einen in der Zusammensetzung schwer zu kontrollierenden Faktor darstellte, wurde überprüft, ob durch Verwendung sogenannter Serum-freier Medien, in denen die in FKS enthaltenen Wachstumsfaktoren und andere essentielle Proteine und Nährstoffe durch genau definierte Beimischungen von aufgereinigten Substanzen ersetzt werden, die Autofluoreszenz reduziert werden konnte. Hierzu wurde eine Reihe von Serum-freien Medien getestet (Tabelle 2), wobei außer HeLaP4-Zellen auch CHO-Derivate und TZM-Zellen in die Untersuchung mit einbezogen wurden. Nur die Kultivierung von HeLaP4-Zellen und TZM-Zellen in Hybridomed 1000F brachte eine Reduktion der Autofluoreszenz (7.7.2). Da das Medium Hybridomed 1000F für Suspensionszellen optimiert ist, hatten die Zellen Adaptionprobleme und viele Zellen rundeten sich während der Anpassungsphase ab und gingen in Suspension. Diese Subpopulation wurde durch den regelmäßigen Mediumwechsel entfernt, so dass mit Erreichen eines normalen Zellwachstums nur noch adhärenente Zellen mit normaler Morphologie kultiviert wurden (Abbildung 9).

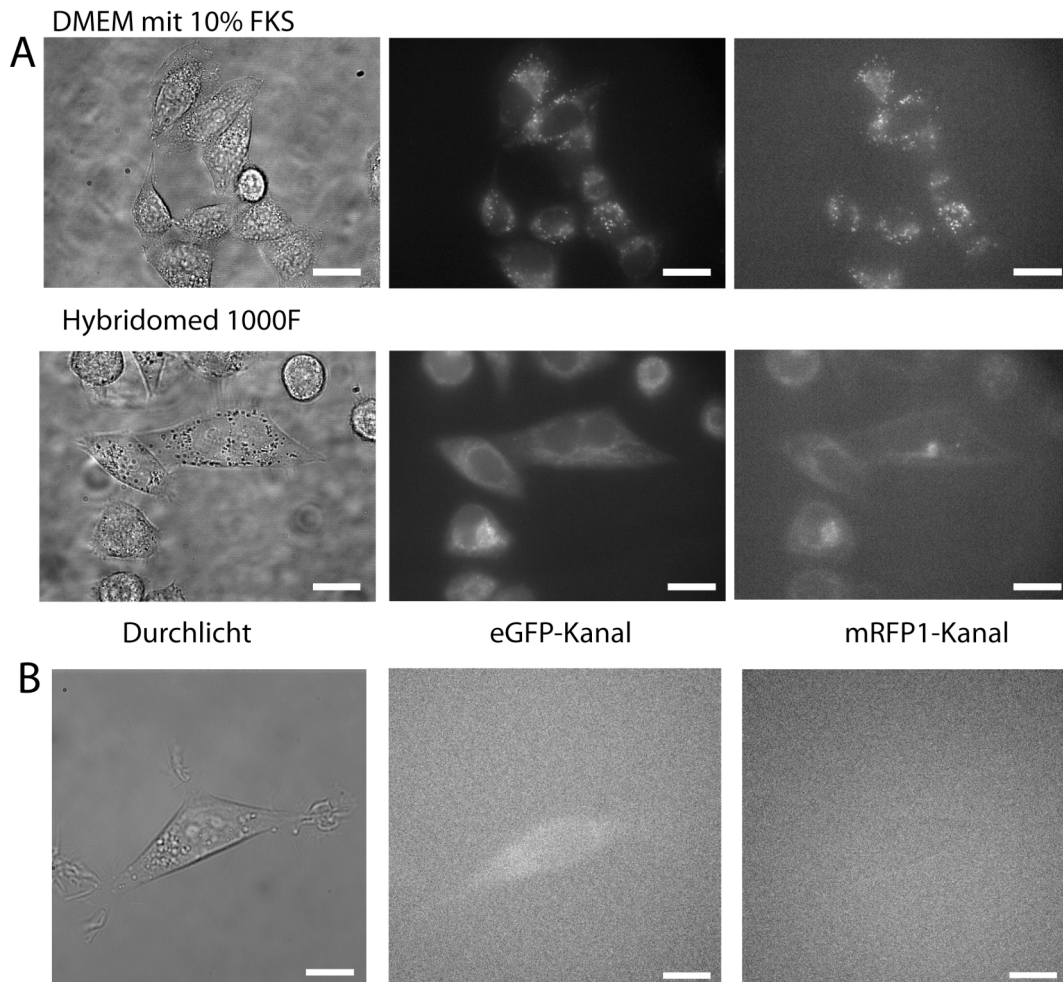


Abbildung 9: Zelluläre Autofluoreszenz von HeLaP4-Zellen. (A) HeLaP4-Zellen wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FKS und weiteren Zusätzen oder in Hybridomed 1000F kultiviert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Olympus IX80-Mikroskop (EMBL-Heidelberg, SIS-Kamera, Belichtungszeit 250 ms, 60 x Objektiv N.A. 1,45). (B) Nach längerer Kultivierung in Hybridomed 1000F wurden HeLaP4 erneut, diesmal unter den Aufnahmebedingungen für die Lebendzellmikroskopie (Zeiss Axiovert 200M mit Cascade II, 50 ms Belichtungszeit, 100 x Objektiv), auf ihre Autofluoreszenz untersucht. Maßstab in (A) 7 μ m bzw. 12 μ m in (B).

8.4.4 Charakterisierung der in Hybridomed 1000F kultivierten HeLaP4-Zellen

Im Folgenden wurden die autofluoreszenzreduzierten HeLaP4-Zellen im Hinblick auf die CD4-Dichte auf der Plasmamembran sowie die Infizierbarkeit vergleichend mit in DMEM kultivierten Zellen getestet, um eine Veränderung essentieller Funktionen für unsere Studien auszuschließen. Mit Durchflußzytometrie wurde nachgewiesen, dass die CD4-Rezeptordichte bei den in Hybridomed 1000F kultivierten HeLaP4-Zellen höher war als bei den in DMEM kultivierten Zellen (Abbildung 10). Die in Hybridomed 1000F kultivierten Zellen waren ca. 10fach besser mit NL4-3 Viren infizierbar als die in DMEM kultivierten HeLaP4-Zellen (Abbildung 10). Die Steigerung der Infizierbarkeit war möglicherweise auf die höhere CD4-Rezeptordichte bei den in Hybridomed 1000F kultivierten Zellen zurückzuführen.

Die in Hybridomed 1000F kultivierten Zellen waren somit infizierbar und zeigten weder in der Wachstumsrate noch morphologisch Unterschiede zu den in DMEM kultivierten Zellen. Allerdings erwiesen sich die in Hybridomed 1000F kultivierten HeLaP4-Zellen in späteren Experimenten als weniger stressresistent im Vergleich zu den in DMEM kultivierten Zellen. Sie reagierten auf starke Lichteinstrahlung oder kurzzeitigen Entzug des Kulturmediums (z.B. beim Mediumwechsel) schneller mit apoptotischen Prozessen als die in DMEM kultivierten Zellen. Dies war mikroskopisch als Abrunden, Ausbilden von Membranausstülpungen (*Blebben*) und Zellfragmentierung zu beobachten.

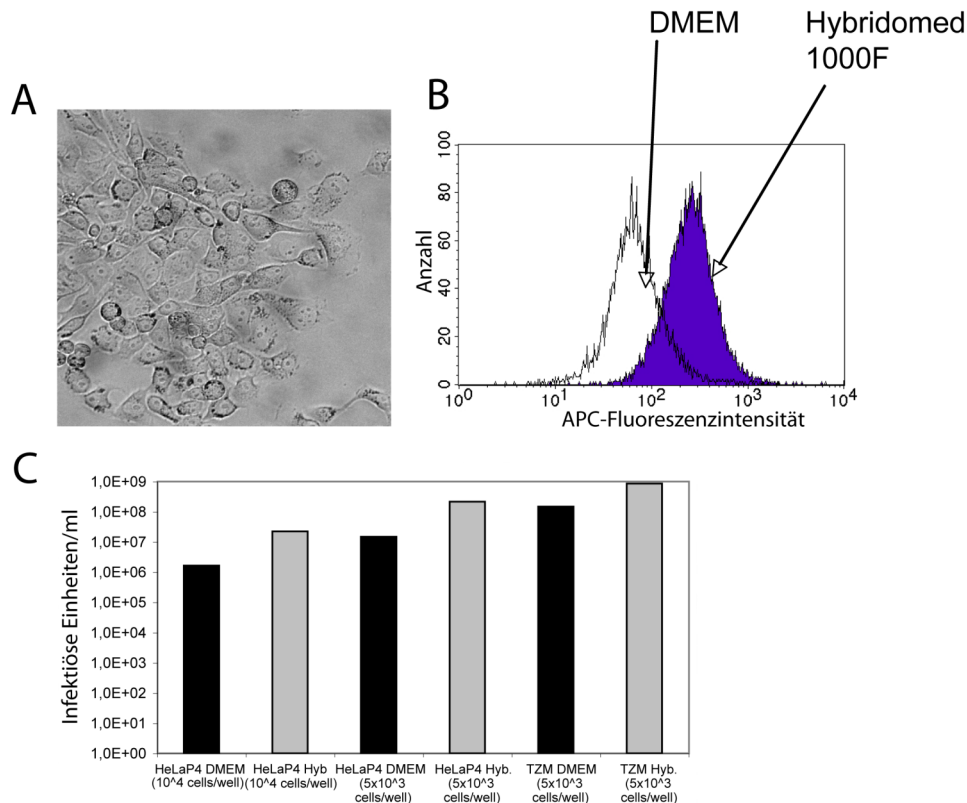


Abbildung 10: Charakterisierung von HeLaP4-Zellen kultiviert in Hybridomed 1000F im Vergleich zur Standardkultur in DMEM mit 10 % (v/v) FKS. (A) Morphologie der in Hybridomed 1000F kultivierten HeLaP4-Zellen. (B) Bestimmung der CD4-Oberflächenkonzentration von HeLaP4-Zellen kultiviert in Hybridomed 1000F und DMEM mit 10 % (v/v) FKS mittels Durchflußzytometrie (CD4-Nachweis mit einem APC-gekoppelten anti-CD4-Antikörper). (C) Infizierbarkeit der HeLaP4-Zellen kultiviert in Hybridomed 1000F im Vergleich zur Standardkultur. Zur Bestimmung der Infizierbarkeit wurde die Zellen mit gleichen Mengen NL4-3-Viren infiziert und die Zahl der infizierten Zellen 48 h nach Infektion mittels *BlueCell*-Assay (siehe auch Müller *et al.* 2004) ausgewertet. (Infektionsassay in (C) durchgeführt von Bärbel Glass.)

8.5 Charakterisierung zweifarbig fluoreszenzmarkierter Viruspartikel

8.5.1 Herstellung und virologisch-biochemische Analyse

Infektiöse zweifach-fluoreszenzmarkierte Viruspartikel wurden durch Kotransfektion der Plasmide pNLC, pNLC.eGFP und pmRFP1.Vpr hergestellt (molares Verhältnis: 1:1:0,4) (Abbildung 7). Diese Viruspartikel wurden zusammen mit wt-Viruspartikeln und den einfach

fluoreszenzmarkierten Varianten in Bezug auf die Proteinzusammensetzung und die Infektiosität untersucht (Abbildung 11). Verglichen zum Wildtyp wiesen die mittels Kotransfektion von pNLC und pNLC.eGFP hergestellten Viruspartikel eine Reduktion der Infektiosität um ca. 20 % auf. Eine vergleichbare Reduktion zeigten Viren, die mRFP1.Vpr enthielten. Die Infektiosität zweifarbig fluoreszenzmarkierter Viruspartikel war um ca. 80 % reduziert (Abbildung 11).

Die Proteinzusammensetzung der unterschiedlichen Viruspräparationen wurde durch Westernblot-Analyse untersucht. In allen Partikelpräparationen konnte das reife Matrix-Protein (17 kDa), aber auch noch der Vorläufer Gag (55 kDa) nachgewiesen werden. Bei Kotransfektion mit pNLC.eGFP wurden zusätzlich die Banden für MA.eGFP (45 kDa) und dessen Vorläufer Gag.eGFP (82 kDa) detektiert. Im Westernblot mit einem gegen Vpr gerichteten Antikörper konnte das native Vpr (14 kDa) in allen Proben detektiert werden. In den zusätzlich mit pmRFP1.Vpr transfizierten Proben war außerdem eine Bande bei 38 kDa zu erkennen, die mRFP1.Vpr repräsentierte, und eine Bande bei ca. 30 kDa, die vermutlich ein proteolytisches Abbauprodukt desselben darstellte.

Zur Überprüfung des Doppelmarkierungsgrads der infektiösen Viruspartikel wurden mit PFA inaktivierte Partikel an ein Deckglas gebunden und deren Fluoreszenz mikroskopisch detektiert (Abbildung 11). Die überwiegende Anzahl (88 %) der Viruspartikel war zweifarbig. Die fluoreszenzmarkierten nicht-infektiösen Viruspartikel wurden analog zu den infektiösen auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht (Abbildung 11). Es wurden keine Unterschiede zu den infektiösen Viruspartikeln bei den untersuchten Proteinen festgestellt.

Die Produktion von eintrittskompetenten, nicht-infektiösen, fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln erfolgte durch Dreifachtransfektion von 293T-Zellen mit pCHIV, pCHIV.eGFP und pmRFP1.Vpr. Da eine Maximierung des mRFP1.Vpr-Signals für die fluoreszenzmikroskopische Detektion wünschenswert war, wurde zunächst in einem Titrationsexperiment das optimale Verhältnis von pmRFP1.Vpr zu den proviralen Plasmiden bestimmt. Die Zellkulturüberstände der viruspartikel-produzierenden Zellen wurden mittels Ultrazentrifugation durch ein 20 %iges Sucrosekissen aufgereinigt und konzentriert. Die Proteinzusammensetzung der Partikel wurde durch Westernblotanalyse mit gegen Vpr und MA gerichteten Antikörpern untersucht (Abbildung 12). Der Prozessierungsgrad des MA- bzw. MA.eGFP-Vorläuferproteins Gag bzw. Gag.eGFP war umgekehrt proportional zur Menge an mRFP1.Vpr in den Partikel. Der Prozessierungsgrad des Gag-Polypeptids war auch bei einfarbig mit eGFP.Vpr markierten Partikeln in Abhängigkeit von der inkorporierten Menge an Vpr-Fusionsprotein reduziert (Abbildung 12). Die produzierte Partikelmenge pro

Ergebnisse

ml Zellkulturüberstand (gemessen durch Quantifizierung des viralen CA-Proteins p24 mittels ELISA) nahm mit steigender Menge von in den Zellen produziertem und in das Virion eingebautem mRFP1.Vpr ab.

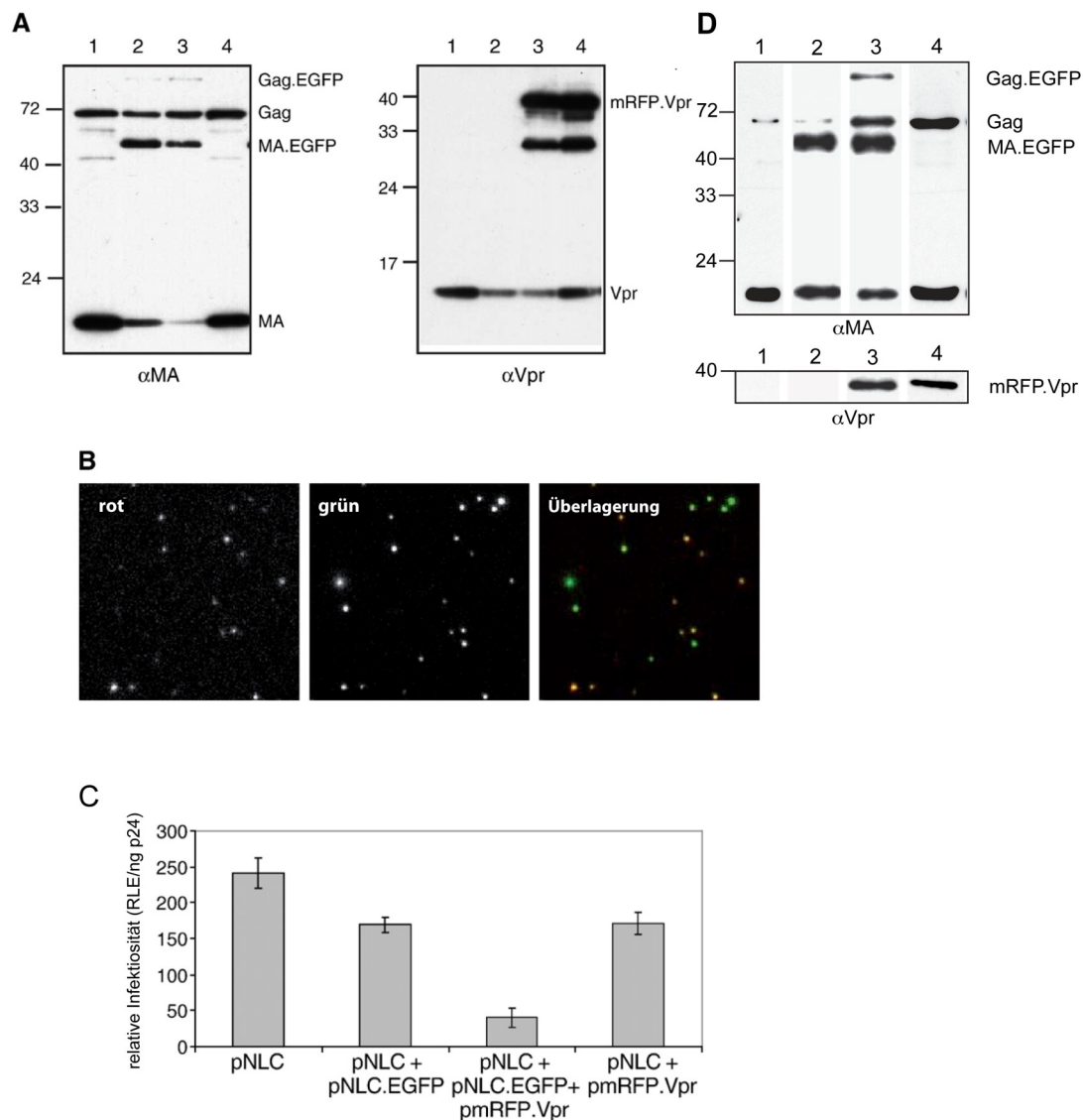


Abbildung 11: Charakterisierung doppelt fluoreszenzmarkierter Viruspartikel. (A) Die Analyse der Proteinzusammensetzung von aufgereinigten, infektiösen fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln wurde mittels Westernblot durchgeführt. Die Viruspartikel wurden aus Zellkulturüberständen 44 h nach Transfektion der 293T-Zellen aufgereinigt. Zur Transfektion wurden die folgenden Plasmide verwendet: (1) pNLC, (2) pNLC und pNLC.eGFP, (3) pNLC, pNLC.eGFP und pmRFP1.Vpr sowie (4) pNLC und pmRFP1.Vpr. Für den Westernblot wurden polyklonale Antikörper gerichtet gegen MA, Vpr und gp120 eingesetzt. (Experiment durchgeführt von Bärbel Glass). (B) Doppelt fluoreszenzmarkierte Viruspartikel wurde durch Transfektion von 293T-Zellen mit pNLC, pNLC.eGFP und pmRFP1.Vpr hergestellt. Die Viruspartikel wurden nach Fixierung mit 3 % PFA an ein Deckglas gebunden und mittels Fluoreszenzmikroskopie unter den später für die Lebendzelleexperimente verwendeten Bedingungen analysiert (Viruspartikel erhalten von Bärbel Glass). (C) Die relative Infektiosität der fluoreszenzmarkierten Viruspartikel wurde durch Titration von Zellkulturüberständen auf TZM-Zellen bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Infektiosität gemessen anhand der Luciferase-Aktivität in relativen Lichteinheiten (RLE) wurde auf p24 normiert. (Bestimmung der Infektiosität durchgeführt von Bärbel Glass.) (D) Westernblot von nicht-infektiösen, fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln hergestellt wie unter (A) beschrieben, die 293T-Zellen wurden jedoch mit folgenden Plasmiden transfiziert: (1) pCHIV, (2) pCHIV und pCHIV.eGFP, (3) pCHIV, pCHIV.eGFP und mRFP1.Vpr und (4) pCHIV und pmRFP1.Vpr.

Möglicherweise kompetierten die Mengen an fluoreszierenden Fusionsproteinen in einem Partikel durch sterische Hinderung. Daher wurde die Menge an fluoreszenzmarkiertem Matrixprotein im Partikel reduziert. Hierdurch könnte mehr Raum geschaffen werden, um weitere Moleküle mRFP1.Vpr in die Partikel zu integrieren. Allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, dass durch eine Reduktion von Gag.eGFP bzw. MA.eGFP im Partikel mehr mRFP1.Vpr inkorporiert wurde (Abbildung 12).

Die Kotransfektion der Plasmide pCHIV:pCHIVeGFP:pmRFP1.Vpr im molaren Verhältnis 1:1:0,4 führte zur Produktion von Viruspartikeln mit ausreichender Helligkeit im Fluoreszenzmikroskop. Die Spaltung des Gag-Polyproteins durch die virale Protease war nur geringfügig reduziert, so dass für die weiteren Experimente dieses Plasmidverhältnis zur Transfektion der 293T-Zellen verwendet wurde.

8.5.2 Doppelmarkierungsgrad der fluoreszenzmarkierten Viruspartikel

Um zuverlässig zwischen vollständigen Viruspartikeln und subviralen Komplexen unterscheiden zu können, war es essentiell, dass die überwiegende Mehrheit der Viruspartikel zweifarbig war und nur ein möglichst geringer Anteil an einfarbig mit mRFP1.Vpr markierten Partikeln vorlag.

Die Untersuchung des Doppelmarkierungsgrads der Viruspartikel erfolgte mikroskopisch mit an Deckgläsern immobilisierten Viruspartikeln. Zuerst wurden optimale Bedingungen für die Bindung der Viruspartikel an eine Glasoberfläche bei Raumtemperatur ermittelt. Hierzu wurde je 300 µl einer Virussuspension in PBS mit 100 ng p24/ml für 15 min auf handelsüblichem Borosilicatglas bzw. auf verschiedenen vorbehandelten Borosilicatgläsern inkubiert. Nicht gebundene Viruspartikel wurden mit PBS gewaschen und die Bindung der Viruspartikel semiquantitativ ausgewertet (Abbildung 13). Die Vorbehandlung der Borosilicatgläser erfolgte durch eine halbstündige Inkubation mit einer Collagen A- oder einer Fibronectinlösung (jeweils 1 mg/ml in PBS) und anschließendem Waschen mit PBS.

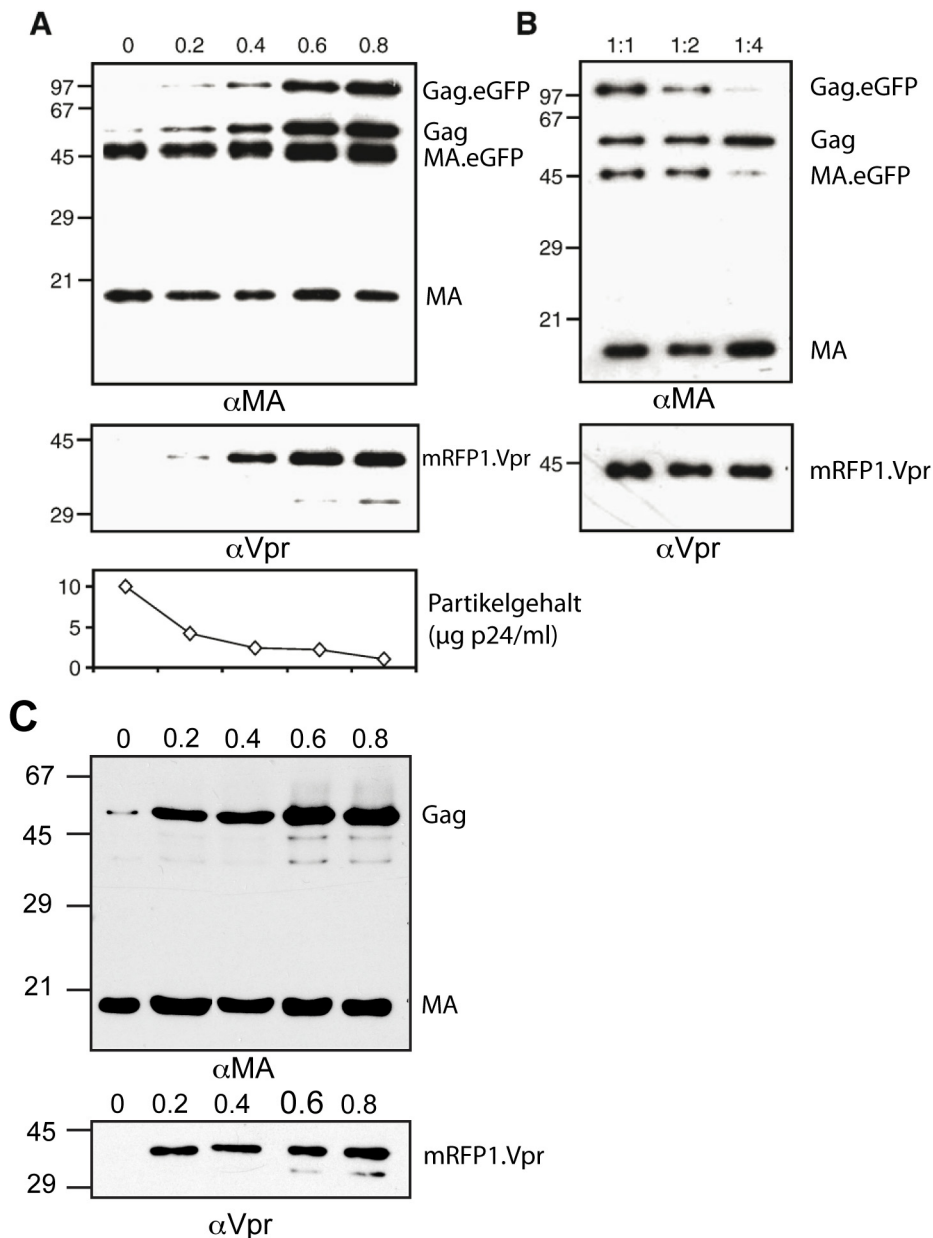


Abbildung 12: Bestimmung der Proteinzusammensetzung von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln bei Veränderung der Plasmidverhältnisse von pCHIV, pCHIV.eGFP und pmRFP1.Vpr bzw. peGFP.Vpr zur Transfektion der Produzentenzellen. (A) Proteinzusammensetzung und Partikelausbeute von zweifarbig fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln. 293T-Zellen wurden mit steigenden Mengen des Plasmids pmRFP1.Vpr im Verhältnis zu den proviralen Plasmiden pCHIV und pCHIV.eGFP, deren Verhältnis mit 1:1 konstant blieb, transfiziert. Die Viruspartikel wurden aufgereinigt und die Inkorporation von mRFP1.Vpr und MA bzw. MA.eGFP mittels geeigneter Antikörper im Westernblot detektiert. Die Gesamt-DNA-Menge wurde bei der Transfektion von 293T-Zellen konstant gehalten. Das molare Verhältnis von pmRFP1.Vpr zu den proviralen Plasmiden (die als Bezugswert auf 1 gesetzt wurden) ist oberhalb der Abbildung angegeben. Für die Westernblotanalyse wurden gleiche Mengen an Viruspartikeln (bestimmt durch p24-ELISA) aufgetragen. Die Partikelausbeute aus den einzelnen Viruspräparationen (unten) wurde mittels p24-ELISA bestimmt. (B) Proteinzusammensetzung von durch Transfektion von 293T-Zellen mit unterschiedlichen Verhältnissen pCHIV.eGFP zu pCHIV (1:1, 1:2, 1:4) hergestellten Viruspartikeln. Das Verhältnis von pmRFP1.Vpr zu den proviralen Plasmiden wurde konstant gehalten. (C) Effekt von steigender eGFP.Vpr-Inkorporation in die Viruspartikel ohne fluoreszenzmarkiertes MA. Die Viruspartikel wurden durch Transfektion von 293T-Zellen mit pCHIV und peGFP.Vpr, jedoch ohne pCHIV.eGFP analog zu (A) hergestellt und analysiert. Die Position der Molekulargewichtsmarker (in kDa) ist jeweils links in den Grafiken dargestellt.

In verschiedenen Bereichen des Deckglases wurden die Fluoreszenzsignale der Viruspartikel aufgenommen. Die optimale Bindung der Viruspartikel wurde an unbehandeltes Borosilicatglas erreicht. Durch Vorbehandlung mit Collagen A oder Fibronectin wurde die Virusbindung um mehr als 90 % reduziert.

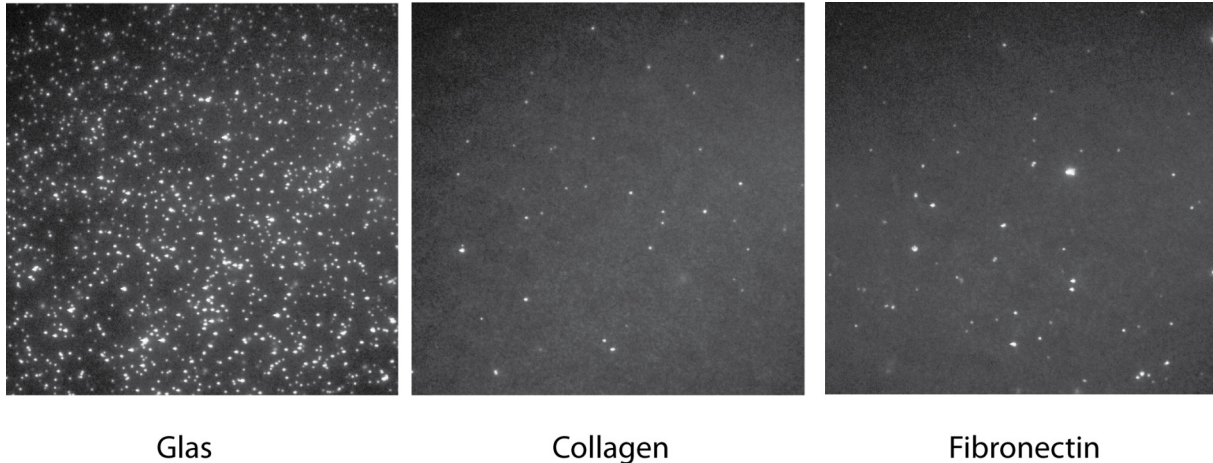


Abbildung 13: Bindung von Viruspartikeln an vorbehandelte und nicht vorbehandelte Deckgläser. Borosilicatdeckgläser wurden für 30 min mit 1 mg/ml Collagen oder Fibronectin behandelt. Die behandelten bzw. unbehandelten Deckgläser wurden mit Viruspartikel entsprechend 30 ng p24 für 15 min inkubiert und die Bindung der Viruspartikel fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dargestellt ist die MA.eGFP-Fluoreszenz.

Zur Analyse des Doppelmarkierungsgrads wurden für jede Viruspräparation jeweils mindestens 500 Partikel manuell lokalisiert und die Helligkeit der Partikel im grünen und im roten Kanal bestimmt (Abbildung 14). Ein Partikel wurde als einfarbig gewertet, wenn die Fluoreszenzintensität in einem der beiden Kanäle unter einem Grenzwert lag, der sich aus der mittleren Hintergrundfluoreszenz addiert mit einer Standardabweichung der Schwankungen der Hintergrundfluoreszenz ergab. Somit wurde ein objektives Kriterium für die Bestimmung des Anteils an doppelt markierten Viruspartikeln eingeführt. Eine für viele Experimente in der vorliegenden Arbeit verwendete Viruspräparation hatte einen Anteil von doppelt markierten Viruspartikeln von 92,4 %. 6,2 % waren nur mit MA.eGFP markiert und 1,4 % wiesen nur das rote mRFP1.Vpr-Signal auf (siehe auch (Lampe *et al.*, 2007)). Diese Werte waren repräsentativ für weitere in Lebendzelleexperimenten verwendete Viruspräparationen. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass zweifarbige Viruspartikel während der Präparation oder beim Kontakt mit dem Deckglas ihre Matrixhülle verloren bzw. dass allein mit mRFP1.Vpr markierte zelluläre Vesikel an das Deckglas banden. Daher wurde als Kontrolle eine Viruspräparation analysiert, bei deren Herstellung zusätzlich zu pmRFP1.Vpr nur pCHIV.eGFP und kein pCHIV kotransfiziert wurde. Obwohl diese Viruspartikel nur mit

eGFP markierte MA enthielten, wies die Präparation dennoch einen Anteil von ca. 1 % nur rot gefärbter partikulärer Signale auf.

Bei Mehrfachtransfektionen kam es vor, dass Zellen nur mit einem Plasmid transfiziert wurden. Daher sollte untersucht werden, ob sich nur mit mRFP1.Vpr markierte zelluläre Vesikel in Abwesenheit viraler Proteine bilden konnten. Hierzu wurden 293T-Zellen nur mit pmRFP1.Vpr transfiziert. Nach Aufreinigung der Viruspartikel nach Standardprotokoll konnten keine punktförmigen Signale auf dem Deckglas identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

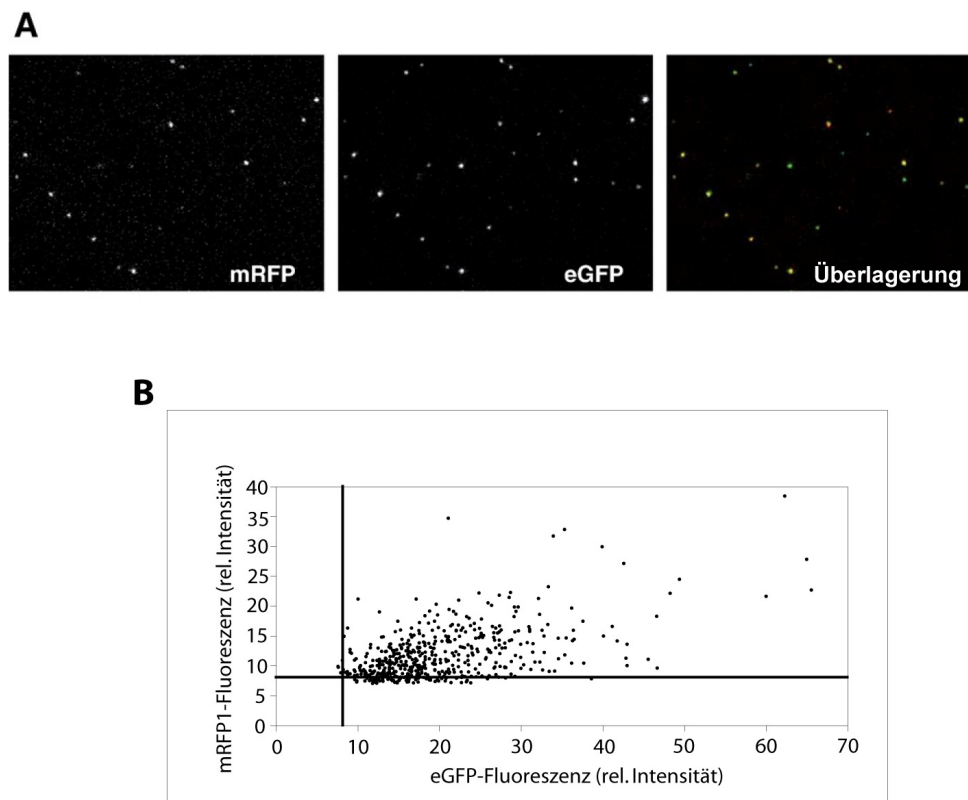


Abbildung 14: Quantifizierung der Doppelmarkierungseffizienz der Viruspartikel. (A) Auf Deckgläsern immobilisierte Viruspartikel wurden fluoreszenzmikroskopisch unter den für die Lebendzellmikroskopie verwendeten Bedingungen aufgenommen. (B) Zur Auswertung der Doppelmarkierungseffizienz wurden die Fluoreszenzintensitäten von MA.eGFP und mRFP1.Vpr der auf einem Deckglas immobilisierten Viruspartikel in beiden Fluoreszenzkanälen manuell (wie in 7.8.4 beschrieben) ausgewertet. Die relativen Intensitäten entsprechen der integrierten Pixelhelligkeit. Die eingezogenen Linien geben die mittlere Hintergrundintensität addiert mit einer Standardabweichung der Hintergrundintensität wieder. Signale im oberen rechten Quadranten wurden als doppelt fluoreszenzmarkiert gewertet. Eine repräsentative Viruspräparation ist gezeigt.

8.5.3 Eintrittskompetenz von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln

Die Infektiosität zweifarbig fluoreszenzmarkierter Viruspartikel war um ca. 80 % reduziert. Die Ursache hierfür kann in einer Reduktion der Fusionskompetenz oder in einer Beeinträchtigung eines der Fusion nachgeschalteten Schritts liegen. Daher wurde die

Eintrittskompetenz der fluoreszenzmarkierten Viruspartikel in HeLaP4-Zellen mit dem β -Lactamase-Fusions-Assay untersucht. Hierzu wurden nach Standardprotokoll zweifarbige, nicht-infektiöse Viruspartikel hergestellt, die anstelle von mRFP1.Vpr ein β -Lactamase-Vpr-Fusionsprotein enthielten. Die Zielzellen wurden nach Virusinkubation mit dem membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff CCF2 inkubiert, welcher bei Anregung mit 409 nm Licht eine Emission bei 520 nm zeigt. Wird der Farbstoff von der β -Lactamase gespalten, ändert sich die Emissionswellenlänge auf 447 nm. Die Änderung des Fluoreszenzsignals zeigte somit eine erfolgte Fusion der Viruspartikel an, die im Fluoreszenzspektrometer nachgewiesen wurde (Cavrois *et al.*, 2002; Cavrois *et al.*, 2004a; Cavrois *et al.*, 2004b; Munk *et al.*, 2002). Die mit dem β -Lactamase-Fusions-Assay ermittelte Fusionsrate für fluoreszenzmarkierte Viruspartikel unterschied sich nicht wesentlich von der für nicht-fluoreszenzmarkierte Partikel (Abbildung 15).

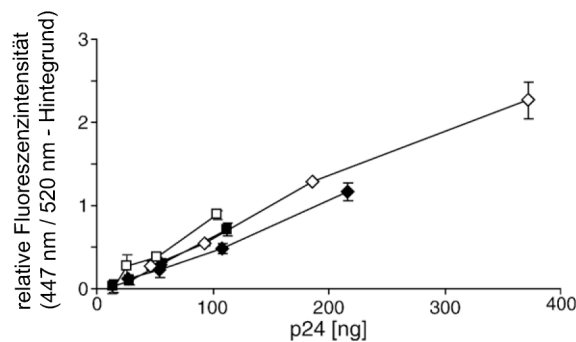


Abbildung 15: Bestimmung der Eintrittskompetenz von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln mittels β -Lactamase-Fusions-Assays. Viruspartikel mit und ohne fluoreszenzmarkierte MA, die anstelle von mRFP1.Vpr ein β -Lactamase-Vpr-Fusionsprotein enthielten, wurden zweifach auf HeLaP4-Zellen titriert. Die β -Lactamase-Aktivität im Zytosol der Zielzellen wurde durch fluorimetrische Bestimmung des CCF2-Umsatzes bestimmt. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen sind gezeigt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die gefüllten Symbole stellen die Viruspartikel, die MA.eGFP und MA sowie das β -Lactamase-Vpr-Fusionsprotein enthielten, dar; die offenen Symbole stellen die Kontrolle mit MA und β -Lactamase-Vpr-Fusionsprotein dar. (Experiment durchgeführt von Barbara Müller.)

8.5.4 Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Viruspartikeln

Für die Untersuchung der Virus-Zell-Interaktion war es wichtig nachzuweisen, dass die verwendete Virussuspension einzelne Viruspartikel und nicht Virusaggregate enthielt, da nur dann jedem beobachteten Fluoreszenzsignal ein einzelnes Viruspartikel zugeordnet werden konnte. Hierzu musste die Größenverteilung der Partikel bestimmt werden. Dieses wurde mittels Mobilitätsanalyse der Viruspartikel unter Berücksichtigung der Diffusionstheorie durchgeführt. Zur Ermittlung der Mobilität wurden Viruspartikel in Tris-Puffer (pH-Wert 7,5) verdünnt und die Trajektorien der Viruspartikel fluoreszenzmikroskopisch aufgezeichnet.

Aus den erhaltenen Daten wurde das Verschiebungsquadrat r^2 und folgend die akkumulierte Häufigkeitsfunktion $P(r^2, t)$ berechnet. Diese Funktion wurde dann mit einem Zweikomponenten-Modell gefittet:

$$P(r^2, t) = 1 - \left[\alpha e^{\frac{-r^2}{\langle r_i^2 \rangle}} + (1 - \alpha) e^{\frac{-r^2}{\langle r_i^2 \rangle}} \right]$$

wobei α den Anteil der ersten Komponente an der Gesamtheit und $\langle r_i^2 \rangle$ das mittlere Verschiebungsquadrat der i-ten Komponente beschrieb. Eine exemplarische Anpassung für ein Experiment wurde in Abbildung 16 dargestellt. Die Anpassung ergab einen Anteil der ersten Komponente α von 0,98. Somit lag eine monodisperse Virussuspension vor. Es ergab sich nach Mittelung über mehrere Experimente ein Diffusionskoeffizient D von $1,78 \pm 0,11 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Da es sich bei HI-Viren um sphärische Partikel handelte, spiegelte der hydrodynamische Radius den Partikelradius wider. Mittels der Stokes-Einstein-Gleichung ergab sich ein hydrodynamischer Radius R_{hyd} von $86 \pm 5 \text{ nm}$. Dies war in guter Übereinstimmung mit den durch Cryo-Elektronenmikroskopie ermitteltem Virusdurchmesser ohne Hydrathülle von $145 \pm 25 \text{ nm}$.

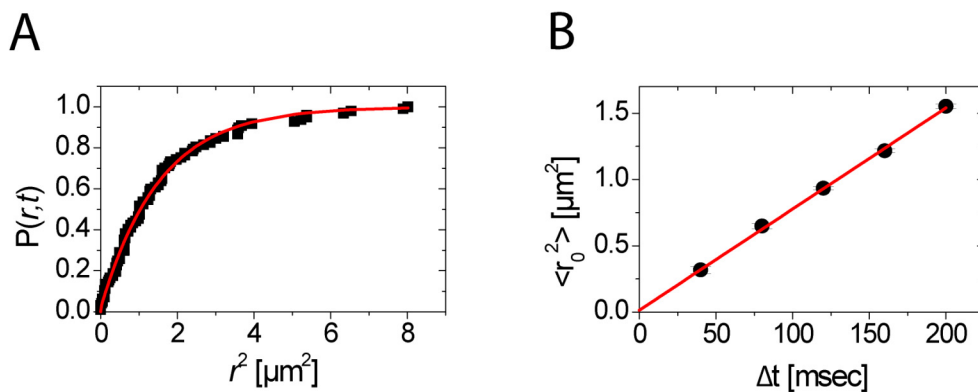


Abbildung 16: Bestimmung der Partikelgröße über die Diffusionseigenschaften der Viruspartikel. Das Bewegungsverhalten von Viruspartikeln in Tris-Puffer (pH 7,5) wurde über manuell bestimmte Trajektorien der einzelnen Partikel analysiert. Aus den Trajektorien wurde die akkumulierte Häufigkeitsfunktion für ein Zeitintervall gebildet und rechnerisch das mittlere Verschiebungsquadrat durch Anpassung eines Zweikomponenten-Modells ermittelt. Ein Beispiel ist in (A) zu sehen. Diese Auswertung wurde für mehrere Zeitintervalle durchgeführt und die Hauptkomponente, die 98 % der Trajektorien wiedergab, in (B) aufgetragen. Die Linearität der Auftragung weist auf eine freie Diffusion hin. Aus der Steigung konnte ein hydrodynamischer Radius der Viruspartikel von 86 nm ermittelt werden. (Experiment und Auswertung durchgeführt von Thomas Endress.)

8.6 Wahl der geeigneten Mikroskoptechnik für die Beobachtung von Virus-Zell-Interaktionen

Verschiedene fluoreszenzmikroskopische Techniken, die Fluoreszenzweitfeldmikroskopie, die konfokale Mikroskopie und die TIRF-Mikroskopie, wurden im Hinblick auf die Eignung zur Detektion der Virus-Zell-Interaktion vergleichend getestet. Die gewählte Methode sollte eine Detektion der Partikel für möglichst lange Zeiträume (mindestens 30 s) bei einer Bildfrequenz von mindestens 10 Bildern pro s ermöglichen.

8.6.1 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie ermöglichte im Vergleich zur Weitfeldmikroskopie die Aufnahme kontrastreicherer Bilder, da Fluoreszenzquellen, die sich nicht im Fokus befanden, durch eine Lochblende von der Detektion ausgeschlossen wurden. Mit konfokaler Mikroskopie war die Aufnahme von an Zellen gebundenen Viruspartikeln möglich (Abbildung 17), wozu Viruspartikel (ca. 50 ng p24) für 30 min mit ca. 10^4 Zellen in PBS auf einem 12 mm-Deckglas bei 4°C inkubiert, fixiert und in Moviol eingebettet wurden. Das für den Bildaufbau angewandte Rasterverfahren führte bei den verwendeten Systemen zu Aufnahmezeiten von maximal 2 Bildern pro s. Dadurch war es nicht möglich, frei in Puffer diffundierende Viren zu verfolgen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Verluste von Fluoreszenzlicht an der Lochblende des konfokalen Mikroskops war die Detektionseffizienz bei gleicher Anregungsintensität um mindestens 25-50 % verglichen mit der Weitfeldmikroskopie reduziert (Internetquelle 3). Die geringere Detektionseffizienz wurde über eine Erhöhung der Laserleistung kompensiert. Allerdings war es mit erhöhter Laserleistung nur für wenige Bilder in Folge möglich, fluoreszenzmarkierte Viruspartikel zu beobachten, bevor deren Fluoreszenzsignale ausgeblichen waren. Eine erhöhte Aufnahmefrequenz und die Detektion von frei in Puffer diffundierenden Partikeln wäre durch gleichzeitige Aufnahme aller Bildpunkte mit einem *spinning disk* Mikroskop möglich gewesen, aber grundsätzlich hätten sich hiermit nicht das schnelle Ausbleichen der Fluorophore und die damit unzureichende Gesamtbeobachtungszeit verbessert. Konfokale Techniken wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

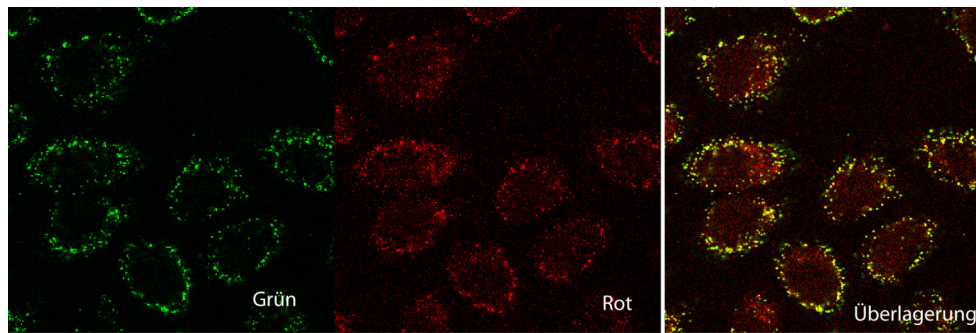


Abbildung 17: Zweifarbig fluoreszenzmarkierte Viruspartikel gebunden an HeLaP4-Zellen detektiert mit konfokaler Mikroskopie. Zweifarbig fluoreszenzmarkierte Viruspartikel (entsprechend 50 ng p24) wurden für 30 min auf Eis mit HeLaP4-Zellen inkubiert, die Zellen in der Kälte gewaschen und mit 3 % PFA fixiert. Die Detektion der Virus-Zell-Bindung erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop (Leica SP2). Die rote Färbung des Zytosols wurde durch zelluläre Autofluoreszenz hervorgerufen. Die MA.eGFP-Fluoreszenz ist in grün, die mRFP1.Vpr-Fluoreszenz in rot dargestellt.

8.6.2 TIRF-Mikroskopie

Bei der TIRF-Mikroskopie erfolgte die Detektion nach dem klassischen Weitfeldprinzip, allerdings wurden die Fluorophore nur in einem kleinen Bereich von 150-200 nm oberhalb des Deckglases angeregt. Der visualisierbare Bereich der TIRF-Mikroskopie umschließt den extrazellulären Raum unterhalb der Zelle, die Plasmamembran an der Zellunterseite und einen Teil des plasmamembrannahen Zytosols. Die TIRF-Mikroskopie wurde bereits erfolgreich angewandt, um den Eintritt von nicht umhüllten Viren via Endozytose zu studieren (Pelkmans *et al.*, 2001). Allerdings sind die in diesen Studien untersuchten Viren (z.B. SV40) mit einem Durchmesser von 45 nm deutlich kleiner als HIV, das einen Durchmesser von ca. 145 nm hat. Daher sollte zuerst untersucht werden, ob HI-Viruspartikel effizient unter HeLaP4-Zellen gelangen konnten und damit grundsätzlich Untersuchungen des Viruseintritts mit TIRF-Mikroskopie möglich waren. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Akiko Tagawa und Prof. Ari Helenius an der ETH Zürich durchgeführt. Das verwendete Till Photonics TIRF-Mikroskop wurde in (Pelkmans *et al.*, 2001) beschrieben.

Für die Experimente wurden 1×10^5 HeLaP4-Zellen 18 h vor der Messung auf runden 16 mm Deckgläsern aus Borosilicatglas ausgesät und dann mit einfarbig MA.eGFP markierten Viruspartikeln entsprechend 1 μg p24 in einem Volumen von 1 ml inkubiert. Die Messungen erfolgten mit einfarbigen Viruspartikeln, da so ein Kanal für die Darstellung von Membranmarkern etc. zur Verfügung stand. Die Zahl der Viruspartikel, die sich unterhalb der HeLaP4-Zellen befanden, lag bei ca. 1 Partikel pro Zelle. Wahrscheinlich war der Raum zwischen Zellunterseite und Glasoberfläche für diese verhältnismäßig großen Viren zu klein. Hingegen konnten bei Polyomaviren bis zu 60 Partikel unter einer Zelle beobachtet werden (persönliche Kommunikation mit Helge Ewers und (Ewers *et al.*, 2005)).

Da auch endozytierte Viruspartikel von der zytosolischen Seite an die Plasmamembran transportiert werden konnten, musste sichergestellt werden, dass bei der Auszählung der Viruspartikel zwischen Deckglas und Zellunterseite keine endozytierten Viruspartikel mit einbezogen wurden. Um den Transport von endozytierten Partikeln an die Plasmamembran zu detektieren, wurden abwechselnd Bilder im TIRF-Modus und mit Epifluoreszenz aufgenommen. Wurde ein Partikel, der mit MA.eGFP markiert war, zuerst im Zytosol mittels Epifluoreszenzanregung detektiert und erst später im TIRF-Modus, so war er von der zytosolischen Seite an die Membran transportiert worden. Die Zahl der endozytierten Partikel stieg ca. 1 h nach Viruszugabe an, so dass die folgenden Messungen mit HIV-Viruspartikeln auf diese Zeit begrenzt wurden.

8.6.2.1 Optimierung der Zugänglichkeit von HIV-Partikeln zur Zellunterseite

Da nur ca. 1 Viruspartikel unterhalb der Zelle zu detektieren war, was für eine statistisch auswertbare Untersuchung nicht ausreichend war, wurde versucht, die Zugänglichkeit der HIV-Partikel zur Zellunterseite zu verbessern. Dazu wurde eine bereits an der ETH-Zürich etablierte Methode (Csucs *et al.*, 2003) verwendet, bei der Deckgläser mit einem lithographisch hergestellten Stempel mit adhäsiven Rechtecken der Größe $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ mit einem Abstand von $5\ \mu\text{m}$ beschichtet wurden. Das Muster der aufgetragenen adhäsiven Bereiche wurde durch Zugabe eines mit Alexa Fluor 647-markierten unspezifischen Antikörpers in die Stempellösung nachgewiesen. Die Zwischenräume waren nicht-adhäsiv beschichtet, so dass sich die Zellen nur noch an den adhäsiven Bereichen auf dem Deckglas anheften konnten.

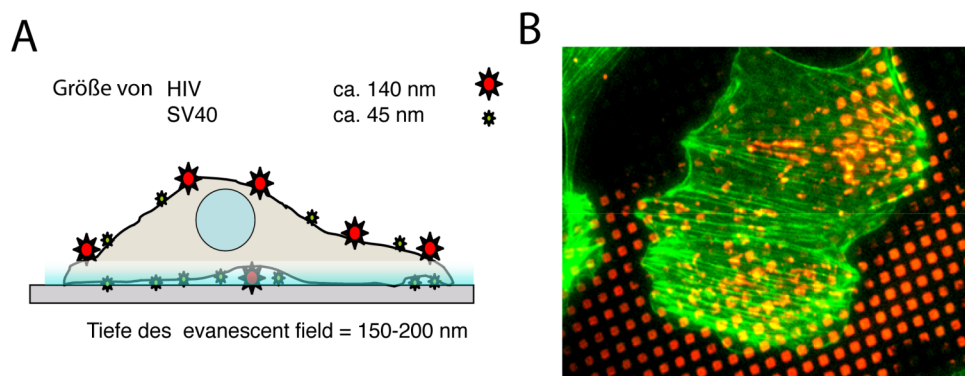


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Beobachtung von Viruspartikeln mittels TIRF-Mikroskopie und Visualisierung von Zellen auf einem speziell beschichteten Deckglas. (A) Schematische Darstellung: Nur Viruspartikel, die an die Zellunterseite gelangen können, sind im *evanescent field* (hellblau) sichtbar. (B) Um die Zugänglichkeit der Zellunterseite für Viren zu erhöhen, wurden Zellen auf mit einem Mustern aus adhäsiven und nicht-adhäsiven Bereichen beschichteten Deckgläsern ausgesät. Die Bereiche, auf denen die Zellen adhärieren können, wurden mit dem Fluorophor Alexa Fluor 647 sichtbar gemacht (Rot). Zu Demonstrationszwecken wurden Aktin-YFP exprimierende Ptk2-Zellen auf einem beschichteten Deckglas ausgesät und 18 h nach Aussaat mikroskopisch detektiert. (Abbildung von Akiko Tagawa, modifiziert.)

In den Zwischenräumen konnten durch Bewegungen der Plasmamembran Hohlräume an der Zellunterseite entstehen, die die Zugänglichkeit für Viruspartikel verbessern sollte. Um dies zu verifizieren wurden 18 h vor dem Experiment ca. 1×10^5 HeLaP4-Zellen auf entsprechend behandelten Deckgläsern ausgesät. Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln inkubiert und die Zahl der unterhalb der Zellen befindlichen HIV-Partikel bei beschichteten im Vergleich zu unbeschichteten Deckgläsern ermittelt. Außerdem wurde die Zugänglichkeit der Zellunterseite mittels fluoreszenzmarkierter Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von 35 nm und fluoreszenzmarkierter SV40-Viren getestet. Die Ergebnisse sind in (Tabelle 3) zusammengefasst. Für HI-Viruspartikel (500 ng p24 in 1 ml DMEM) wurde eine ca. vierfache Verbesserung der Zugänglichkeit der Viruspartikel für die Zellunterseite ermittelt. Es befanden sich mit Beschichtung durchschnittlich 3,4 Viruspartikel unter einer Zelle und ohne Beschichtung nur 0,8 Viruspartikel.

Tabelle 3: Zugänglichkeit der Zellunterseite für unterschiedliche Partikel (n.b.: nicht bestimmt). (Durchführung und Auswertung mit SV40 und Polystyrolkugeln durch Akiko Tagawa, ETH Zürich.)

	35 nm beads	SV 40	HIV
Verhältnis mit/ohne Muster nach 30 min	1,1	n.b.	4,1
Verhältnis mit/ohne Muster nach 60 min	1,43	2,9	n.b.
Maximale Partikelanzahl unterhalb einer Zelle ohne Muster	n.b.	3	8
Maximale Partikelanzahl unterhalb einer Zelle mit Muster	n.b.	15	21
Methode	Auswertung der mittleren Fluoreszenz unter der Zelle ($n_{\text{Zellen}} \geq 10$); CV1-Zellen	Partikelanzahl pro Zelle; CV1-Zellen	Partikelanzahl pro Zelle; HeLaP4-Zellen

8.6.2.2 Analyse der Partikelbewegung unterhalb der Zellen

Die Analyse des Bewegungsverhaltens von HI-Viren ($n = 103$) unterhalb der HeLaP4-Zellen mittels TIRF-Mikroskopie ergab, dass ca. 85 % der Partikel immobil waren oder ein leichtes „Zittern“ in einem begrenzten Radius (weniger als 3 Pixel) zeigten. Es konnte nicht unterschieden werden, ob die Partikel an der Plasmamembran oder am Deckglas gebunden waren. Nur 3 Partikel zeigten ein mobiles Verhalten und 12 Partikel tauchten wiederholt in das *evanescent field* ein, was auf eine Bindung an einen beweglichen Teil der Plasmamembran schließen ließ.

8.6.3 Fluoreszenz-Weitfeldmikroskopie

Grundsätzlich war die Zahl der Viruspartikel unter den beobachteten Zellen in der TIRF-Mikroskopie zu gering, um damit weitergehende Fusionsuntersuchungen durchzuführen. Deshalb wurde im Folgenden mit Fluoreszenzweitfeldmikroskopie gearbeitet. Bei der Weitfeldmikroskopie war eine optimale Lichtausbeute aufgrund des optischen Aufbaus des Systems gewährleistet. Nachteilig wirkte sich aus, dass Fluoreszenzsignale, die sich nicht in der Fokusebene befanden, als diffuser Hintergrund den Kontrast verschlechterten. Dieser Nachteil wurde jedoch dadurch ausgeglichen, dass Viruspartikel, die sich um bis zu 1,5 μm außerhalb der Fokusebene befanden, weiterhin verfolgt werden konnten.

Alle folgenden Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Fluoreszenzweitfeldmikroskopie durchgeführt. Um Virus-Zell-Interaktionsmessungen auch in unserer Abteilung durchführen zu können, wurde von mir ein geeignetes Weitfeldmikroskop mit TIRF-Erweiterung beschafft und die Technik etabliert (7.8.1).

In den Experimenten zur Untersuchung der Virus-Zell-Interaktion wurden HeLaP4-Zellen mit Viruspartikeln inkubiert, um Parameter wie Bindung, Aufnahmegeschwindigkeit und Bewegung der Viruspartikel in der Zelle zu beschreiben. Hierzu wurden HeLaP4-Zellen 18 h vor der Messung in einer Dichte von 1×10^4 Zellen je Kammer eines 8-Kammer-Deckglases ausgesät und kurz vor Beginn der Messung das Zellkulturmedium gegen PBS ausgetauscht. Zum Start der Messung wurden in PBS vorverdünnte Viren markiert mit MA.eGFP und mRFP1.Vpr zugegeben, wobei mit Viruskonzentration im Bereich von 25-100 ng p24 je 10^4 Zellen gearbeitet wurde. Die Messungen wurden in der Regel auf halber Zellhöhe durchgeführt. Die zwei Fluorophore wurden abwechselnd für jeweils 50 ms mit blauem bzw. orangem Licht angeregt und mit der EMCCD-Kamera mit maximaler Verstärkung aufgenommen. Die gesamte Beobachtungsdauer betrug 40 s (400 Bilder je Farbe). Die Bildfrequenz von 10 Hz erwies sich als vollkommen ausreichend, um Partikel und ihre Bewegungsmuster an der Plasmamembran und in der Zelle zu verfolgen. Partikel, die sich in Suspension befanden, konnten nur verfolgt und weitergehend charakterisiert werden, wenn sie sich längere Zeit in der Beobachtungsebene befanden. Nach einer Sequenz von 400 Aufnahmen wurde eine neue Zelle bzw. Zellgruppe aufgesucht, da das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzsignale durch ungleichmäßiges Ausbleichen der beiden Fluorophore sonst verändert würde.

Unter den verwendeten Bedingungen konnte kein Überstrahlen (*crosstalk*) der Fluorophore bei Verwendung des Dualband-Filters eGFP/mRFP1 (Chroma) festgestellt werden. Dies wurde durch die Verwendung einfarbig mit eGFP bzw. mRFP1 fluoreszenzmarkierter Viruspartikel überprüft.

Die Intensität der Signale bei einer durchschnittlichen Messung betragen bei 16 bit Grauwertabstufung (65.536 Graustufen) der Kamera für eGFP im Mittel 9.000 Einheiten bei einer Standardabweichung 1.500 Einheiten und für mRFP1 7.100 Einheiten bei einer Standardabweichung von 1.000 Einheiten. Der Hintergrund hatte eine durchschnittliche Intensität von 5.000 im eGFP bzw. 4.200 im mRFP1-Kanal.

8.7 Die Virus-Zell-Interaktion

8.7.1 Bewegungsverhalten von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln

Bei der Inkubation von Zellen mit fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln zeigten sich typische Charakteristika im Bewegungsverhalten der Viruspartikel, woraufhin das Bewegungsverhalten der Viruspartikel in vier Hauptklassen unterteilt wurde. Die erste Klasse (I) bildeten frei in Suspension diffundierende Viruspartikel. Wenn diese Partikel kurz die Plasmamembran berührten und anschließend wieder frei diffundierten ohne detektierbar an sie zu binden, wurden sie in Klasse (II) eingeordnet. Als kurze Berührung wurde eine Interaktionszeit von bis zu 2 Bildern (< 200 ms) gewertet. Viruspartikel der Klasse (III) diffundierten zuerst im Puffer und wurden bei einem Zellkontakt immobilisiert. Die meisten dieser Partikel waren bis zum Ende der Messung immobil. Als immobilisiert galten Viruspartikel, die sich bis zum Ende der Aufnahme um nicht mehr als 2 Pixel entlang der Membran bewegten. Es konnten immobile Viruspartikel auch bei Verlängerung der Gesamtbeobachtungsdauer auf bis zu 2 h verfolgt werden. Hierzu wurden mehrere kurze Filmsequenzen im Intervall von 10 min aufgenommen. Intrazelluläre Partikel bildeten die Klasse (IV). Diese waren meist zweifarbig und zeigten freie oder beschränkte Diffusion im Zytoplasma, gerichteten Transport oder waren stationär. Intrazelluläre Partikel waren in der Regel 10 min nach Viruszugabe zu detektieren. In einigen Fällen konnten zweifarbige Partikel aber auch schon ab ca. 1 min nach Viruszugabe im Zellinnern detektiert werden (Abbildung 19).

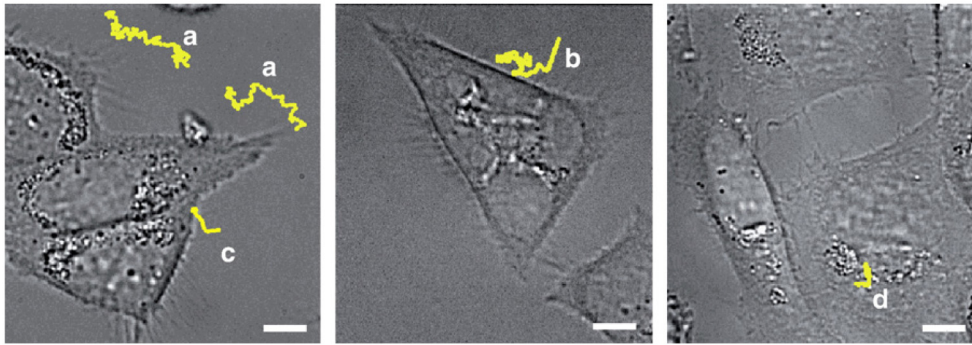


Abbildung 19: Verschiedene Arten von Virus-Zell-Interaktionen detektiert in Lebendzelleexperimenten. HeLaP4-Zellen wurden mit doppelt markierten Viruspartikeln inkubiert und die Interaktion mit der Zelle mit einer Belichtungszeit von 100 ms je Zweifarbenbild (siehe 7.9) aufgezeichnet. Repräsentative Trajektorien von zweifarbigem Viruspartikeln sind als Überlagerung mit dem Durchlichtbild der Zelle dargestellt. Es wurde freie Diffusion der Viruspartikel in Suspension (a), Berührungen an der Plasmamembran (b), das Binden von Partikeln an die Zellmembran (c) und intrazelluläre Partikel (d) beobachtet. Das Partikel dargestellt in (d) zeigte eine gerichtete Bewegung.

Das Bewegungsverhalten war unabhängig vom äußeren Medium, da Experimente, in denen anstelle von PBS mit Magnesium- und Kalziumchlorid, CO₂-unabhängiges Medium oder Zellkulturmedium verwendet wurde, keinen Unterschied zeigten.

Im Zytosol wurden auch einige einfarbig mit mRFP1 markierte Partikel detektiert, jedoch wurde in mehr als 10.000 analysierten Trajektorien kein Farbtrennungseignis detektiert.

Vergleichende Messungen wurden zur Kontrolle auch mit HeLa-Zellen, die den Rezeptor CD4 nicht exprimierten, durchgeführt. Auch in diesem Fall wurde eine große Anzahl an der Plasmamembran gebundener und intrazellulärer Viruspartikel detektiert. Dies deutete darauf hin, dass ein Großteil der Partikelbindung an die Zelle und der Partikelaufnahme in die Zelle unabhängig von der gp120-CD4-Interaktion stattfand. Zusätzlich wurden noch die Zelllinie JC53, die deutlich mehr CD4 auf der Zelloberfläche als HeLaP4-Zellen besaßen und ebenfalls von HeLa-Zellen abgeleitet wurden, getestet, um einen zellspezifischen Effekt der HeLaP4-Zelllinie auszuschließen. Da kein signifikanter Unterschied bei der Virusbindung und Virusinternalisierung beobachtet wurde, wurde untersucht, ob diese Interaktion(en) von einem Adhäsionsfaktor verursacht wurden (siehe 5.5.3).

8.7.2 Heparansulfat-abhängige Virusbindung

Zur näheren Untersuchung der CD4-unabhängigen Virusbindung war zu klären, ob ein zellulärer Adhäsionsfaktor für die Virusbindung und die Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle verantwortlich war. Es schien eine Beteiligung von Proteoglykanen mit Heparansulfat-Seitenketten wahrscheinlich (5.5.3). Um dies näher zu untersuchen, wurde ein

durchflußzytometrischer Bindungsassay auf Basis fluoreszenzmarkierter Viruspartikel etabliert. Für den Assay wurden fluoreszenzmarkierte Viruspartikel verwendet, was den Vorteil hatte, dass die Bindung an die Zelle direkt und ohne weitere Färbeverfahren bestimmt werden konnte. Für den Assay wurden HeLaP4-Zellen mit 0,7 % EDTA in PBS von der Zellkulturschale abgelöst und für 30 min mit bzw. ohne Heparinase I in PBS bei 37°C inkubiert. Heparinase I ist ein Enzym, das spezifisch Heparansulfatstrukturen auf der Zelloberfläche entfernt. Anschließend wurde die eGFP-Fluoreszenz der gebundenen Viruspartikel mittels Durchflußzytometrie gemessen. Die Bindung von Viruspartikeln an Zellen, die nicht mit Heparinase I behandelt worden waren, war deutlich zu beobachten (Abbildung 20). Im Gegensatz dazu war eine Bindung der Viruspartikel an mit Heparinase I-behandelte Zellen nicht nachweisbar. Zwischen den Heparinase I-behandelten Zellen und nicht mit Virus inkubierten Kontrollzellen war kein Unterschied zu detektieren (Abbildung 20). Parallel dazu wurden diese Resultate mittels Fluoreszenzmikroskopie verifiziert. Hierzu wurden adhärenente HeLaP4-Zellen für 30 min mit bzw. ohne Heparinase I verdünnt in PBS inkubiert, gewaschen und Viruspartikel hinzugegeben. Nach 45 min wurde die Virusbindung an die HeLaP4-Zellen mikroskopisch untersucht. In Abbildung 20 ist zu sehen, dass bei den Heparinase I-behandelten Zellen nur wenige Partikel gebunden hatten, obwohl im Film deutlich die Berührung der Zellmembran durch Viruspartikel sichtbar war (Typ II-Interaktion). Im Gegensatz dazu war bei unbehandelten Zellen durch die Vielzahl der gebundenen Viruspartikel der Zellumriss deutlich erkennbar. Bei den Heparinase I-behandelten Zellen stieg die Virusbindung ab ca. 1 h nach Viruszugabe wieder an, wenn die Inkubation der Viruspartikel mit den Zellen in Abwesenheit von Heparinase I erfolgte. Wahrscheinlich gelangte neu-synthetisiertes Heparansulfat auf die Zelloberfläche und vermittelte so die Bindung von Viruspartikeln. Die Mehrheit der Literaturquellen legte nahe, dass die Bindung an Heparansulfat über das virale Hüllprotein Env vermittelt wird (Mondor *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002). Folglich sollten Partikel, die kein Env auf der Oberfläche trugen, nicht oder deutlich schwächer an HeLaP4-Zellen binden. Dazu wurden HeLaP4-Zellen mit Env-tragenden (Env+) bzw. Env-defizienten (Env-) Partikeln, wobei die eingesetzte Partikelmenge auf gleiche Fluoreszenzintensität ermittelt im Fluoreszenzspektrometer normiert wurde, inkubiert. Die Bindung der Viruspartikel wurde fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Es war kein Unterschied in der Partikelbindung zu beobachten. Durch Heparinase I Behandlung konnte die Bindung von Env-defizienten Partikeln wiederum deutlich reduziert werden (Abbildung 20).

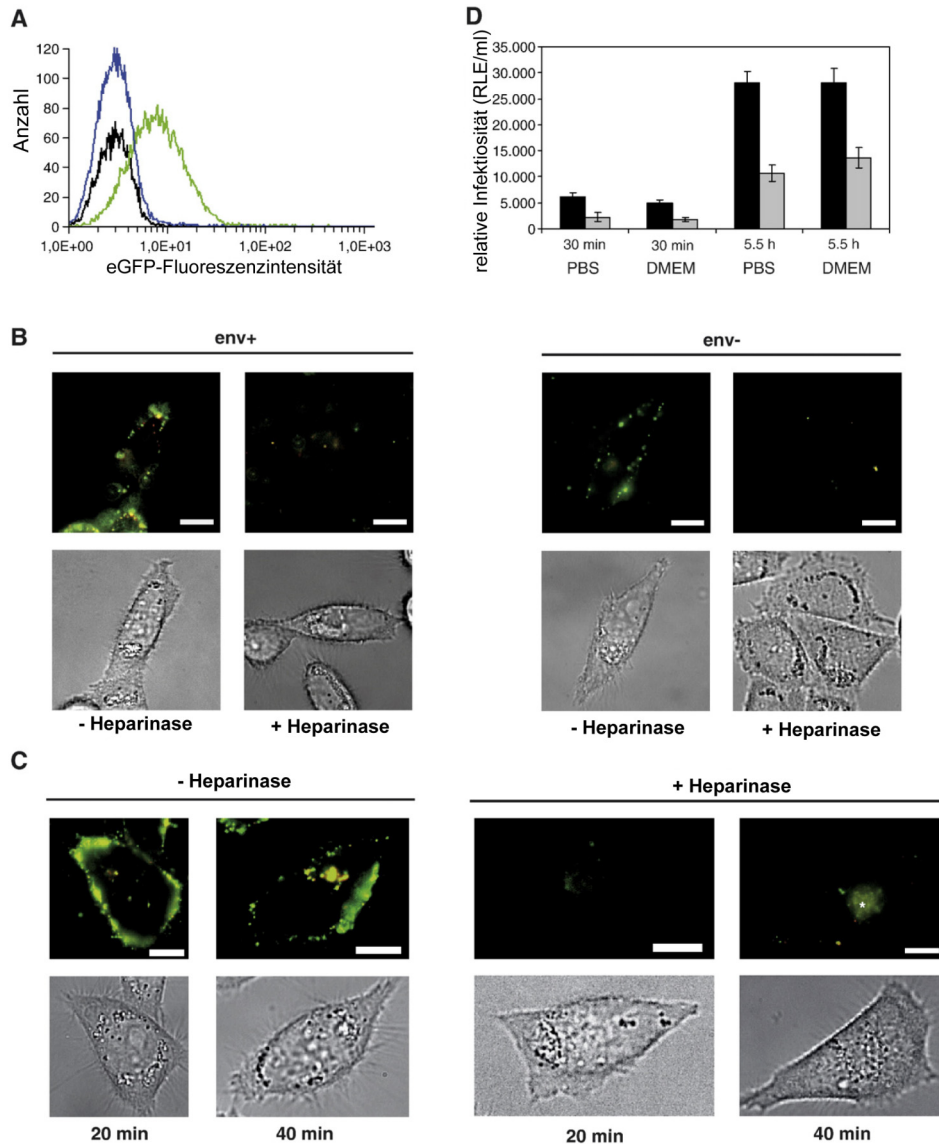


Abbildung 20: Einfluss der Heparinase I Behandlung auf die Virusbindung, die Virusendozytose und die Infizierbarkeit der Zellen. (A) Durchflußzytometrische Bestimmung der Virusbindung an HeLaP4-Zellen. HeLaP4-Zellen wurden für 30 min mit doppelt fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln auf Eis inkubiert und die Virusbindung anhand der eGFP-Fluoreszenz der Viruspartikel bestimmt. Die blaue Linie stellt die zelluläre Autofluoreszenz der Kontrollzellen ohne Virusbindung dar, die grüne Linie stammt von *Mock*-behandelten Zellen, die mit Viruspartikeln inkubiert worden waren, und die schwarze Linie von vor der Virusbindung mit Heparinase I-behandelten Zellen. (B) Effekt der Heparinase I Behandlung oder *Mock*-Behandlung auf die Bindung von env(+) und env(-) Viruspartikeln. Die Viruspartikel wurden für 45 min bei 37°C mit HeLaP4-Zellen in PBS mit Kalzium- und Magnesiumchlorid inkubiert und das Bild aus einer Sequenz von 50 Aufnahmen mittels Durchschnittsprojektion erstellt, wodurch frei in Lösung diffundierende Partikel ausgeblendet wurden. (C) Reduktion der Virusendozytose durch Heparinase I Behandlung. HeLaP4-Zellen wurden nach Heparinase I- oder *Mock*-Behandlung mit Viruspartikeln (env(+)) für die angegebene Zeit inkubiert und die Aufnahmen wie in (B) nachbearbeitet. Bei der mit (*) markierten Region handelte es sich um zelluläre Autofluoreszenz in einer Zelle. Maßstab: 10 µm. (D) Effekt der Heparinase I Behandlung auf die Infizierbarkeit der Zellen. TZM-Zellen wurden für 30 min einer Heparinase I (graue Balken) oder *Mock*-Behandlung (schwarze Balken) unterzogen und mit HIV_{NL4-3} -Viren entsprechend 50 ng p24 für die angegebene Zeit inkubiert. Als Maß für die Zahl infizierter Zellen wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Expression der Luciferase erfolgte Tat-abhängig durch ein LTR-Promotor (Infektionsexperiment (D) durchgeführt von Bärbel Glass.)

Die zeitliche Zunahme von an der Plasmamembran gebundenen Viruspartikeln korrelierte mit einer erhöhten Partikelaufnahme durch die Zelle, wobei nach 40 min mehr Viruspartikel an die Zelle gebunden hatten als nach 20 min. Waren die HeLaP4-Zellen mit Heparinase I behandelt worden, so waren auch nach 40 min nur wenige Viruspartikel im Zytosol zu beobachten und die Virusbindung war deutlich verringert (Abbildung 20). Die reduzierte Anzahl an Viruspartikeln im Zytosol deutet auf eine reduzierte Endozytose nach Heparinase I Behandlung hin, die mit der Virusbindung korrelierte.

In der Literatur gibt es in Bezug auf den Einfluss von Heparansulfat auf die Infizierbarkeit von Zellen widersprüchliche, zelltypspezifische Angaben (Ibrahim *et al.*, 1999; Mondor *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002). Um den Effekt von Heparansulfat zu überprüfen, wurden TZM-Zellen mit bzw. ohne vorherige Heparinase I Behandlung mit HIV_{NL4-3} infiziert. Für die Experimente wurden TZM-Zellen für 30 min bzw. 5,5 h mit HIV_{NL4-3} inkubiert, nachdem sie mit Heparinase I in PBS für 30 min behandelt wurden bzw. eine Mock-Behandlung mit PBS durchliefen. Die Infektion der Zellen wurde durch Zugabe des Korezeptorantagonisten AMD3100 gestoppt und nach 48 h die Luciferaseaktivität luminometrisch bestimmt (Abbildung 20). Die Inkubation mit HIV_{NL4-3} wurden sowohl in PBS mit Magnesium- und Kalziumchlorid oder in DMEM, dem Standardkulturmedium für adhärente HeLa-Zelllinien, durchgeführt, um die Einflüsse des Kulturmediums zu kontrollieren. Einen Einfluss der Kulturmedien auf die Infektiosität war nicht feststellbar. Die Luciferase-Aktivität nach Heparinase I Behandlung war ca. 2,5fach gegenüber nicht behandelten Kontrollzellen reduziert. Die Zahl der infizierten Zellen stieg mit Verlängerung der Inkubationszeit von 0,5 h auf 5,5 h um das 6fache an. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die relative Reduktion der Infizierbarkeit der TZM-Zellen durch die Heparinase I Behandlung (Abbildung 20).

8.7.3 Quantifizierung der Virusbindung an verschiedene Zelllinien

Die oben bereits qualitativ beschriebenen Membraninteraktionen wurden in einer Versuchsreihe quantitativ ermittelt. Zusätzlich wurde die Dauer der Membrankontakte der Viruspartikel mit der Zelle bestimmt. Ein Viruspartikel hatte nach unserer Definition einen Membrankontakt, wenn sich der Partikel im Bereich der Plasmamembran, definiert über ein vor der Messung aufgenommenes Durchlichtbild, aufhielt und seine Bewegungsrichtung abrupt änderte (Details in 7.8.6). Es zeigte sich, dass durchschnittlich 1,5 aufeinander folgende Membrankontakte eines Viruspartikels an HeLaP4-Zellen stattfanden, bevor dieses das Sichtfeld verließ. Für das Adeno-assoziierte Virus (AAV) wurde zuvor eine durchschnittliche Anzahl von 4,4 Membrankontakten ermittelt (Seisenberger *et al.*, 2001).

Tabelle 4: Zusammenhang zwischen Virusbindung und Heparansulfatkonzentration auf der Zelloberfläche. Angegeben sind die Heparansulfat- und die CD4-Oberflächendichte in relativen Fluoreszenzeinheiten (FE) bestimmt mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper in der Durchflußzytometrie. Die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ist angegeben. Die immobile Fraktion wurde ermittelt, in dem die Zahl der Trajektorien, bei denen ein Viruspartikel an der Zellmembran immobilisiert wurde auf die Gesamtzahl der analysierten Membrankontakte (Spalte Membrankontakte) normiert wurde. Die Kontaktlebensdauer ist die Zeit, die ein Viruspartikel mit der Plasmamembran transient in Kontakt trat. Der Standardfehler der Anpassung mit einer einfach-exponentiellen Funktion ist angegeben. (Auswertung der immobilen Fraktionen und der Kontaktlebensdauer durch Thomas Endress.)

*Histogramm für die markierten Zelllinien konnte nicht mit einer einfachen Exponentialfunktion hinreichend beschrieben werden.

†Die Konzentration von CD4-Rezeptoren an der Zelloberfläche wurde unter diesen Bedingungen nicht parallel bestimmt.

Zelllinien	Heparansulfat (FE)	CD4 (FE)	Immobile Fraktion (%)	Membrankontakte N	Kontakt-Lebensdauer (ms)
HeLa-Zelllinien					
HeLa	112 ± 5	4 ± 1	15	794	24,4 ± 1,0
HeLaP4	327 ± 76	55 ± 20	18	611	49 ± 7
HeLaP4 (Heparinase I)	118 ± 11	55 ± 20	2,6	289	*
HeLaP4 AMD3100	327 ± 76	†	19	803	20,2 ± 0,9
HeLaP4 Anti CD4	327 ± 76	†	18	781	23,6 ± 1,0
RC25	137 ± 12	69 ± 13	2,0	697	19,9 ± 1,0
JC53	229 ± 15	880 ± 110	5,1	1.078	19,8 ± 0,8
CHO-Zelllinien					
pgsA745	9 ± 7	3,2 ± 0,4	1,4	327	27,2 ± 2,1
pgsA 745 CD4 CXCR4	7 ± 1	182 ± 41	4,0	192	*
K1	730 ± 200	3,1 ± 0,6	19	238	45 ± 4
K1 CD4 CXCR4	764 ± 33	95 ± 43	33	138	43 ± 5

18 % der Partikel, die mit der Plasmamembran in Kontakt traten, wurden meist bei ihrem ersten Membrankontakt immobilisiert. Die anderen 82 % Prozent diffundierten wieder von der Plasmamembran weg. Die Zahl der immobilisierten Partikel an der Membran konnte durch Vorinkubation der Zellen mit einem die Infektion blockierenden anti-CD4-Antikörper nicht vermindert werden. Ebenso zeigte die Vorinkubation der Zellen mit dem Korezeptorinhibitor AMD3100, der die Interaktion des CD4-Env-Komplexes mit dem Koreptor CXCR4 blockiert, keine signifikante Änderung der Zahl immobilisierter Partikel (Tabelle 4). Da in den anfänglichen Virus-Zell-Interaktions-Experimenten Heparansulfat als wesentlicher Faktor für die Virusbindung identifiziert wurde, sollte untersucht werden, ob es

eine Korrelation zwischen der Zahl immobilisierter Viruspartikel und der Oberflächenkonzentration von Heparansulfat und CD4 auf verschiedenen Zelllinien gab. Die Bestimmung der Oberflächenkonzentrationen erfolgte mittels Durchflußzytometrie unter Verwendung geeigneter Antikörper. Dabei wurden folgende Zelllinien miteinander verglichen: (I) HeLaP4-Zellen und andere HeLa-Derivate mit hoher CD4-Konzentration (JC53) oder hoher Korezeptorkonzentration (RC25) sowie parentale HeLa-Zellen ohne CD4. (II) Zusätzlich wurde bei HeLaP4-Zellen eine Heparinase I Behandlung durchgeführt, um die Heparansulfatkonzentration auf der Zelloberfläche drastisch herabzusetzen. Diese Behandlung wurde mittels Durchflußzytometrie verifiziert. (III) Weiterhin wurde eine Serie von Hamsterzelllinien mit und ohne Heparansulfat bzw. mit und ohne CD4 und CXCR4 auf der Plasmamembran verwendet (Zhang *et al.*, 2002). Diese Zellen wurden zur Bestätigung der mit HeLa-Derivaten gewonnenen Ergebnisse eingesetzt. Es wurde eine Korrelation zwischen der Anzahl immobilisierter Viruspartikel und der Konzentration an Heparansulfat-Proteoglykanen auf der Zelloberfläche festgestellt. Demgegenüber wurde keine Korrelation zwischen der Virusbindung und der CD4-Konzentration erhalten.

Das Ergebnis wurde durch eine Ensemblemessung bestätigt, bei der fluoreszenzmarkierte Partikel auf Eis an die Zellen gebunden und anschließend die Virusbindung über die eGFP-Fluoreszenz mittels Durchflußzytometrie bestimmt wurde. Zusätzlich wurden jeweils parallel die CD4- und Heparansulfat-Oberflächenkonzentration bestimmt. Die in Abbildung 21 gezeigten Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten erhoben. Die Heparansulfatkonzentration auf der Zelloberfläche war bei Zellen in verschiedenen Passagen gewissen Schwankungen unterworfen, wie aus der Größe der Fehlerbalken ersichtlich wurde. In den bisherigen Experimenten wurde die Partikelbindung an die Zelle untersucht. Die Mehrheit der Zellberührungen der Viruspartikel führte nicht zur Bindung des Viruspartikels an die Zelle. Die Viruspartikel berührten die Zellen nur transient. Um dies näher zu charakterisieren wurden die Kontaktzeiten - die Aufenthaltszeit eines Partikels an der Plasmamembran - analysiert. Eine Veränderung der Kontaktzeit bei unterschiedlichen Rezeptordichten auf der Zelloberfläche könnte auf Interaktionen zwischen Molekülen auf der Virusoberfläche mit zellulären Oberflächenproteinen hindeuten. Diese Kontaktzeiten wurden für zwei Gruppen ausgewertet. Die erste Gruppe umfasste HeLaP4-Zellen, die mit und ohne Heparinase I bzw. mit Inhibitoren des Viruseintritts inkubiert wurden, sowie die HeLa-Derivate RC25 und JC53 und die parentalen HeLa-Zellen.

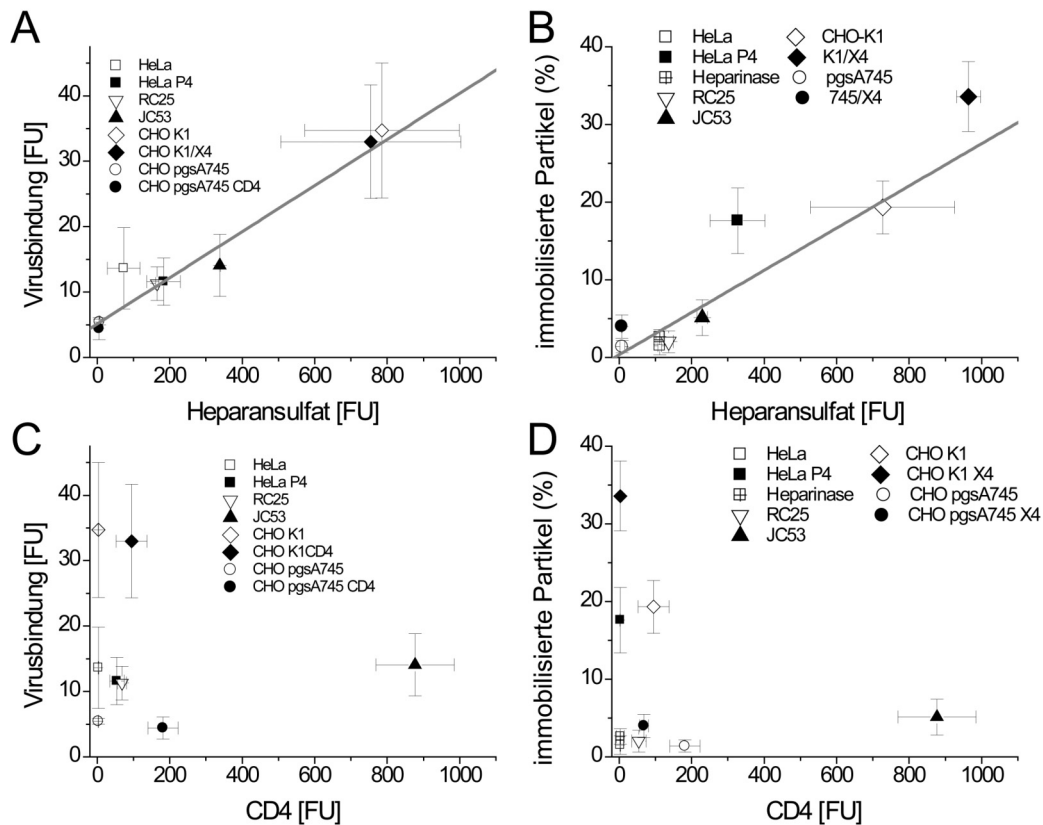


Abbildung 21: Korrelation der Virusbindung an die Plasmamembran in Abhängigkeit von der Heparansulfat- und CD4-Konzentration auf der Zelloberfläche. (A) Die angegebenen Zelllinien wurden mit fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln für 30 min auf Eis inkubiert und die Virusbindung anhand der MA.eGFP-Fluoreszenzintensität mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Die Oberflächenkonzentration von Heparansulfat wurde parallel mittels Durchflußzytometrie (siehe 7.7.6) bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten wieder. (B) Die Anzahl immobilisierter Viruspartikel wurde mittels Lebendzellmikroskopie (SVT: *single virus tracing*) bei 37°C gemessen und auf die Zahl der Membrankontakte normiert. Dieser Wert wurde gegen die Oberflächenkonzentration von Heparansulfat aufgetragen. Die horizontalen Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Heparansulfatkonzentration über mindestens drei unabhängige Experimente an. Die Heparansulfatkonzentration wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Die vertikalen Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Anzahl immobilisierter Viruspartikel an, die über die Annahme einer Poisson-Verteilung theoretisch ermittelt wurden. (C) Darstellung wie in (A), wobei die Virusbindung gegen die CD4-Konzentration auf der Zelloberfläche dargestellt ist. (D) Darstellung wie in (B), wobei die Immobilisierung gegen die CD4-Konzentration auf der Zelloberfläche aufgetragen ist. (Auswertung der immobilisierten Viruspartikel in (B) und (D) durch Thomas Endress.)

Die zweite Gruppe setzte sich aus den CHO-Zellen mit oder ohne Heparansulfat-Proteoglykane bzw. mit oder ohne CD4/CXCR4-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zusammen. In allen Fällen waren mehr als 94 % der transienten Kontakte kürzer als 220 ms. Somit ergab sich eine bimodale Verteilung, bei der die Partikel nur kurz die Membran berührten und anschließend weiter frei im Außenmedium diffundierten oder sofort an die Membran gebunden wurden. Nur eine kleine Anzahl an Partikeln interagierte mit der Zelle über einen Zeitraum von 220 ms bis zu 16 s. Zur genaueren Auswertung wurde die Verteilung der Interaktionszeiten in einem Histogramm aufgetragen und mit einer einfach exponentiellen

Funktion gefittet (Abbildung 22). Die mittlere Kontaktzeit betrug je nach Zelllinie zwischen 24 und 49 ms (Tabelle 4). Die Vorinkubation der HeLaP4-Zellen mit anti-CD4-Antikörpern, die die Viruspartikel-CD4 Interaktion blockierten, führte zu keiner signifikanten Veränderung verglichen mit parentalen HeLa-Zellen ohne CD4. Wurden HeLaP4-Zellen mit Heparinase I vorbehandelt, so zeigte das Histogramm eine Schulter bei ca. 140 ms und eine Anpassung mit einer einfach exponentiellen Funktion war nicht mehr möglich. Ein ähnlicher Effekt, wenn auch weniger stark ausgeprägt, war für CHO pgsA754 CD4/CXCR4-Zellen zu detektieren; eine Anpassung mit einer monoexponentiellen Funktion war ebenfalls nicht mehr möglich (Abbildung 22).

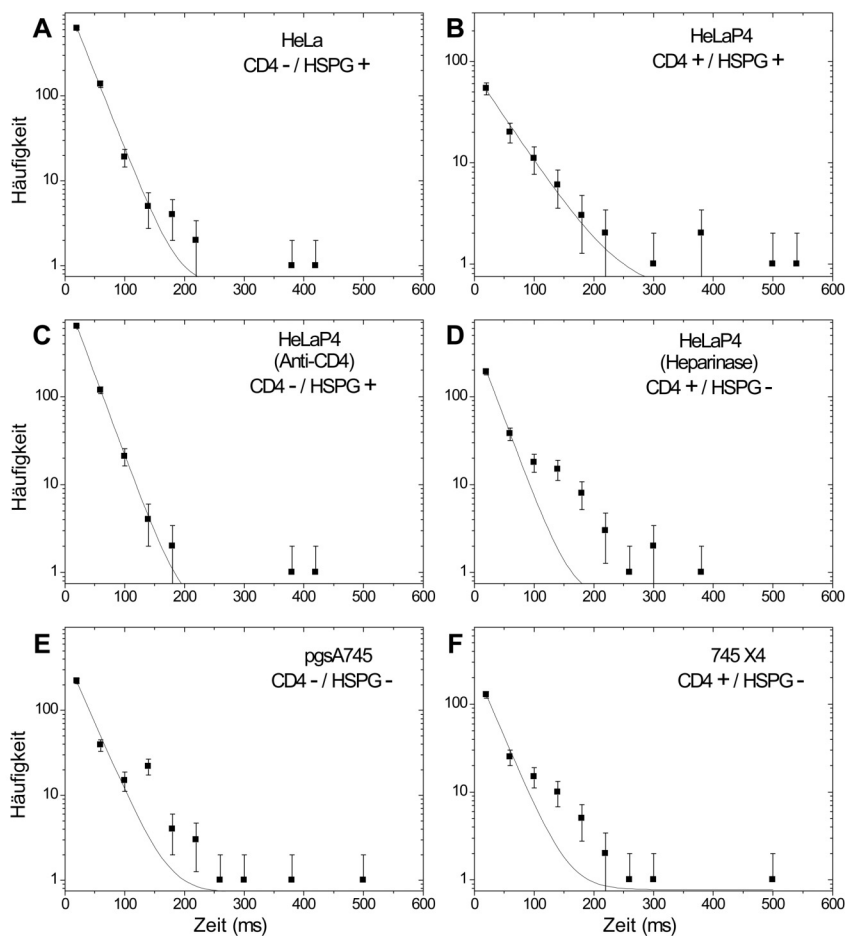


Abbildung 22: Dauer der Virus-Zell-Interaktion bestimmt durch Einzelpartikelmessungen. Die Interaktionszeit von Viruspartikeln mit der Plasmamembran von HeLa-Zellen, HeLaP4-Zellen und CHO-Derivaten wurde mittels Einzelpartikelstudien bestimmt und als Histogramm aufgetragen. An die Histogramme wurde eine einfache Exponentialfunktion angepasst oder - wenn keine Anpassung möglich war - aus einem anderen Datensatz übernommen (in (D) und (F)). Aus der Anpassung wurde die mittlere Interaktionszeit τ bestimmt. (A) HeLa-Zellen ($\tau = 24$ ms), (B) HeLaP4-Zellen ($\tau = 49$ ms), (C) HeLaP4-Zellen, die mit α -CD4-Antikörper vorbehandelt wurden, ($\tau = 24$ ms), (D) HeLaP4-Zellen, die mit Heparinase I vorbehandelt wurden; die Daten konnten nicht mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden, daher wird zum Vergleich die Anpassung aus Abbildung (C) gezeigt. (E) CHO pgsA745-Zellen ($\tau = 27$ ms) und (F) CHO pgsA745X4-Zellen. Die Daten konnten nicht mit einer einfachen Exponentialfunktion angepasst werden; zum Vergleich wird die Anpassung aus Abbildung (E) gezeigt. (Auswertung durchgeführt von Thomas Endress.)

8.8 Analyse der Virus-Zell-Interaktion mit VSV-G pseudotypisierten HI-Viruspartikeln

In den bis zu diesem Zeitpunkt analysierten über 10.000 Virustrajektorien konnte kein Fusionsereignis detektiert werden. Um die Wahrscheinlichkeit der Detektion eines Farbtrennungseignisses zu erhöhen, wurde in weiteren Experimenten ein hochfusogenes virales Hüllprotein eingesetzt. Hierbei wurde anstelle des HIV-Hüllproteins das glykosylierte Hüllprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) in die Lipidmembran des Viruspartikels eingebaut. Das die Fusion vermittelnde Protein bestimmt den Eintrittsweg und die Effizienz des Viruseintritts in die Zelle. Der Eintritt der pseudotypisierten HI-Viruspartikel in die Zielzelle erfolgte in diesem Fall nicht an der Plasmamembran, sondern durch pH-abhängige Fusion aus dem Endosom.

Die Produktion der pseudotypisierten Viruspartikel erfolgte analog zu den bisher verwendeten Viruspartikeln, mit der Ausnahme dass nun vier Plasmide transfiziert wurden. Hierfür wurden zwei Derivate von pCHIV und pCHIV.eGFP eingesetzt (pCHIV Δ ENV und pCHIV.eGFP Δ ENV). Diese besaßen einen aufgefüllten *NdeI*-Restriktionsschnitt (*cleavage site fill in*) im *env*-Leseraster, so dass kein funktionelles HIV-Hüllprotein gebildet werden konnte. Dazu wurde pmRFP1.Vpr und ein Plasmid kodierend für das VSV-Glykoprotein (pVSV-G) kotransfiziert. Zusätzlich standen auch noch die Plasmide peGFP.Vpr und pCHIV.mCherry Δ ENV für die inverse Farbkombination zur Verfügung. mCherry ist ein in Bezug auf die Quantenausbeute und die Photostabilität verbessertes mRFP1 (Shaner *et al.*, 2004; Shaner *et al.*, 2005).

8.8.1 Einfluss des pH-Werts auf die Fluoreszenzintensität von Viruspartikeln

Veränderungen des pH-Werts können die Emission fluoreszierender Proteine verändern, wobei bei niedrigeren pH-Wert oft eine Reduktion der Helligkeit (*quenchen*) erfolgt. Eine Übersicht über die pKa-Werte verschiedener fluoreszierender Proteine ist in (Shaner *et al.*, 2005) zu finden. Für mRFP1 lagen hierzu keine Literaturdaten vor. Daher wurden im folgenden Viruspartikel im Fluoreszenzspektrometer bei verschiedenen pH-Werten auf die Stärke der Fluoreszenzemission beider inkorporierter Fluorophore untersucht. Hierzu wurden Viruspartikel in einem Puffer mit entsprechendem pH-Wert verdünnt und die Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Das Fluorophor mRFP1 war im analysierten pH-Bereich von 4 bis 9 stabil. eGFP zeigte hingegen bei pH-Werten unter 5,5 eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz (Abbildung 23). Die Fusion von VSV-G pseudotypisierten Partikeln findet im Bereich von pH 5,0 bis 6,5 statt. Somit war eine

deutlichen Abnahme der Intensität von eGFP im angesäuerten Endosom zu erwarten, während die Intensität des mRFP1-Signals weitgehend konstant bleiben sollte.

Nach der Fusion aus einem Endosom befinden sich die Partikel im neutralen Zytosol. Daher wurde untersucht, ob die Reduktion der eGFP-Fluoreszenz reversibel war. Hierzu wurden Viruspartikel in 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4,5) inkubiert und durch Zugabe des 2,5fachen Volumens an 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) neutralisiert. Die Änderung der Fluoreszenzintensität beider Fluorophore wurde über die Zeit verfolgt (Abbildung 23). Bei Veränderung des pH-Werts von pH 7,5 auf pH 4,5 verringerte sich die eGFP-Fluoreszenz um ca. 80 %, die mRFP1-Fluoreszenz hingegen nur um ca. 20-25 %. Die Reaktion war innerhalb der ersten 2 min abgeschlossen. Nach der Änderung auf einen neutralen pH-Wert stieg sowohl die eGFP- als auch die mRFP1-Fluoreszenz wieder an. Das mRFP1-Signal erreichte nach 2 min ca. 85-90 % von der Ausgangsfluoreszenz und blieb über die weitere Messzeit stabil. Bei eGFP stieg die Fluoreszenz über 6 min auf ein Plateau von ca. 60-70 % der Ausgangsfluoreszenz an (Abbildung 23). Das Quenchen der Fluoreszenzintensität war somit partiell reversibel.

Bei Verwendung von MA.eGFP und mRFP1.Vpr markierten Partikeln kann die Reduktion des eGFP-Signals dazu führen, dass bei Ansäuerung des Endosoms das MA-eGFP-Signal unter die Detektionsgrenze des Fluoreszenzmikroskops gequencht wird. In diesem Fall können endozytierte komplette Viruspartikel nicht von subviralen Partikeln unterschieden werden. Daher bot es sich aufgrund der guten pH-Stabilität von mRFP1 bzw. mCherry (Shaner *et al.*, 2005) an, die Viruspartikel mit den Fluoreszenzmarkern MA.mCherry und eGFP.Vpr herzustellen. Ein Quenchen von eGFP würde so die Zahl der als subviral eingestuften Partikel nicht erhöhen.

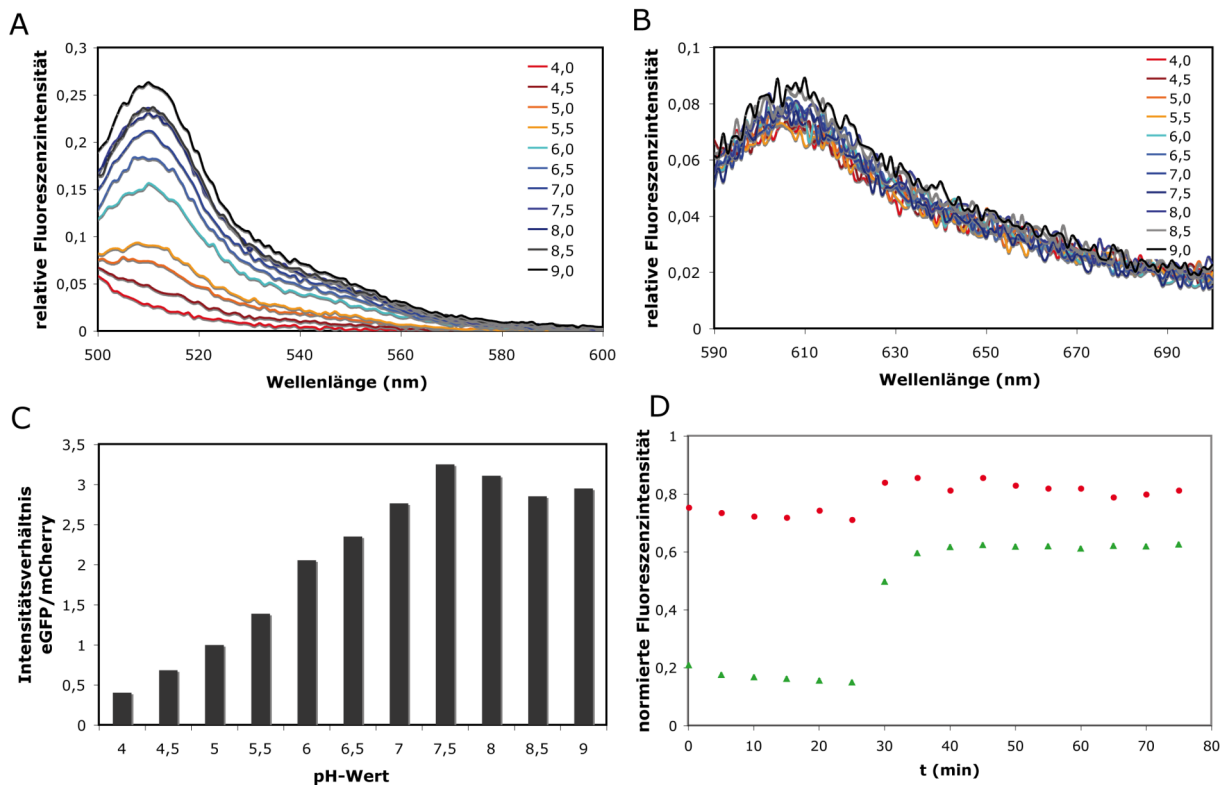


Abbildung 23: Effekt von pH-Wert-Änderungen auf die Fluoreszenzintensität von eGFP und mRFP1 im Viruspartikel. Viruspartikel, die mit MA.eGFP und mRFP1.Vpr fluoreszenzmarkiert waren, wurden in Pufferlösungen mit dem angegebenen pH-Wert für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die eGFP-Fluoreszenzspektren (A) und die mRFP1-Fluoreszenzspektren (B) wurden bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen. (C) Auftragung des Intensitätsverhältnisses von eGFP zu mRFP1 in Abhängigkeit vom pH-Wert. (D) Zeitverlauf der Veränderung der Fluoreszenzintensität bei wechselnden pH-Werten. Die Viruspartikel wurden in Puffer (pH 7,5) inkubiert und deren Fluoreszenzintensität detektiert. Alle weiteren gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf diesen Ausgangswert normiert. Zu Beginn der Messung wurde der pH-Wert auf 4,5 abgesenkt und nach 30 min durch Zugabe von Puffer mit einem pH-Wert von 8,5 auf einen pH-Wert von 7,5 angehoben.

8.8.2 Fusionsinhibition von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln

Die Experimente zur Virus-Zell-Interaktion sollten immer mit Kontrollen unter nicht-fusogenen Bedingungen durchgeführt werden. Als Inhibitor für die VSV-G vermittelte Fusion ist Bafilomycin A1 beschrieben, ein Inhibitor der v-ATPase (Campbell *et al.*, 2007; Schaeffer *et al.*, 2004). Die Inhibition dieser Protonenpumpe verhindert die Ansäuerung des Endosoms und damit die pH-abhängige Fusion der Viren. Die optimale Konzentration an Bafilomycin A1 wurde mit Hilfe des oben beschriebenen β -Lactamase-Fusions-Assay bestimmt. HeLaP4-Zellen wurden in Gegenwart von 10, 50 und 100 nM Bafilomycin A1 für 30 min in DMEM mit 10 % (v/v) FKS vorinkubiert und anschließend β -Lactamase-Vpr markierte VSV-G pseudotypisierte Viruspartikel (entsprechend 50 ng p24) zugegeben. Nach 5 h Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mit CCF2 beladen. Das Fluoreszenzverhältnis (447/520) wurde wie in (8.5.3) bestimmt und die Effizienz des Viruseintritts im Vergleich zu nicht mit

Bafilomycin A1 inkubierten Zellen berechnet. Bei allen verwendeten Bafilomycinkonzentrationen war eine vollständige Inhibition des Viruseintritts zu detektieren (Abbildung 24). Für die folgenden Experimente wurden 50 nM Bafilomycin A1 eingesetzt.

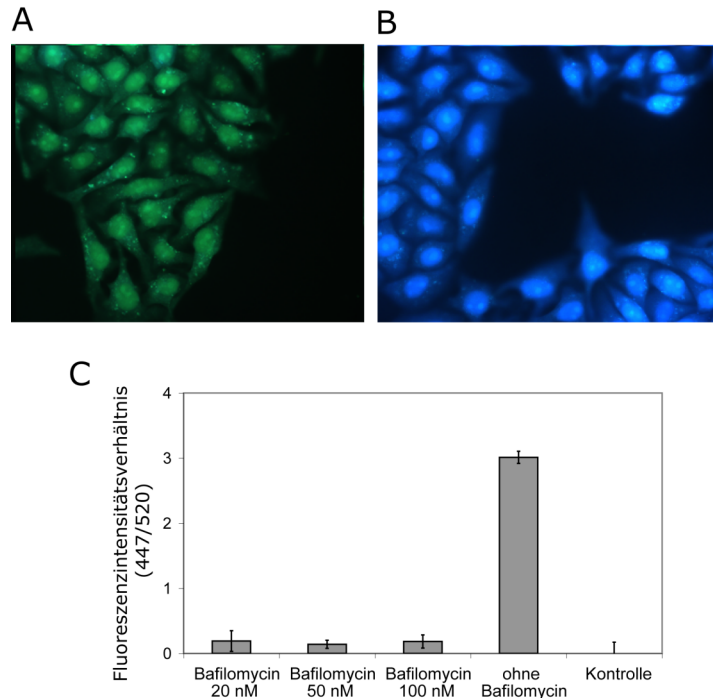


Abbildung 24: Bestimmung der optimalen Bafilomycin A1-Konzentration zur Hemmung der Virusfusion für Lebendzelleexperimente. HeLaP4-Zellen wurden mit β -Lactamase-Vpr enthaltenden, VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Bafilomycin A1 inkubiert und die Effizienz der Fusion mittels β -Lactamase-Fusionsassay analysiert. (A) Mikroskopische Aufnahme von HeLaP4-Zellen, die nicht mit Viruspartikeln inkubiert wurden, nach Inkubation mit CCF2. (B) Mikroskopische Aufnahme von mit CCF2-beladenen HeLaP4-Zellen nach Inkubation mit VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln, die β -Lactamase-Vpr inkorporiert hatten. (C) Quantitative Auswertung der CCF2-Fluoreszenz von HeLaP4-Zellen im Fluoreszenzspektrometer. Die Zellen wurden mit den angegebenen Bafilomycin A1-Konzentrationen 30 min bei 37°C vorbehandelt. Mit Ausnahme der Kontrolle wurden alle Zellen mit Viruspartikeln in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Inhibitors für 5 h bei 37°C inkubiert, fixiert und mit CCF2 beladen. Das Fluoreszenzintensitätsverhältnis von 447 nm zu 520 nm ist dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des in Dreifachansätzen durchgeführten Experiments dar. Der Kontrollwert wurde von den anderen Messwerten subtrahiert.

8.8.3 Virus-Zell-Interaktionen von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln

In ersten Experimenten wurden HeLaP4-Zellen mit VSV-G pseudotypisierten doppelt fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln (entsprechend 50 ng p24) in PBS bei 37°C inkubiert. Zunächst wurde im Fluoreszenzmikroskop beobachtet, dass sich die Viruspartikel in Endosomen-ähnlichen Strukturen ansammelten. Zu späteren Zeitpunkten (ca. 1 h) wurde eine diffuse Färbung des Zytoplasmas in der Farbe des MA-Fluorophors und des Nukleus in der Farbe des Vpr-Fluorophors beobachtet (Abbildung 25). In Kontrollexperimenten mit Bafilomycin A1 wurde die Ansammlung in endosomalen Kompartimenten, jedoch keine Farbtrennung

beobachtet (Abbildung 25). Diese fusionsabhängige Farbtrennung wurde als Hinweis gewertet, dass eine große Anzahl von Viruspartikeln fusioniert hatte. Da die initialen Experimente vielversprechend verliefen, sollte die Detektion von einzelnen Fusionsereignissen durch Farbtrennung nachgewiesen werden.

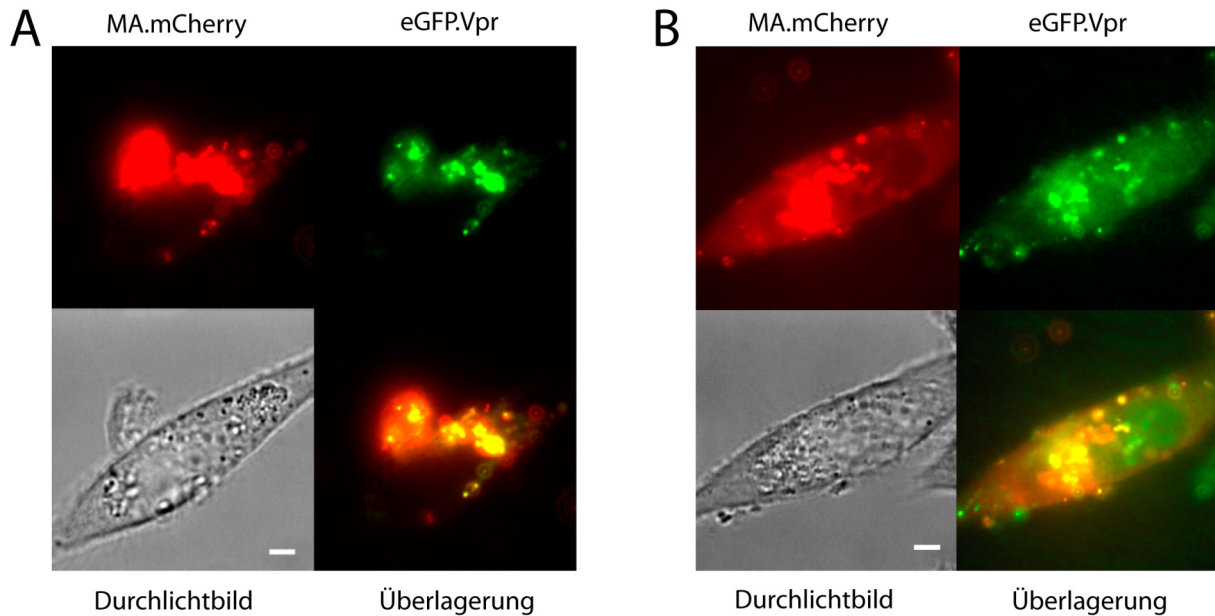


Abbildung 25: Intrazelluläre Trennung von MA- und Vpr-Fluoreszenzsignalen nach Fusion von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln mit HeLaP4-Zellen. Die Zellen wurden 30 min mit 50 nM Bafilomycin A1 (A) vorbehandelt oder durchliefen eine *mock*-Behandlung (B). Diese Zellen wurden für 2 h mit VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln, die mit MA.mCherry und eGFP.Vpr fluoreszenzmarkiert waren, bei 37°C inkubiert, wobei in (A) 50 nM Bafilomycin A1 während der Inkubation zugegen war. Maßstab 4 µm.

8.8.4 Untersuchung der Virus-Zell-Interaktion mittels Semi-Automatischer Auswert-Algorithmen

In den anfänglichen Experimenten wurde manuell nach einem Farbtrennungseignis gesucht. Da dies sehr zeitaufwendig war, wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Bioinformatik der Universität Heidelberg, Gruppe Prof. Karl Rohr, eine Tracking-Software entwickelt, die in der Lage war die Bewegung von Viruspartikeln automatisch zu verfolgen und ihre Wege, die Trajektorien, aufzuzeichnen. Dabei sollte auch die Helligkeit der roten und grünen Fluorophore ermittelt und für die Auswertung das Farbverhältnis (rot/grün) dargestellt werden, wodurch potentielle Fusionsereignisse identifiziert werden können. Die Details der Tracking-Software werden in einem gesonderten Kapitel besprochen (8.13).

Aus den Trajektorien konnten auch Informationen über das Bewegungsverhalten der Viruspartikel gewonnen werden. Hierzu wurde das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle r^2 \rangle$ für ein gegebenes Zeitintervall Δt berechnet und gegen dieses aufgetragen (*mean square displacement*-Plot; MSD-Plot).

Grundsätzlich ließ sich in der Diffusionstheorie die Bewegung eines Partikels in vier Kategorien einteilen, die sich auch aus dem MSD-Plot bestimmen ließen (Abbildung 26): (I) freie Diffusion (*free diffusion*), (II) anomale Diffusion (*anomalous diffusion*), (III) begrenzte Diffusion (*confined diffusion*) und (IV) gerichtete Bewegung (*directed movement*).

Bei der freien Diffusion (I) bewegte sich das Partikel frei im Puffer, ohne Begrenzungen oder aktiv angreifende Kräfte. Im MSD-Plot schlug sich dieses Verhalten in einer Geraden wider. Aus dem Zusammenhang (hier für 2D-Diffusion in der Ebene)

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt$$

konnte der Diffusionskoeffizient D errechnet werden. Aus dem Diffusionskoeffizienten konnte wie in (8.5.4) bereits angewendet, der hydrodynamische Radius bestimmt werden.

Bei der anomalen Diffusion (II) waren Bereiche für den Partikel ausgeschlossen, so dass er an den Grenzen dieser abprallte. Im MSD-Plot wurde dieser Fall durch eine Hyperbel beschrieben. Durch mathematisches Angleichen der experimentellen Daten an die Formel

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt^\alpha$$

mit α als Restriktionsparameter (*restriction parameter*) konnte ebenfalls der Diffusionskoeffizient bestimmt werden. Ein Beispiel für dieses Verhalten wäre ein frei in der Plasmamembran diffundierendes Transmembranprotein, der von bestimmten Mikrodomänen ausgeschlossen war. Für den Fall der freien Diffusion würde $\alpha=1$.

Die begrenzte Diffusion (III) fand in einem abgeschlossenen Bereich statt, der bei der Anpassung zuerst als zweidimensionaler Kreis berechnet wurde (Erwartungswert des Radius des abgeschlossenen Bereichs im Quadrat: $\langle r_c^2 \rangle$). Dieser Erwartungswert wurde in den weiteren Optimierungsschritten der Anpassung durch die Berechnung der Parameter A_1 und A_2 , die die Abweichung der realen Geometrie vom vorherigen Erwartungswert beschrieben, entsprechend korrigiert. Im MSD-Plot ergab sich die Form einer Sättigungshyperbel, die mit der Formel

$$\langle r^2 \rangle = \langle r_c^2 \rangle \left[1 - A_1 e^{\frac{-4A_2Dt}{\langle r_c^2 \rangle}} \right]$$

beschrieben werden konnte, wobei $\langle r_c^2 \rangle$ den Grenzwert der Funktion wiedergab. Ein Beispiel hierfür wäre die Diffusion eines Partikels in einem Hohlraum, z.B. einem Endosom.

Wurde der Partikel z.B. aktiv von einem Motorprotein transportiert, so fand eine Diffusion mit Drift, hier auch als gerichtete Bewegung bezeichnet, statt. Der MSD-Plot konnte mit der Formel

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt + (vt)^2$$

angepasst werden. Die Geschwindigkeit der gerichteten Bewegung des Partikels wurde durch v repräsentiert (Abbildung 26).

Mit der MSD-Analyse war eine objektive Analyse der Art der Partikelbewegung und des Diffusionskoeffizienten ohne vorherige Annahme eines Bewegungsmodells möglich. Bei gemischten Bewegungsmustern, z.B. bei einer begrenzten Diffusion, die in eine gerichtete Bewegung überging, war eine Aufteilung der zeitlichen Abfolge der Bewegungen anhand des MSD-Plot nicht möglich. Beide Bewegungsmuster trugen zu einem Gesamteindruck bei, bei dem meist ein Bewegungsmuster vorherrschend war.

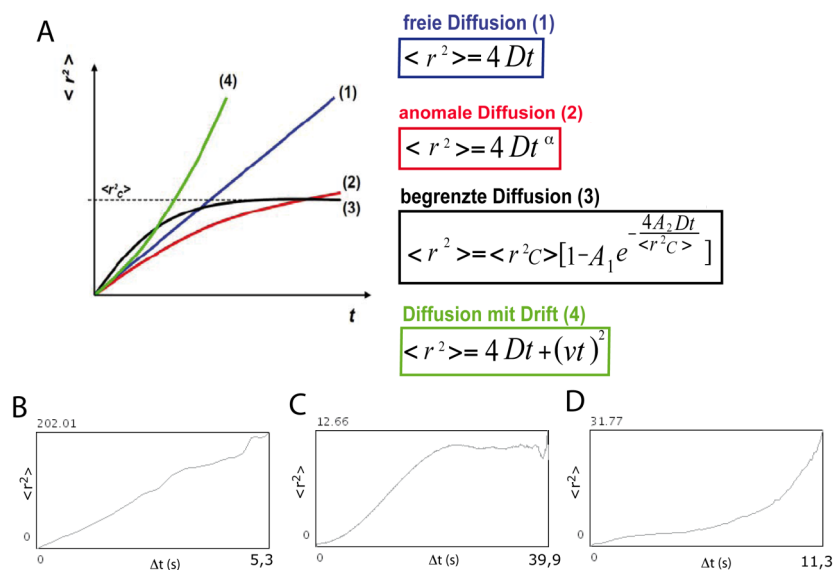


Abbildung 26: Analyse der Bewegung von Viruspartikeln anhand der Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats $\langle r^2 \rangle$ gegen das Zeitintervall Δt . (A) Übersicht des theoretischen Erscheinungsbilds verschiedener Bewegungsarten in der Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats $\langle r^2 \rangle$ gegen das Zeitintervall Δt und mathematische Beschreibung des jeweiligen Verhaltens. Beispiele aus den durchgeführten Messungen für freie Diffusion (B), „eingeschränkte“ Diffusion (C), wobei hier begrenzte und anomale Diffusion für die manuelle Auswertung nur schwer zu unterscheiden sind und deshalb zusammengefasst wurden und für eine gerichtete Bewegung (D).

Für die Experimente zur Virus-Zell-Interaktion wurden HeLaP4-Zellen mit VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln (entsprechend 50 ng p24), die mit MA.mCherry und eGFP.Vpr fluoreszenzmarkiert waren, bei 37°C in PBS mit Magnesium- und Kalziumchlorid inkubiert. Es wurden jeweils 40 s lange Filme von einer Zelle oder kleinen Zellgruppe angefertigt und danach eine neue Zelle oder Zellgruppe beobachtet. Dieses wurde für die Gesamtdauer des Experiments von 2 h fortgesetzt. Als Kontrolle dienten HeLaP4-Zellen, die 30 min mit 50 nM Bafilomycin A1 im Zellkulturmedium Hybridomed 1000F bei 37°C vorinkubiert worden waren, und während des Experiments mit der gleichen Menge Virus in PBS mit Magnesium- und Kalziumchlorid mit Zusatz von 50 nM Bafilomycin A1 bei 37°C inkubiert wurden.

Die Daten wurden mit der Tracking-Software analysiert. Trajektorien, die sich über 50 Aufnahmen erstreckten, wurden als MSD-Plot aufgetragen, manuell nach dem dominierenden Bewegungsmuster klassifiziert und in folgende Kategorien eingeteilt: (A) freie Diffusion (I), (B) begrenzte und anomale Diffusion (II) und (III), (C) gerichtete Diffusion (IV). Die Kategorien (II) und (III) für anomale und begrenzte Diffusion wurden zusammengefasst, da eine klare Unterscheidung, ob die Messwerte gegen einen Limit streben, aufgrund der möglichen Überlagerung verschiedener Bewegungsmuster nicht immer möglich war (Abbildung 26).

Bei einer Auswertung von insgesamt 3.225 Trajektorien konnte kein Unterschied in den Bewegungsmustern zwischen fusogenen und nicht-fusogenen Bedingungen festgestellt werden (Abbildung 27).

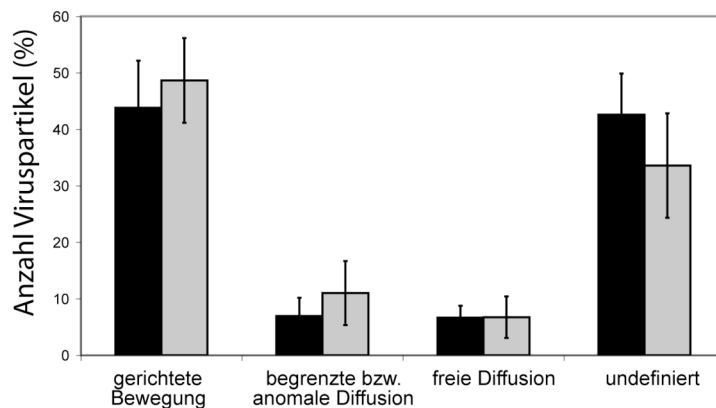


Abbildung 27: Charakterisierung der Bewegungsmuster von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln. Die Bewegungsmuster von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln, die mit MA.mCherry und eGFP.Vpr markiert waren, wurden unter fusogenen (schwarze Balken) und nicht fusogenen Bedingungen (durch Inhibition der Ansäuerung des Endosoms mit Bafilomycin A1) (graue Balken) verglichen. Hierbei wurde die vorherrschende Bewegung der Gesamtrajektorie gewertet und in die Kategorien freie Diffusion, begrenzte bzw. anomale Diffusion und gerichtete Bewegung eingeteilt. Eine Reihe von Trajektorien konnte nicht eindeutig zugeordnet werden (undefiniert).

Die 3.225 Partikeltrajektorien für die Analyse des Bewegungsmusters wurden auch auf mögliche Fusionsereignisse hin untersucht. Zusätzlich wurden 1.038 weitere Partikeltrajektorien betrachtet. Hierzu wurde das Fluoreszenzverhältnis (Grün/Rot) aufgetragen und nach Änderungen desselben manuell gesucht, da die Fusion über eine Farbtrennung definiert sein sollte. Ungefähr 30 % aller Trajektorien über 50 Aufnahmen Länge zeigten Auffälligkeiten im Fluoreszenzverhältnis. Diese ließen sich in zwei Kategorien gliedern: (I) rasche Veränderung des Fluoreszenzverhältnisses innerhalb von weniger als 20 Bildern bei einem danach wieder konstanten Fluoreszenzverhältnis oder (II) fortschreitende Veränderung des Fluoreszenzverhältnisses über mehr als 20 Bilder. Alle auffälligen

Trajektorien wurden manuell überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die meisten Trajektorien, die in Kategorie (I) eingeordnet worden waren, durch verschiedene Artefakte hervorgerufen wurden. So kam es zu einer Änderung des Fluoreszenzverhältnisses, wenn ein Partikel nahe an einem anderen Partikel vorbeizog, da diese Fluoreszenz zumindest teilweise in die Berechnung des Verhältnisses mit einbezogen wurde. Darüber hinaus kam es vor, dass die Tracking-Software einen Partikel nicht mehr verfolgen konnte und stattdessen einen naheliegenden anderen Partikel mit anderem Fluoreszenzverhältnis verfolgte. Die Hauptursache für langsam fortschreitende Veränderungen des Fluoreszenzverhältnisses der Kategorie (II) waren Partikel, die sich aus dem Objektivfokus bewegten. Ursache hierfür war die technisch bedingte chromatische Aberration des Objektivs, bei der die Foci für rote und grüne Fluoreszenz nicht exakt in derselben Ebene lagen, wodurch die Bewegung eines Partikels senkrecht zur Beobachtungsebene sich nicht nur in einer Ausdehnung des Signals (Unschärfe) widerspiegelt, sondern auch in einer leichten Änderung des Fluoreszenzverhältnisses.

Durch eine optimierte Detektion der Partikelhelligkeit (z.B. durch Verwendung einer 2D-Gauss-Anpassung) sollte in Zukunft eine Verbesserung in der Bestimmung des Fluoreszenzverhältnisses eintreten.

8.8.5 Detaillierte Analyse eines Einzelereignisses

Bei der systematischen Analyse der Experimente gelang es, ein Farbtrennungseignis zu identifizieren, das die ursprünglich definierten Kriterien erfüllte. Das Partikel befand sich während der gesamten Beobachtungszeit von 40 s in der Fokusebene und konnte von der Tracking-Software die ganze Zeit verfolgt werden. Dieser Partikel zeigte eine überdurchschnittliche Intensität der roten Fluoreszenz, des MA.mCherry, was die Detektion von Veränderungen des Fluoreszenzsignals in diesem Kanal erleichterte, und ein schwaches eGFP.Vpr Fluoreszenzsignal (Abbildung 28). Die angegebenen Fluoreszenzintensitäten wurden um die Hintergrundfluoreszenz korrigiert, die durch Messung einer Referenzregion nahe der eigentlichen Trajektorie in einem partikelfreien Bereich des Zytsols für die gesamte Zeit parallel gemessen wurde. Die Bewegung des Partikels ließ sich manuell in vier Phasen gliedern. In der ersten Phase war das Viruspartikel zweifarbig und führte eine gerichtete Bewegung für ca. 6 s mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von ca. $0,6 \mu\text{m/s}$ aus, wobei eine lineare Bewegung zwischen dem manuell gewählten Anfangs- und Endpunkt angenommen wurde.

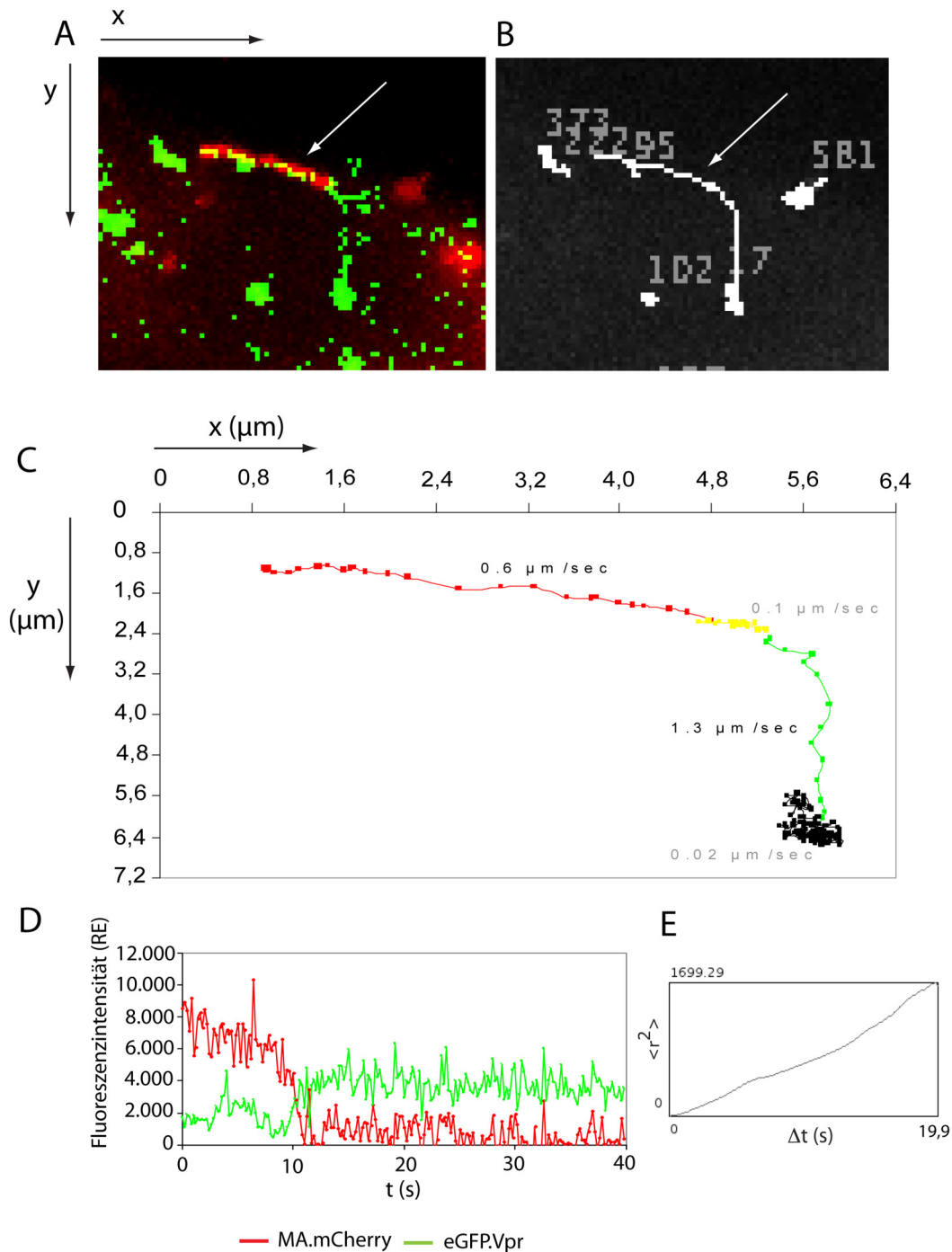


Abbildung 28: Analyse eines Farbtrennungseignisses. (A) Maximumprojektions einer 40 s Bildsequenz, die mit einer Bildfrequenz von 5 Hz aufgenommen wurde. Die Trajektorie des Partikels, das eine Farbtrennung aufwies, ist mit einem Pfeil markiert. (B) Ergebnis der Tracking-Software. Das Viruspartikel konnte über die gesamte Dauer der Bildsequenz von der Tracking-Software verfolgt werden (Track 17). (C) Die Partikeltrajektorie wurde als xy-Auftragung der Partikelposition erstellt und manuell in unterschiedliche Bewegungsphasen gegliedert. Die rote und grüne Phase zeigten eine durchschnittliche Geschwindigkeit von 0,6 $\mu\text{m}/\text{s}$ bzw. 1,3 $\mu\text{m}/\text{s}$ berechnet unter der Annahme einer linearen Bewegung vom Anfangs- zum Endpunkt der Phase. Die schwarz-markierte Phase war eine begrenzte Diffusion des Partikels. (D) Intensitäten der Fluoreszenzmarker (MA.mCherry – Rot und eGFP.Vpr – Grün) aufgetragen gegen die Zeit. Nach 10 s reduzierte sich die MA.mCherry-Fluoreszenz und die eGFP.Vpr-Fluoreszenz stieg an. (E) Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats gegen das Zeitintervall des analysierten Partikels.

In der zweiten Phase war das Partikel nahezu stationär und bewegt sich kaum. Während dieser Phase, die ca. 4 s dauerte, reduzierte sich die Rotfluoreszenz um mehr als 85 % und die Grünfluoreszenz verdoppelte sich. Der Übergang zur dritten Bewegungsphase trat noch während der Veränderung des Fluoreszenzverhältnisses ein. Das Partikel zeigte in dieser Phase eine gerichtete Bewegung für ungefähr 3 s mit einer Geschwindigkeit von 1,3 $\mu\text{m/s}$, wobei wieder eine lineare Bewegung zwischen den manuell gewählten Anfangs- und Endpunkt angenommen wurde. Bis zum Ende der Beobachtungszeit bewegte sich das Partikel für ungefähr 25 s mit der typischen Charakteristik einer begrenzten Diffusion im Zytosol. Die Fluoreszenzintensitäten der beiden Fluorophore blieben nach der Farbtrennung konstant.

Somit war es grundsätzlich - technisch und biologisch - möglich, Farbtrennungseignisse zu detektieren. In Kontrollexperimenten mit dem Inhibitor Bafilomycin A1 konnte kein Farbtrennungseignis detektiert werden.

8.9 Analyse der Farbtrennung auf Einzelpartikelebene in fixierten Zellen

Die Detektion eines Farbtrennungseignisses zeigte die grundsätzliche Eignung der im Rahmen dieser Doktorarbeit etablierten bzw. weiterentwickelten Methoden zur Detektion von Farbtrennungseignissen. Allerdings wurde erwartet, eine höhere Anzahl solcher Ereignisse zu detektieren, da die diffuse Färbung des Zytosols und des Nukleus der HeLaP4-Zellen ab 1 h nach Viruszugabe die erfolgreiche Fusion von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln belegte (8.8.3).

Um detaillierte Informationen über die Fluoreszenzverhältnisse der Markerfluorophore auf Einzelpartikelebene über die Zeit zu gewinnen, wurden Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nach Viruszugabe fixiert und die gesamte Zelle dreidimensional fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dies ermöglichte eine größere Anzahl von an Zellen gebundene bzw. in diese internalisierte Viruspartikel im Vergleich zur Lebendzellmikroskopie zu untersuchen, bei der zu einem Zeitpunkt nur eine Zelle bzw. Zellgruppe beobachtet werden konnte. Somit könnten - unter Verlust der Information über das Bewegungsverhalten - statistisch signifikante Informationen über die Fusionskinetik gewonnen werden.

Hierzu wurden HeLaP4-Zellen mit VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln (ca. 20 ng p24), die mit MA.mCherry und eGFP.Vpr markiert waren, in Hybridomed 1000F für 15, 30, 45, 60, 75, 90 und 120 min inkubiert, wobei die Kontrollgruppe mit 50 nM Bafilomycin A1 vorinkubiert wurde und dieses während der gesamten Virusinkubation zugegen war. Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit PBS mit Magnesium- und Kalziumchlorid gewaschen, mit 3 % PFA in PBS für 15 min fixiert und danach in PBS mikroskopiert. Hierzu wurde von den gesamten Zellen ein z-Stapel aufgenommen und mittels eines für diese

Zwecke optimierten ImageJ Makros (modifizierte Version, Ursprungsversion von John Briggs) ausgewertet. Das Makro fertigte eine Maximumsprojektion des Bildstapels an, lokalisierte die einzelnen Fluoreszenzpunkte und ermittelte die Fluoreszenzintensitäten für eGFP und mCherry. Diese Daten konnten für jeden Zeitpunkt in ein Punktdiagramm geschrieben werden (Abbildung 29), allerdings war aufgrund der breiten Streuung der Messwerte eine visuelle Interpretation schwierig. Um dies zu vereinfachen, wurde das Fluoreszenzverhältnis (Grün/Rot) der Viruspartikel gebildet und als Histogramm aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzverhältnisse konnte durch eine Gaußfunktion beschrieben werden (Abbildung 29). Wäre eine große Anzahl an Partikeln fusioniert, so sollte sich die Verteilung zu größeren Werten hin verschieben, indem sich entweder die gesamte Population verschiebt oder sich eine Teilpopulation mit verringerter Rotfluoreszenz bildete. Ersteres würde bedeuten, dass die Viruspartikel nahezu quantitativ fusionierten. Dies wäre allerdings nicht zu erwarten, da einige Partikel an der Zelloberfläche hafteten oder nicht mit der Endosomenmembran fusionieren konnten. Letzteres würde zeigen, dass eine Subpopulation von Partikeln fusioniert hatte und noch vollständige Partikel im Endosom oder an der Zellmembran vorhanden waren. Bei der Analyse der Histogramme für alle Zeitpunkte und beider experimenteller Bedingungen wurde deutlich, dass sich keine Subpopulation herausbildete. Auch der Mittelwert der Verteilung bzw. der Spitzenwert der Gaußanpassung änderte sich nicht (Abbildung 29). Es wurden insgesamt 27.656 Signale analysiert.

Somit schlug sich die nachgewiesene Fusion von Viruspartikeln, die zu einer diffusen Färbung des Zytoplasmas und des Nukleus führte, nicht in einer Änderung des Fluoreszenzintensitätsverhältnisses auf Einzelpartikelebene nieder.

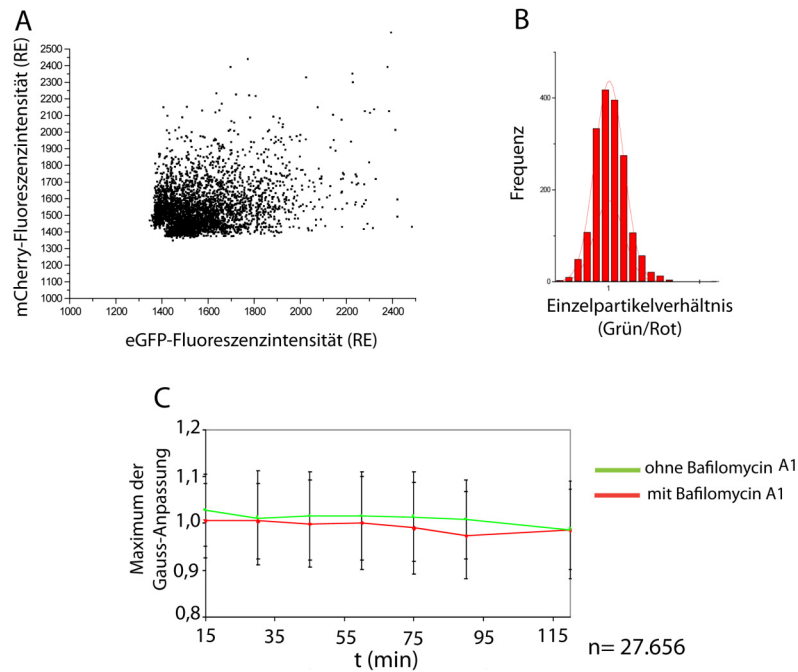


Abbildung 29: Analyse der Farbzusammensetzung von Viruspartikeln unter fusogenen und nicht-fusogenen Bedingungen. HeLaP4-Zellen wurden mit VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln, die mit MA.mCherry und eGFP.Vpr fluoreszenzmarkiert waren, mit bzw. ohne Zugabe von Bafilomycin A1 bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 3 % Paraformaldehyd fixiert und eine dreidimensionale Fluoreszenzaufnahme von mindestens 10 Zellen zu jedem Zeitpunkt angefertigt. Die Fluoreszenzintensität von mCherry bzw. eGFP der Partikel wurde analysiert. Eine Auftragung der Intensitäten im roten und grünen Kanal für jeden analysierten Partikel zu einem Zeitpunkt (15 min ohne Bafilomycin) sind dargestellt (A). Aus den Intensitäten wurde das Grün-zu-Rot-Verhältnis gebildet und als Histogramm aufgetragen (B). Diese Verteilung ließ sich mit einer Gaussfunktion (rote Linie) anpassen. (C) Auftragung des Maximalwerts der Gaussfunktion und der Standardabweichung gegen die Inkubationszeit. Insgesamt wurden 27.656 Signale analysiert.

8.10 Einfluss der Fluoreszenzmarkierung der Viruspartikel auf die Stabilität der Matrixhülle

Der Befund, dass Fusionsereignisse nicht zu einer mikroskopisch detektierbaren Farbtrennung auf Einzelpartikelebene führten, könnte durch folgende Hypothesen erklärt werden: (I) die MA-Hülle sowie auch der Großteil der Vpr-Moleküle dissoziierten in der Regel sofort bei der Fusion vom subviralen Partikel ab; (II) die Partikel fusionierten mit der Membran, die Matrixhülle blieb dabei jedoch komplett oder zu einem erheblichen Teil erhalten und beide Fluoreszenzmarker verschwinden zu einem späteren Zeitpunkt gleichzeitig. Dies konnte entweder durch einen spontanen Zerfall des Partikels im Zytoplasma oder durch den kontinuierlichen Verlust beider Fluorophore über die Zeit geschehen.

Um experimentell zwischen diesen Möglichkeiten zu differenzieren, wurde der Verlust der Lipidmembran *in vitro* simuliert und dabei die Stabilität der Viruspartikel betrachtet. Die Behandlung von reifen, infektiösen Wildtyp-Viruspartikeln mit dem Detergenz Triton X-100

führt zum Verlust der Lipidhülle. Danach können die metastabilen Kapside ohne Matrixhülle aufgereinigt werden (Welker *et al.*, 2000). Unreife Wildtyp-Viren hingegen verlieren bei Behandlung mit Triton X-100 die Lipidmembran, aber die Gag-Hülle bleibt erhalten (Wilk *et al.*, 2001). Dieses Verfahren kann den Verlust der Lipidhülle bei der Fusion mit der Plasmamembran der Wirtszelle simulieren. Es wurde erwartet, dass mit MA.eGFP und mRFP1.Vpr fluoreszenzmarkierte Viruspartikel, die einen hohen Prozessierungsgrad des Gag-Polyproteins im Westernblot aufwiesen (8.5.1), bei Behandlung mit Triton X-100 die Matrixhülle nahezu vollständig verlieren und nur noch mit mRFP1.Vpr markierte subvirale Partikel im Fluoreszenzmikroskop zu detektieren wären. Außer den mit MA.eGFP und mRFP1.Vpr fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln wurden zur Kontrolle auch Partikel, die durch ein membrangebundenes Protein an der Lipidmembran des Virus fluoreszenzmarkiert waren, eingesetzt. Dazu wurde in den Produzentenzellen ein Plasmid kodierend für ein myristyliertes eGFP-Fusionsprotein (pSrc-NLS-eGFP) kotransfiziert. Es konnte von Maria Anders und Barbara Müller gezeigt werden, dass dieses Protein in der Lipidmembran des Virus enthalten war. Das Fluoreszenzsignal war aufgrund der vergleichsweise geringen Inkorporation in das Virion allerdings so schwach, dass es für die Lebendzellmikroskopie nicht geeignet war. Zur Detektion von an Deckgläsern immobilisierten Partikeln war die Fluoreszenzintensität jedoch ausreichend. Es wurden zwei Partikelpräparationen mit membranständigem eGFP hergestellt. Zusätzlich war mCherry.Vpr bzw. MA.mCherry in die Viruspartikel inkorporiert. Diese Viruspartikel wurden für 2 min mit 0,1 % Triton X-100 in PBS bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf ein Deckglas aufgebracht. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Medium durch PBS ersetzt (Abbildung 30). Unter diesen Bedingungen konnten nach Tritonbehandlung von Src-NLS-eGFP und MA.mCherry-Viruspartikeln nur ca. 2 % rote Fluoreszenzsignale verglichen zur Kontrolle, aber keine grünen Signale auf dem Deckglas detektiert werden. Dieses deutete darauf hin, dass mit der Lipidmembran in der Regel auch die Matrixhülle dissoziierte. Bei Verwendung von Src-NLS-eGFP und mCherry.Vpr markierten Partikeln wurden ohne Tritonbehandlung mehrheitlich zweifarbige Fluoreszenzsignale auf dem Deckglas detektiert. Nach Tritonbehandlung waren nur rote Signale zu detektieren. Bei mit MA.eGFP und mRFP1.Vpr fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln trat eine Reduktion der Partikelzahl nach Tritonbehandlung auf, die Mehrheit der verbliebenen Signale war aber zweifarbig. Die Ursache hierfür könnte in der partiellen Prozessierung des Gag-Polyproteins liegen. Um dies untersuchen zu können, musste ein quantitativer Assay entwickelt werden, der gezielte Änderungen der Gag-Prozessierung erlaubte.

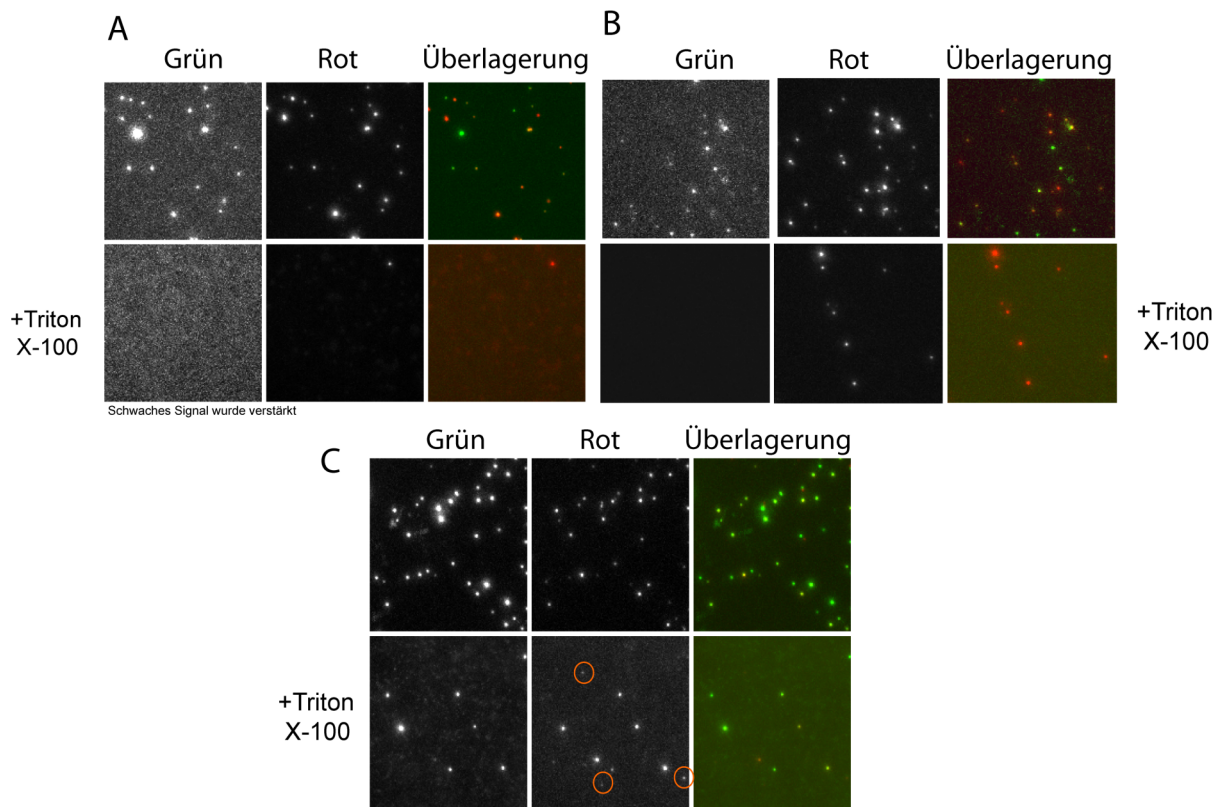


Abbildung 30: Detektion von an unterschiedlichen Positionen im Viruspartikel inkorporierten Fluoreszenzmarkern vor und nach Tritonbehandlung. Die Viruspartikel wurden 2 min mit 0,1 % Triton X-100 in PBS oder nur in PBS verdünnt, 15 min auf einem Deckglas bei Raumtemperatur inkubiert und nicht gebundenen Partikel mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenz der gebundenen Partikel wurde mikroskopisch detektiert. Es wurden folgende fluoreszenzmarkierte Viruspartikel eingesetzt: (A) mit MA.mCherry und mit einem membranverankerten eGFP markierte Viruspartikel; (B) Viruspartikel, die mit mRFP1.Vpr und einem membranverankerten eGFP markiert waren und (C) doppelt fluoreszenzmarkierte Viruspartikel, die mit MA.eGFP und mRFP1.Vpr markiert waren. Einzeln rot-markierte Signale in (C) (mRFP1.Vpr) wurden durch Kreise hervorgehoben. Belichtungszeit 500 ms. (Viruspräparationen zu (A) und (B) hergestellt von Maria Anders.)

8.11 Quantitative Bestimmung der Virusstabilität in Abhängigkeit von der Prozessierung des Gag-Polyproteins

Die Gag-Prozessierung ist ein elementarer Bestandteil der Reifung eines HI-Virus von einem unreifen, nicht-infektiösen Partikel, der eine stabile Hülle aus Gag-Proteinen besitzt, zu einem reifen, infektiösen Partikel mit einer semistabilen Matrixhülle, die eine Fusion mit der Zielzelle erlaubt. Die Reifung eines Viruspartikels kann durch Inhibitoren der viralen Protease, z.B. Lopinavir, verhindert werden.

Im Folgenden wurde die Prozessierung des Gag-Polyproteins mit dem Proteaseinhibitor Lopinavir gezielt beeinflusst. Hierzu wurden auch suboptimale Konzentrationen des Inhibitors verwendet, die zu einer unvollständigen Spaltung des Gag-Polyproteins führten. Um den Effekt auf die Virusinfektiosität zu bestimmen, wurden HIV-infizierte MT4-Zellen in der Gegenwart von Lopinavir mit uninfizierten Zellen gemischt. Die Virusüberstände wurden

in Abwesenheit von Lopinavir auf TZM-Zellen titriert und die relative Infektiosität über die Luciferase-Aktivität (7.7.5) bestimmt. Ab einer Konzentration von 100 nM Lopinavir im Medium war das Virus nicht mehr in der Lage, Zellen zu infizieren. Die Gag-Prozessierung war bei einer Lopinavir-Konzentration von 100 nM deutlich verändert, da intermediäre Bandenmuster im Westernblot mit einem gegen das virale Matrixprotein gerichteten Antikörper nachgewiesen wurden. Bei 2 mM Lopinavir war keine Prozessierung des Gag-Polyproteins mehr detektierbar (Abbildung 31). Um die Stabilität der Matrixhülle abschätzen zu können, sollten Viruspartikel mit MA.eGFP in Gegenwart verschiedener Konzentrationen Lopinavir produziert und die Effizienz der Gag-Prozessierung mit dem Anteil der Partikel, die bei milder Detergenzbehandlung noch als punktierte Signale auf dem Deckglas detektiert werden konnten, verglichen werden. Die Viruspartikel wurden in 293T-Zellen hergestellt, wobei ab dem Zeitpunkt der Transfektion der Inhibitor in allen Medien zugegen war. Die DMSO-Konzentration wurde bei allen verwendeten Inhibitorkonzentrationen konstant auf 0,5 % gehalten.

Die Viruspartikel (10 ng p24) wurden für 2 min in 300 µl 0,1 % Triton X-100 in PBS bzw. in PBS verdünnt und danach 15 min auf einem Deckglas inkubiert. Danach wurde das Medium durch PBS ersetzt. Es wurden 30 Sichtfelder auf dem Deckglas aufgenommen und die Zahl der gebundenen Viruspartikel ausgewertet. Hierzu wurde das bereits zur Auswertung der Fluoreszenzintensität der Viruspartikel in (8.9) verwendete *ImageJ* Makro eingesetzt. Da sich nach der Tritonbehandlung von Viruspartikeln ein grün fluoreszierender Schleier auf dem Deckglas bildete, wurden nur Partikel ausgewertet, deren Helligkeit oberhalb dieses Hintergrunds lag. Der Schwellenwert war bei der Analyse einer gesamten Messreihe konstant. Der fluoreszierende Hintergrund hinterließ ein vergleichbares Muster auf dem Deckglas, wie es durch eine Inkubation mit aufgereinigtem eGFP erhalten wurde (Abbildung 31). Es könnte daher sein, dass dieses Muster durch freies MA.eGFP verursacht wurde, das an das Deckglas gebunden hatte.

Alle folgenden Angaben erfolgen als % der noch vorhandenen punktförmigen Signale nach Tritonbehandlung. Dies errechnete sich aus

$$\text{stabile Signale } (\%) = \frac{n_{\text{Triton}}}{n_{\text{PBS}}} \times 100$$

mit n_{Triton} als Zahl der auf 30 Sichtfeldern detektierten Viruspartikel nach Tritonbehandlung und n_{PBS} als Zahl der gebunden Partikel in der Kontrollgruppe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, die sich aus den Schwankungen der Anzahl der Viruspartikel in den einzelnen Messfeldern ergaben.

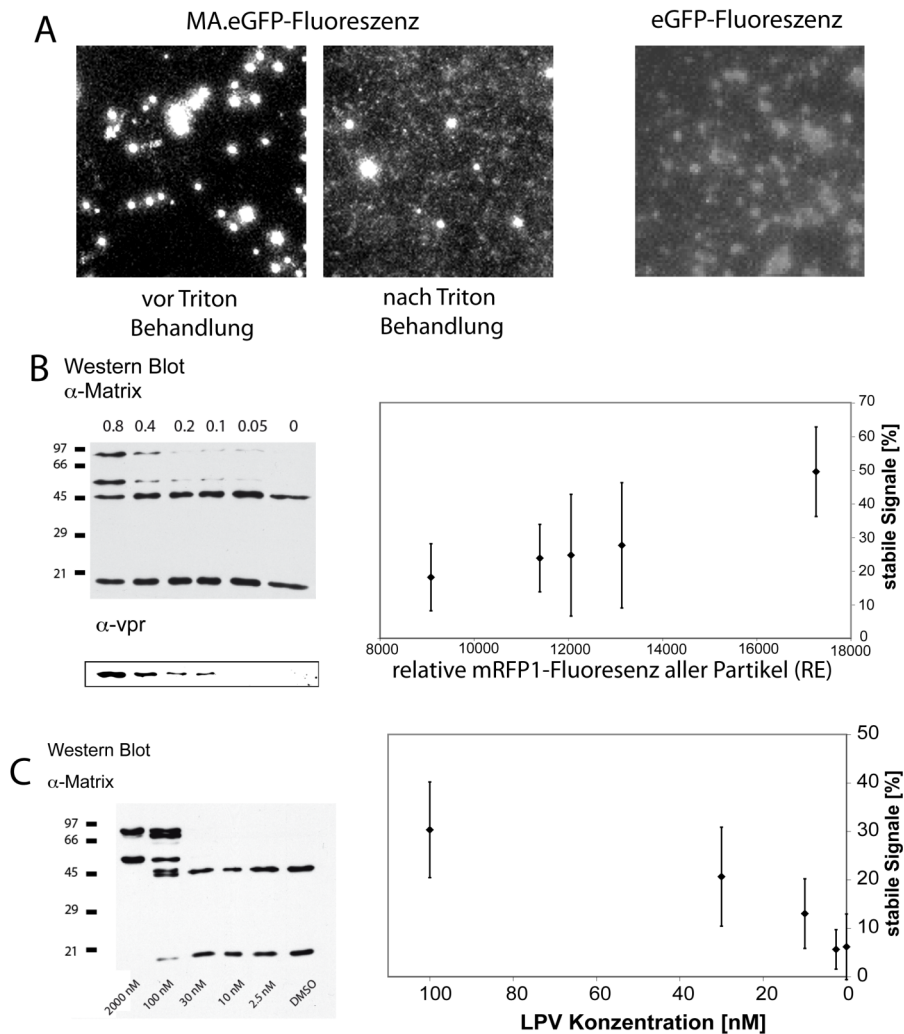


Abbildung 31: Quantifizierung der Partikelstabilität nach Tritonbehandlung. (A) Mit MA.eGFP fluoreszenzmarkierte Viruspartikel gebunden an ein Deckglas vor (links) und nach Tritonbehandlung (mitte). Beschichtung eines Deckglases mit aufgereinigtem eGFP-Protein (erhalten von Stefanie Jäger, Konzentration der Beschichtungslösung 100 nM in PBS) und aufgenommen unter identischen Bedingungen (rechts). (B) Bestimmung der Gag-Prozessierung und Vpr-Inkorporation von aufgereinigten Viruspartikeln mittels Westernblotanalyse. Oberhalb des Westernblots ist das molare Verhältnis von pmRFP1.Vpr zu den proviralen Plasmiden (pCHIV und pCHIV.eGFP im äquimolaren Verhältnis) angegeben, die zur Transfektion der 293T-Zellen genutzt wurden (links). Zur Analyse der Partikelstabilität wurden unbehandelte bzw. mit 0,1 % Triton X-100 behandelte Viruspartikel für 15 min auf ein Deckglas gebunden, mit PBS gewaschen und die Partikelanzahl in mindestens 30 Sichtfeldern ausgewertet. Die Zahl der Viruspartikel in der jeweiligen Kontrolle ohne Tritonbehandlung wurde auf 100 % gesetzt. (C) Fluoreszenzmarkierte Viruspartikel wurden durch Transfektion von 293T-Zellen mit pCHIV und pCHIV.eGFP im molaren Verhältnis 1:1 hergestellt. Während der Virusproduktion war der Proteaseinhibitor Lopinavir (LPV) im Zellkulturmedium zugegen (finale Konzentration von DMSO 0,5 % im Zellkulturmedium). Analyse der Gag-Prozessierung mittels Westernblot (rechts) und Bestimmung der Partikelstabilität in Abhängigkeit von der eingesetzten Inhibitorkonzentration (rechts) analog zu (B).

Die verbleibende Zahl von Partikeln auf dem Deckglas nach Tritonbehandlung war umgekehrt proportional zum Prozessierungsgrad des Gag-Polyproteins (Abbildung 31). Bei vollständig prozessierten Partikeln, die nicht mit Lopinavir behandelt worden waren, waren 5 % der Signale stabil und bei der höchsten Inhibitorkonzentration von 2 μ M (vollständige

Inhibierung der Prozessierung) stieg dieser Wert auf 30 % an (Abbildung 31). Der Effekt steigender mRFP1.Vpr-Mengen im Virion auf die Prozessierung des Gag-Polyproteins wurde bereits in 8.5.1 untersucht. Es wurde zusätzlich der Effekt einer Tritonbehandlung auf zweifarbig fluoreszenzmarkierte Viruspartikel untersucht. Hierzu wurde das Plasmid pmRFP1.Vpr in der Transfektion zutitriert. Im Westernblot mit gegen MA gerichteten Antikörpern wurde mit steigender mRFP1.Vpr-Inkorporation eine geringere Spaltung des Gag-Polyproteins nachgewiesen. Die Signalstabilität in der mikroskopischen Untersuchung stieg von ca. 5 % bei Partikeln ohne mRFP1.Vpr bis auf 50 % bei der höchsten untersuchten mRFP1.Vpr-Menge im Viruspartikel an (Abbildung 31). Zusätzlich wurden die Veränderungen bei den ausschließlich rot-fluoreszierenden Signalen analysiert, um festzustellen, ob die Zahl einfach rot-fluoreszierender Signale durch die Tritonbehandlung wie erwartet zunahm. Tatsächlich wurde in einem Fall eine Steigerung der nur roten Signale auf 171 % verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe detektiert. In den anderen vier analysierten Proben lag die Zahl der stabilen roten Signale zwischen 66 und 103 % (Daten nicht gezeigt).

8.12 Fluoreszenzmarkierung der Lipidmembran der Viruspartikel

Da die Zahl der einfach rot-markierten Partikel weder im *in vitro* Assay (8.11) noch bei Experimenten mit VSV-G pseudotypierten Partikeln (8.8.3) deutlich angestiegen war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass nicht bei jedem Fusionereignis zeitgleich eine Farbtrennung stattfand. Daher wurden Fluoreszenzmarkierungsmethoden der Lipidmembran des Viruspartikels diskutiert.

Grundsätzlich standen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: (a) Die Markierung des Virus mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper, der an das virale Hüllprotein band. (b) Die unspezifische Markierung von Proteinen auf der Oberfläche des Viruspartikels mit fluorophorgekoppelten NHS-Estern. (c) Die Inkorporation eines lipophilen, fluoreszenzmarkierten Moleküls in die Virusmembran. (d) Die Fluoreszenzmarkierung der Plasmamembran durch den metabolischen Einbau von fluoreszenzmarkierten Lipiden, die dann auf das Virus übergingen und dieses so fluoreszenzmarkiert wurden. (e) Die Markierung der Plasmamembran der Produzentenzelle mit fluoreszierenden Proteinen, die einen Membrananker besaßen, und somit bei der Knospung in die Lipidmembran der Viruspartikel integriert wurden. (f) Die Inkorporation fluoreszenzmarkierbarer Proteine über einen Membrananker in die Plasmamembran der Produzentenzelle, welche bei Knospung des Viruspartikels in die Lipidmembran integriert wurden. Nach der Aufreinigung der

Viruspartikel könnten diese membranständigen Proteine mit einem fluoreszierenden Substrat markiert werden.

Die Markierungsmethode (a) wurde aufgrund einer wahrscheinlichen Reduktion der Infektiosität nicht verfolgt. Die Methode (b) markierte in initialen Experimenten auch nicht abgetrennte Vesikel in der Viruspräparation, so dass weitere, die Eintrittskompetenz reduzierende Aufreinigungsschritte notwendig geworden wären. Die Methoden (c) und (d) wurden von Peter Koch unter meiner Mitwirkung begonnen. Die Markierung von aufgereinigten Viruspartikel mit Bodipy-fluoreszenzmarkiertem GM1 zeigte eine gute Markierung von mit MA.mCherry markierten Partikeln (Abbildung 32). Hierzu wurden MA.mCherry-fluoreszenzmarkierte Viruspartikel über ein 20 %iges Sucrosekissen aufgereinigt und nachfolgend in PBS verdünnt und mit 5 μ M Bodipy-GM1 komplexiert mit BSA in Ethanol (finale Ethanolkonzentration 1 %) versetzt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min. Die Virussuspension wurde erneut über ein 20 %iges Sucrosekissen aufgereinigt, um freies Gangliosid zu entfernen. Die Stabilität der GM1-Bindung an die Viruspartikel und der Grad eines unspezifischen Übertrags Bodipy-GM1 auf die Plasmamembran der Zielzelle ist Gegenstand laufender Experimente.

Die Markierung der zellulären Plasmamembran mittels fluoreszierender Proteine, die einen Membrananker besitzen, wurde von Maria Anders und Barbara Müller getestet (Ansatz (e)). Hierzu wurde ein Plasmid (Src-NLS-GFP) kodierend für ein Protein bestehend aus den ersten Aminosäuren des Membranankers der Src-Kinase, einem Kernlokalisationsignal (NLS), welches eine basische Domäne darstellte, und dem Fluorophor eGFP eingesetzt. Der Src-NLS-Anker rekrutiert das Fluorophor an die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran. Wie bereits in 8.10 ausgeführt, war es mit diesem Fusionsprotein möglich, die Virusmembran zu markieren. Die Fluoreszenzintensität war jedoch für die Detektion der Viruspartikel in lebenden Zellen mit hoher Zeitauflösung zu gering. Alternativ wurde die Markierung mit einem GPI-eGFP-Fusionsproteine durchgeführt, wobei der GPI-Anker (Übersicht in (Ikezawa, 2002)) das Fluorophor an die extrazelluläre Seite der Plasmamembran rekrutiert. Die geringe Fluoreszenzintensität war ebenfalls für die Untersuchung des Bewegungsverhaltens der Viruspartikel in Lebendzelleexperimenten nicht geeignet (Daten nicht gezeigt). Da hiermit aber grundsätzlich gezeigt war, dass mit einem GPI-Anker gekoppelte Proteine auf die Außenseite des Viruspartikels gebracht werden konnten, war dies der Ausgangspunkt für die folgenden Experimente.

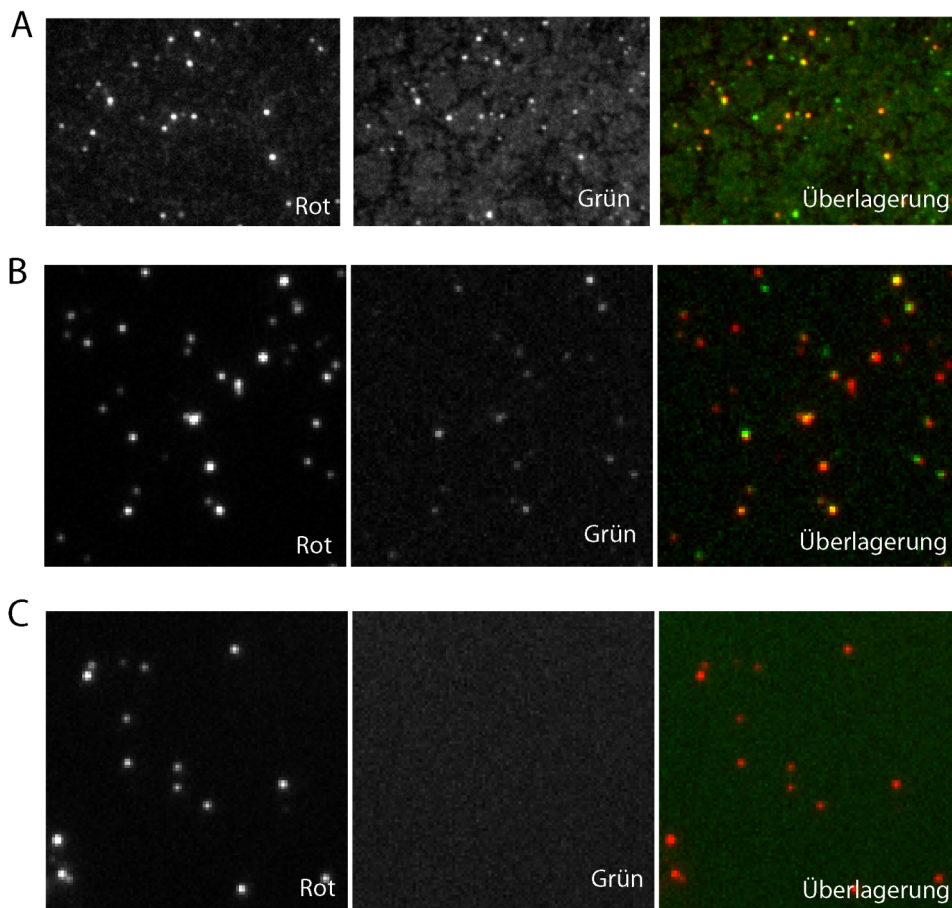


Abbildung 32: Fluoreszenzmarkierungen der viralen Lipidmembran. (A) Viruspartikel, die mit MA.mCherry (Rot) fluoreszenzmarkiert waren, wurden nach ihrer Aufreinigung mit 5 μM GM1-Bodipy für 30 min in PBS inkubiert (Ethanolkonzentration 0,5 % in der Färbelösung) und freier Farbstoff durch erneute Ultrazentrifugation durch ein 20 %iges Sucrosekissen abgetrennt. Die Viruspartikel wurden an ein Deckglas gebunden und die Fluoreszenz mit 100 ms Belichtungszeit detektiert (GM1-Bodipy: Grün, MA.mCherry: Rot; Färbung durchgeführt von Peter Koch). (B) Env(-)-Viruspartikel, die mit MA.mCherry (Rot) fluoreszenzmarkiert waren, wurden durch eine Kotransfektion von 293T-Zellen mit proviralen Plasmiden und pGPI-AGT hergestellt. Nach Aufreinigung und der Färbereaktion mit 50 nM BG-Fluorescein in PBS (DMSO-Konzentration in der Färbelösung 1 %). Die Viruspartikel wurden an ein Deckglas gebunden und die Fluoreszenz mit 250 ms Belichtungszeit aufgenommen. (C) Viruspartikel wurden wie in (B) hergestellt und gefärbt, mit der Ausnahme, dass kein pGPI-AGT in den Produzentenzellen kotransfiziert wurde.

Da es mit dem GPI-Anker grundsätzlich möglich war, ein Protein auf die Außenseite des Virus zu bringen, sollte nun gemäß Ansatz (f) ein selektiv fluoreszenzmarkierbares Protein benutzt werden. In den letzten Jahren wurden eine Reihe modifizierter Enzyme kloniert, die in der Lage sind ihr Substrat nur noch kovalent zu binden, statt es durch eine chemische Reaktion umzusetzen und das Produkt freizusetzen. Die Wahl fiel auf den AGT-Tag, bei dem es sich um eine modifizierte O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) handelt (Keppler *et al.*, 2006; Keppler *et al.*, 2004).

Grundsätzlich stand eine große Bandbreite an Fluorophoren zur Verfügung, die die Detektion der Fluoreszenzemission auch im infraroten Bereich erlauben. Erste Experimente wurden mit

dem Fluorophor Fluorescein durchgeführt, das ein eGFP ähnliches Anregungs- und Emissionsspektrum aufweist.

293T-Zellen wurden mit den proviralen Plasmiden und einem Plasmid kodierend für ein AGT-GPI-Fusionsprotein (Covalys, Luzern) im Verhältnis 1:1:1 (pCHIV:pCHIV.mCherry:pGPI-AGT) transfiziert und die Partikel 44 h nach Transfektion mittels Ultrazentrifugation durch ein 20 %iges Sucrosekissen aufgereingt. Die Markierung der Viruspartikel (500 ng p24) erfolgte in PBS mit 50 nM BG-Fluorescein in DMSO (finale DMSO-Konzentration 1 %) für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde freier Farbstoff durch erneute Ultrazentrifugation durch ein 20 %iges Sucrosekissen abgetrennt und die Viruspartikel fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die zweifarbig markierten Viruspartikel konnten detektiert werden. Es wurden sowohl HIV-Hüllprotein-tragende als auch nach gleichem Protokoll produzierte pcHIV Δ ENV-basierende Partikel ohne Hüllprotein detailliert ausgewertet (Abbildung 32). Dabei wurde eine maximale Doppelfärbungsrate von ungefähr 40 % bei Δ ENV Partikeln festgestellt. Die Signalstärke des Fluorescein war für Lebendzelleexperimente zu schwach und das Signal blich schnell aus. In zukünftigen Experimenten könnte ein bleichstabileres Fluorophor mit höherer Quantenausbeute eingesetzt werden.

8.13 Tracking Software

Bei den beschriebenen Experimenten zur Virus-Zell-Interaktion (8.7) entstanden große Mengen an Bilddaten, deren Analyse die Kenntnis der Fluoreszenzintensität für die beiden Markerfluorophoren eGFP und mRFP1 bzw. mCherry voraussetzte. Weiterhin musste die Bewegungscharakteristik (Diffusion, Motorprotein-getriebener Transport etc.) bestimmt werden, da dies Auskunft über die Umgebung des Viruspartikels und mögliche Interaktionspartner gab.

Die rein visuelle Analyse der Fluoreszenzintensitäten wurde durch die Tatsache erschwert, dass die Aufnahme der Bilder in den einzelnen Kanälen mit 4.096 Graustufen erfolgte. Für das manuelle Auffinden von Farbtrennungseignissen war eine Überlagerung der beiden Kanäle notwendig. Hierzu war aus technischen Gründen eine Reduktion von 4.096 auf 256 Graustufen erforderlich. Mit diesem reduzierten Dynamikumfang wäre es möglich, ein Fusionsereignis, das zu einer quantitativen Trennung der Fluoreszenzmarker führte, manuell aufzufinden, da ein Signal vollständig verschwinden würde. Da aber das detektierte Farbtrennungseignis gezeigt hatte (8.8.5), dass eventuell keine vollständige Farbtrennung zu

erwarten war, durfte die Information über das relative Fluoreszenzverhältnis von eGFP zu mRFP1 bzw. mCherry durch die Bearbeitung der Bilder nicht verändert werden.

Grundsätzlich würde eine lineare Kompression der Graustufen von 4.096 auf 256 das Fluoreszenzverhältnis erhalten. In der Praxis ergaben sich jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da durch die deutliche Reduktion des Grauwertumfangs graduelle Helligkeitsunterschiede verschwanden und die Abstufung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisses gröber wurden. Eine nicht-lineare Anpassung (z.B. über die Veränderung des Gamma-Werts) konnte das Ergebnis subjektiv beeinflussen und war daher nicht anzuwenden.

Folglich war eine objektive Auswertung unter Berücksichtigung der unveränderten Rohdaten nötig. Hierzu müsste in einer zeitaufwendigen Prozedur jeder Partikel über die Zeit manuell erfasst und die Trajektorie mit den dazugehörigen Helligkeitsinformationen aufgezeichnet werden. Durch eine automatische Erstellung der Trajektorien und eine ebenso automatisierte Auswertung derselben, wäre es grundsätzlich möglich, große Datensätze detailliert und schnell auszuwerten.

In Kooperation mit der Gruppe von Prof. Karl Rohr (Biomedical Computer Vision Gruppe, IPMB, Abteilung Bioinformatik & Funktionelle Genomik, Universität Heidelberg) wurde eine automatische Tracking-Software entwickelt, die die Analyse des Intensitätsverhältnisses der beiden Fluoreszenzmarker und des Bewegungsverhaltens des Viruspartikels ermöglichte. Dabei lag der Schwerpunkt zuerst auf der zuverlässigen Ermittlung der Trajektorien, die die zeitliche Veränderung der Position eines Partikels beschrieben. Mein Beitrag bestand in der Vermittlung der biologisch relevanten Informationen, Bereitstellung von grundsätzlichen Informationen zur Partikelbewegung, kritischer Diskussion der verwendeten Algorithmen und Validierung der verwendeten Algorithmen durch Vergleich mit manuell ermittelten Trajektorien (*ground-truth*).

8.13.1 Arbeitsprinzip der Tracking-Software

Die in den Virus-Zell-Interaktionsexperimenten aufgezeichneten Bildsequenzen wiesen ein geringes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis auf, bedingt durch die hohe Zeitauflösung und die schwache Signalintensität der Viruspartikel. Dies erschwerte das Auffinden von Viruspartikeln, da die Helligkeit der Signale von den Viruspartikeln und vom Rauschen teilweise überlappten. Daher konnte eine Separation zwischen Hintergrund und Viruspartikel nicht durch Einführung eines definierten Schwellenwerts vorgenommen werden. Folglich musste eine differenziertere Analyse der Bildsequenzen durchgeführt werden.

Die entwickelte Software unterteilte den Tracking-Prozess in zwei Schritte: (I) Auffinden der Viruspartikel in jedem Bild und (II) Verbinden der einzelnen Positionen zu einer Trajektorie, die die zeitliche Veränderung der Position eines Partikels beschrieb.

Im ersten Schritt wurde das Rauschen durch einen Algorithmus im Bild reduziert, so dass nun über einen Schwellwert (potentielle) Virussignale identifiziert werden konnten. Über die Definition einer Reihe von Parametern wie Ausdehnung, minimale Helligkeit etc. war es der Software möglich zwischen „echten“ Partikelsignalen und Störungen zu unterscheiden.

Im zweiten Schritt wurde aus den einzelnen Positionen der Viruspartikel eine Trajektorie gebildet, wobei bei mehreren Partikeln im Sichtfeld die Zuordnung der einzelnen Positionen zu jeweils einem bestimmten Viruspartikel notwendig war. Hierzu kamen verschiedene Algorithmen zur Anwendung, die grundsätzlich eine „korrekte“ Zuordnung gewährleisten sollten.

Bei der Entwicklung wurde ausgehend von veröffentlichten Algorithmen neue Verfahren entworfen und auf unsere Bedürfnisse angepasst. Es stellte sich schnell heraus, dass für den komplexen Fall der Virus-Zell-Interaktion erhebliche Entwicklungsarbeit zu leisten war, da die Komplexität der Ereignisse an der Zellmembran und im Zytosol mit den bisher veröffentlichten Algorithmen nicht zu unserer Zufriedenheit zu bewältigen war. Die von uns untersuchten Viruspartikel zeigten nicht nur verschiedene Bewegungsmuster (freie Diffusion, anomale Diffusion, Diffusion mit Drift etc.), sondern wechselten oft ihren Bewegungsmodus innerhalb weniger Sekunden, wie an dem detektierten Farbtrennungseignis zu sehen. Wenn sich die Wege der Viruspartikel kreuzten, erschwerte dies die korrekte Verfolgung der Viruspartikel. Waren die Signale zweier Viruspartikel nicht mehr räumlich aufzulösen, z.B. durch Fusion von mit Viruspartikeln beladenden Endosomen, so war die gezielte Terminierung einer Trajektorie erforderlich. Bewegten sich Partikel aus dem Objektivfokus heraus- oder in diesen hinein, so erforderte dies die Initialisierung neuer oder die Terminierung bestehender Trajektorien.

8.13.2 Verwendete Algorithmen und Leistungsüberprüfung der Software

Die entwickelte Tracking-Software ermöglichte die Wahl von zwei Partikeldetektionsalgorithmen, die wiederum mit drei verschiedenen die einzelnen Signale zu einer Trajektorie verbindenden Verknüpfungsalgorithmen (*Motion correspondence* oder *Filter*-Algorithmen) kombiniert werden konnten. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Algorithmen oder der Vor- und Nachteile ihrer möglichen Kombinationen würde den Rahmen dieser Arbeit übersteigen und kann in (Godinez *et al.*, 2007a; Godinez *et al.*,

2007b; Godinez *et al.*, 2008) nachgelesen werden. Jeder Partikeldetektionsalgorithmus kann mit jedem Tracking-Algorithmus kombiniert werden.

8.13.2.1 Partikeldetektionsalgorithmen

A) Um die Position der Partikel zu detektieren, war es aufgrund des ungünstigen Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses nicht möglich, die Signale allein durch Definition eines Schwellenwertes zuverlässig vom Hintergrund zu separieren. Durch den *Spot Enhancing Filter*-Ansatz, einem Filter, der die Gaußförmigen Signale der Viruspartikel gegenüber dem Hintergrund verstärkt, wurde das Signal-zu-Rauschen-Verhältniss verbessert und dann mittels eines Schwellenwertes potentielle Viruspartikel definiert. Als Helligkeit eines Viruspartikels wurde die mittlere Helligkeit des ausgewählten Bereichs definiert. Eine Abschätzung der Hintergrundhelligkeit war über die Analyse einer ringförmigen Region um den Viruspartikel möglich.

B) Der *2D-Gauss-Fitting* Algorithmus verfolgte einen anderen Ansatz. Zuerst wurden nach Glättung des Bildes mittels eines benutzerdefinierten Schwellenwertes (in der Regel die dreifache Standardabweichung der Rauschsignale), lokale Maxima als potentiell interessante Signale ausgewählt. Diese lokalen Maxima enthielten allerdings außer Signalen von Viruspartikeln auch Rauschen. Im nächsten Schritt wurde an alle diese Signale eine Anpassung mit einer 2D-Gaußfunktion durchgeführt, da die Signalverbreiterung eines punktförmigen Viruspartikels annähernd durch eine Gaußsche Verteilung beschrieben werden konnte. Schlug diese fehl, so wurde das Signal als irrelevant verworfen. Allerdings wurde festgestellt, dass es auch zur Anpassung einer Gaußfunktion an den zellulären Hintergrund oder besonders helle Störsignale kommen konnte. Somit war die Einführung eines weiteren Parameters notwendig, um eine zuverlässige Viruspartikeldetektion zu gewährleisten. Die Definition eines minimalen Signalkontrasts erlaubte diese Unterscheidung.

Die Anpassung einer Gaußfunktion hatte gegenüber dem *Spot Enhancing Filter* eine Reihe von Vorteilen. So enthielt die angepasste Gaußfunktion genauere Informationen zur Bestimmung der Signalhelligkeit bei gleichzeitiger Bestimmung des lokalen Hintergrunds, da die Anpassung unabhängig von einem Schwellenwert abläuft und auch Informationen über Form des Signals, wie Ausdehnung und die Elliptizität, ermittelt wurden. Weiterhin war es möglich, die Partikelposition auch jenseits des physikalischen Diffraktionslimits des verwendeten Objektivs zu bestimmen.

8.13.2.2 Bestimmung von Trajektorien mittels eines deterministischen Ansatzes

Die Viruspositionen konnten mit einem erweiterten Globalen Nächsten-Nachbar Algorithmus (*Global Nearest Neighbor*, GNN) zu einer Trajektorie verbunden werden. Hierbei wurde grundsätzlich das dem Partikel im folgenden Bild räumlich nächstgelegene Signal berücksichtigt. Dieser Algorithmus erlaubte auch, dass ein Signal für ein oder mehrere konsekutive Bilder nicht detektiert werden konnte (z.B. weil ein anderer Partikel sich in der Nähe befand) ohne die Trajektorie abbrechen zu lassen. Um dieses zu gewährleisten wurde nicht einfach der nächste Nachbar für einen Viruspartikel gewählt, sondern die möglichen Trajektorien für mehrere Bilder im Voraus ermittelt und die Lösung mit der über alle Trajektorien minimalen Verschiebung ermittelt, d.h. die Summe der Länge aller Abstandsvektoren zwischen den Partikelpositionen zu zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten wurde für alle möglichen Fortsetzungen der Trajektorien berechnet und die Lösung mit dem kleinsten Wert berücksichtigt.

8.13.2.3 Bestimmung von Trajektorien mittels eines Wahrscheinlichkeitsansatzes

Um die Trackinggenauigkeit weiter zu steigern, wurden Alternativen zu einer deterministischen Bestimmung der Trajektorien untersucht. Bei einem Wahrscheinlichkeitsansatz wird versucht, mögliche Positionen des Viruspartikels im darauf folgenden Bild vorherzusagen. Diese Vorhersage wird mit den im Bild tatsächlich gefundenen Signalen abgeglichen und die Trajektorie aufgebaut.

Der *Kalman-Filter* ist ein auf dem Wahrscheinlichkeitsansatz beruhender Trackingalgorithmus, der auf mit linearen Gleichungen beschreibbare Systeme beschränkt ist. Partikelfilter (*Particle Filter*) erlauben hingegen die Anwendung komplexerer Modelle der Partikelbewegung. Im Fall des Virustrackings wurden drei verschiedene Bewegungsmodelle zugrunde gelegt: freie Diffusion, Bewegung mit konstanter Geschwindigkeit oder konstanter Beschleunigung.

Die Implementierung erfolgte als MPF (*Mixture of Particle Filters*) und als IPF (*Independent Particle Filters*). Der IPF stellte eine deutliche Weiterentwicklung des MPF dar, da er im Gegensatz zum MPF in der Lage war, neu in der Bildsequenz erscheinende Partikel zu initialisieren. Zusätzlich konnte der IPF auch Objekte in enger räumlicher Nähe verfolgen sowie „verschmelzende“ Trajektorien korrekt erkennen. Der Algorithmus wurde derart modifiziert, dass bei zwischenzeitlich fehlgeschlagener Detektion eines Viruspartikels in einem (oder mehreren aufeinander folgenden) Bild(ern) dennoch eine korrekte Trajektorie ermittelt wurde.

8.13.2.4 Experimentelle Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Tracking-Algorithmen

In der experimentellen Überprüfung der Algorithmen wurden sowohl synthetische Filmsequenzen, bei denen Partikelsignale und Rauschen im Computer berechnet wurden, als auch aus Lebendzellexperimenten stammenden Sequenzen verwendet. Letztere wurden von mir zuerst manuell ausgewertet, um eine Bezugsinformation (*ground truth*) zu haben. Die Trackinggenauigkeit bei Verwendung von Bildsequenzen aus Lebendzellexperimenten wurde als Quotient aus der Zahl der korrekt ermittelten Trajektorien zur Gesamtzahl aller manuell ermittelten Trajektorien ermittelt. Der GNN erreichte eine Trackinggenauigkeit von ca. 70-77 % in Abhängigkeit vom verwendeten Partikeldetektionsalgorithmus. Bei Verwendung des Kalman Filters wurden ca. 78 % der Trajektorien korrekt bestimmt. Die Trackinggenauigkeit des MPF lag zwischen 51-56 %, da dieser Algorithmus nur Trajektorien im ersten Bild einer Sequenz initialisieren konnte. Die beste Leistung wies der IPF mit einer Trackinggenauigkeit von 79-81 % auf.

Da der MPF keine Initialisierung von neuen Trajektorien während einer Bildsequenz ermöglichte und weder der IPF noch der vollständige Kalman-Filter zu Beginn der systematischen, automatisierten Auswertung der Filmsequenzen entwickelt bzw. implementiert waren, wurde für die Auswertungen im Rahmen dieser Arbeit der deterministische Algorithmus (GNN) verwendet, der auch weniger rechenintensiv war (Abbildung 33).

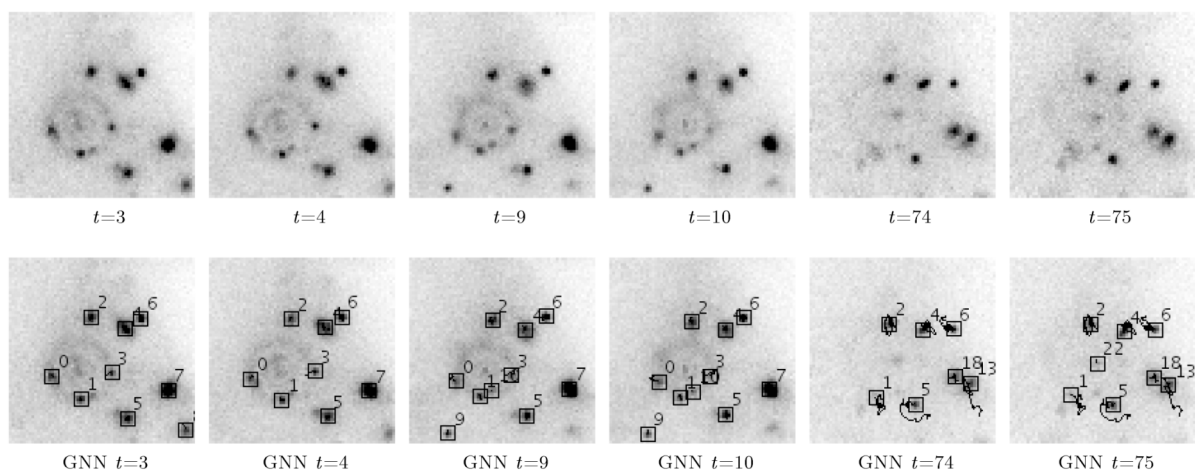


Abbildung 33: Beispielsequenz aus einem Lebendzellexperiment: Bilder der Originalsequenz in der oberen Reihe und darunter die Trackingresultate des Globalen Nächsten-Nachbar Algorithmus (GNN). Zur Partikeldetektion wurde die 2D-Gauss-Anpassung verwendet. (Abbildung zur Verfügung gestellt von William Godinez.)

Die weiterführende Analyse des Bewegungsverhaltens der Partikel und die Analyse des Fluoreszenzverhältnisses erfolgten noch manuell. Diese beiden Aufgaben sind derzeit nicht automatisiert und erfordern noch die Bewertung durch den Experimentator. Die Software stellte hierfür alle Rohdaten (Trajektorie, MSD-Plot, Fluoreszenzintensitäten und deren Verhältnis) in graphischer Form zu Verfügung, was die Auswertung deutlich erleichterte (Abbildung 34). In der Zukunft sollen auch diese Schritte automatisiert werden.

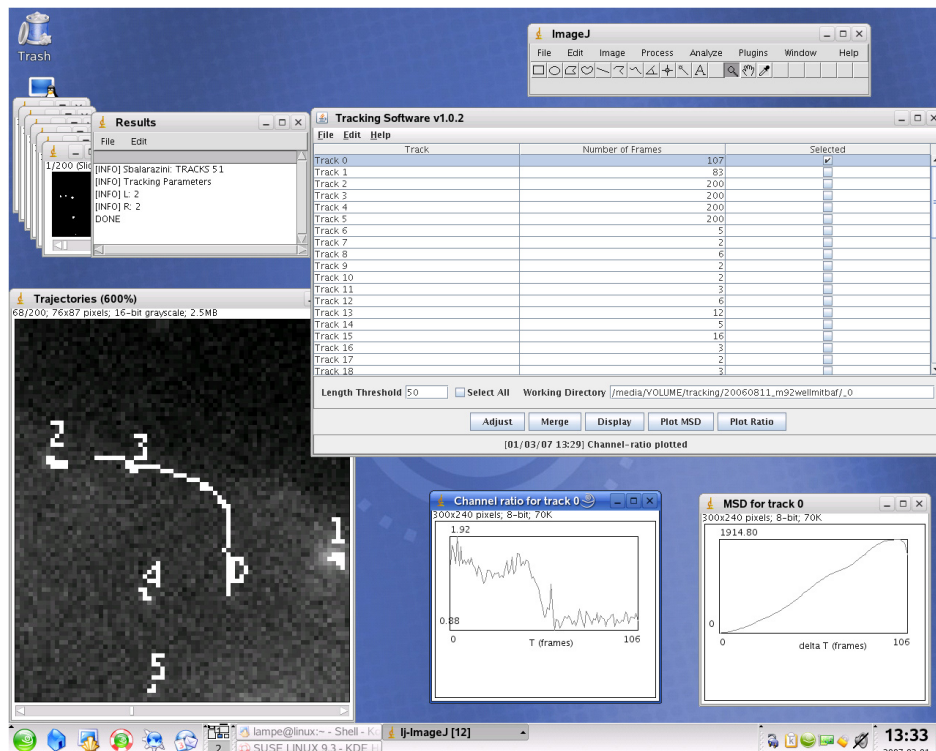


Abbildung 34: Arbeitsoberfläche der Software. Die Tracking-Software steht auch als *Plugin* in *ImageJ* zur Verfügung. Abgebildet ist die Oberfläche am Ende eines Trackingvorgangs. Die einzelnen Trajektorien sind in Listenform aufgeführt (zentrales Fenster). Die Bildsequenz mit überlagerten Trajektorien kann angezeigt werden (Fenster: *Trajectories*) ebenso wie das Intensitätsverhältnis (Fenster: *Channel ratio for track 0*) und die Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats (Fenster: *MSD for track 0*).

8.14 Initiale Experimente zu einem *in vitro* Fusionssystem auf Basis von *Giant Unilamellar Vesicles*

Die Charakteristik eines Fusionsereignisses an der Plasmamembran einer Zelle ist nicht nur vom Virus oder der Konzentration der Eintrittsrezeptoren CD4 und CXCR4 bzw. CCR5 abhängig, sondern auch von einer Reihe weiterer oft schwer definierbarer Faktoren. Als Beispiel für einen zusätzlichen z.T. unspezifischen Faktor kann die in dieser Arbeit beschriebene über Heparansulfat vermittelte Virusbindung gelten. Daher wäre es vorteilhaft, ein System zur Detektion der Virusfusion mit definierten „Zell-Analoga“ zu besitzen. Es

wurde bereits gezeigt, dass VSV mit Phosphatidylserin-haltigen Liposomen fusionieren kann (Carneiro *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2006a; Carneiro *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2006b; Puri *et al.*, 1992). Die Fusion von VSV mit Vero-Zellen konnte durch Dequenching des Fluoreszenzfarbstoffs R18, der in einer hohen Konzentration in die Lipidmembran des Virions inkorporiert wurde, gezeigt werden (Blumenthal *et al.*, 1987; Puri *et al.*, 1992; Puri *et al.*, 1988). Die Fusion der Viren mit kleinen Liposomen, sog. *small unilamellar vesicles* (SUV) mit einem Durchmesser von bis zu 50 nm, konnte durch Erniedrigung des pH ausgelöst und die ansteigende R18 Fluoreszenz durch Dequenching gemessen werden (Puri *et al.*, 1992). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass es grundsätzlich möglich ist, die HIV-Rezeptoren CD4 und CCR5 in Liposomen zu rekonstituieren (Devesa *et al.*, 2002), so dass auch eine Fusion von HIV mit rekonstituierten Liposomen möglich sein sollte.

Des Weiteren erlaubt ein System auf Basis von Liposomen die gezielte Änderung der Lipidkomposition und könnte daher Aufschluss über die Abhängigkeit der Virusfusion von einer bestimmten Lipidzusammensetzung oder der Fluidität der Membran geben. Anstelle von SUVs mit ihrer hohen Membrankrümmung wäre es günstiger, *giant unilamellar vesicles* (GUVs) zu verwenden, die einen Durchmesser von 10-100 µm und eine dementsprechend geringere Membrankrümmung aufweisen. Aufgrund ihrer Größe und deutlich geringeren Membrankrümmung sollten GUVs die Situation an der Zellmembran besser wiedergeben als SUVs. Die Größe dieser Vesikel erlaubt weiterhin eine lichtmikroskopische Beobachtung und macht diese daher für Techniken wie die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) zugänglich.

Zur Etablierung eines Fusionssystems wurden VSV-G pseudotypisierte HI-Viren verwendet, da diese Phosphatidylserin-haltige Lipide als Fusionsrezeptor verwenden und diese Lipide einfach in die Liposomen zu integrieren sind. Die Rekonstitution der HIV-Fusionsrezeptoren erfordert hingegen einen deutlich größeren Arbeitsaufwand.

Die Fusion von Viren mit GUVs sollte subvirale Partikel in das GUV-Lumen bringen. Diese könnten dann mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) detektiert werden (Abbildung 35). Da FCS auch die Detektion von Partikeln in nanomolaren Konzentration erlaubte, wäre auch bei niedriger Fusionseffizienz ein Nachweis der Fusion möglich. Da diese Methode für große Komplexe wie Viruspartikel oder subvirale Partikel nicht etabliert war, wurden parallel Ensemblemessungen mit R18 markierten VSV-G pseudotypisierten HI-Viren im Fluoreszenzspektrometer durchgeführt.

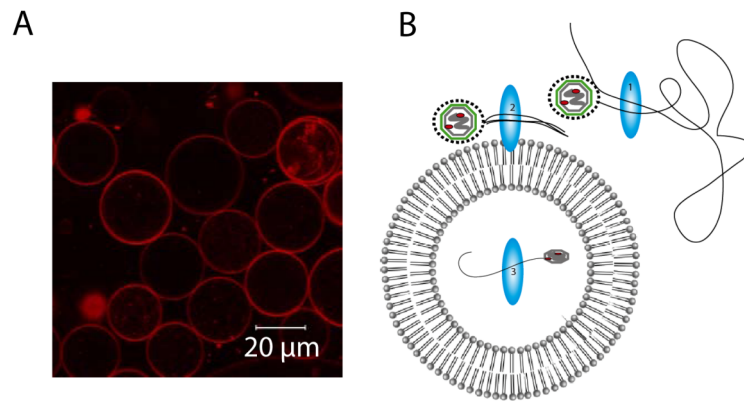


Abbildung 35: Giant Unilamellar Vesicles und Fluoreszenzkorrelationspektroskopie. (A) *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs) aufgenommen nach dem Schwellvorgang auf ITO-Deckgläsern mit einem Zeiss LSM 510-Mikroskop. Die Membran der GUVs wurde durch Inkorporation von 0,1 % DiD fluoreszenzmarkiert. (B) Schematische Darstellungen der Messungen: 1) Detektion von Viruspartikel in Suspension und Bestimmung ihrer Größe. 2) Messung von an die Lipidmembran gebundenen GUVs. 3) Messung von subviralen Partikel im Lumen des GUV nach Fusion der Viruspartikel mit der GUV-Membran. Die blauen Ellipsen deuten die Positionierung des Konfokalkolumens für die FCS-Messung an.

8.14.1 Eignung von FCS zur Detektion von Viruspartikeln

FCS wurde bisher hauptsächlich zur Untersuchung der Eigenschaften von Proteinen und Proteinkomplexen in Lösung eingesetzt. Mit FCS kann der Diffusionskoeffizient (und damit der hydrodynamische Radius) und die Konzentration eines Proteins oder Proteinkomplexes in der untersuchten Lösung bestimmt werden. Basis hierfür ist die durchschnittliche Aufenthaltszeit des fluoreszenzmarkierten Proteins im Detektionsvolumen. Das Detektionsvolumen, auch als Konfokalkolumen bezeichnet, hat die ungefähren Abmessungen von 200 nm (x,y) bzw. 1 µm (z). Ein Viruspartikel mit einem mittleren Durchmesser von 145 nm erreicht somit die gleiche Größenordnung wie die Abmessungen des Konfokalkolumens. Da die Berechnungen zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten und der Konzentration von näherungsweise punktförmigen Proteinen oder Komplexen (akzeptabel bis 10 nm im Durchmesser) ausgehen, musste zuerst experimentell überprüft werden, ob diese Methode korrekte Ergebnisse liefert. Dazu wurden FCS-Messungen in Zusammenarbeit mit Heiko Keller in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petra Schwille (TU Dresden) durchgeführt.

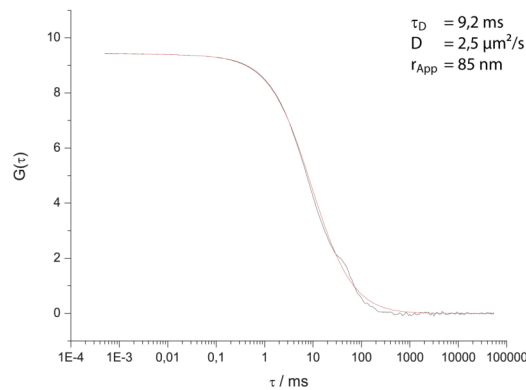


Abbildung 36: Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Viruspartikeln. VSV-G pseudotypisierte Viruspartikel wurden in Puffer MT150 mittels FCS analysiert. Die Autokorrelationsfunktion ist dargestellt (schwarze Linie). Die Anpassung der Daten erfolgte mit einem Modell für eine homogene Partikelpopulation (rote Linie). Daraus ergibt sich eine Diffusionszeit τ_D von 9,2 ms, ein Diffusionskoeffizient D von $2,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und ein hydrodynamischer Radius r_{App} von 85 nm.

Viruspartikel wurden in Puffer MT150 verdünnt und mittels FCS die Fluoreszenzschwankungen über 5 min aufgezeichnet. Bereiche, in denen die Intensität offensichtlich weit über die normalen Schwankungen hinausging, wurden verworfen und von den übrigen Daten die Autokorrelationsfunktion bestimmt (Abbildung 36). Die Anpassung der ermittelten Autokorrelationsfunktion mit einer Funktion, die das Vorhandensein einer Spezies voraussetzt, ergab eine Diffusionszeit τ_D von 9,2 ms, einen Diffusionskoeffizienten von $2,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und nach Stokes-Einstein einen hydrodynamischen Radius von ca. 85 nm. Dies war in guter Übereinstimmung mit dem mittels Weitfeldmikroskopie bestimmten hydrodynamischen Radius von 86 nm. Wie in Abbildung 36 ersichtlich, war die Anpassung der theoretischen Funktion basierend auf der Annahme einer Spezies in Lösung nicht optimal, da eine Schulter mit einem τ_D von ca. 50 ms in den Messdaten auftrat. Allerdings konnte keine zuverlässigere Anpassung unter der Annahme zweier Spezies erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich handelte es sich hierbei um verschieden große Virusaggregate, wie sie auch schon bei Weitfeldmessungen beobachtet wurden. Anzumerken ist, dass die verwendeten Formeln von einer gleichmäßigen Verteilung der Fluorophore an den beobachteten Spezies und von Spezies deutlich kleiner als das Konfokalvolumen ausgehen. Die Viruspartikel waren jedoch weder gleichmäßig fluoreszenzmarkiert noch deutlich kleiner als das Konfokalvolumen. Allerdings war es trotzdem möglich, sinnvolle Informationen über die Partikelgröße (siehe oben) zu ermitteln, was die weitere Anwendbarkeit dieses Ansatzes für Messungen mit GUVs ermöglichte.

8.14.2 Phosphatidylserin-abhängige Virusbindung an GUVs

Die Bindung von VSV-G an eine Zelle bzw. ein Liposom kann über Phosphatidylserin erfolgen (Carneiro *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2006a; Carneiro *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2006b; Puri *et al.*, 1992; Schlegel *et al.*, 1983). Allerdings wurde in zellbasierten System gefunden, dass vermutlich ein anderer, noch nicht identifizierter Rezeptor für die initiale Virusbindung verantwortlich sein könnte (Coil und Miller, 2004). Daher wurde im Folgenden die Frage adressiert, ob die Virusbindung von VSV-G pseudotypisiertem HIV durch Phosphatidylserin vermittelt ist. Hierzu wurden GUVs mit verschiedenen Lipidkompositionen mittels Elektroformation in geschlossenen Kammern bei niedriger Ionenstärke (1/20 MT) geschwollen und danach der Puffer in der Kammer durch den Assaypuffer (MT150) ausgetauscht. Die mit MA-eGFP markierten Viren wurden in die Kammer eingespült (ca. 80 ng p24 pro Kammer) und für 30 min mit den GUVs inkubiert. Anschließend wurde mit drei Kammervolumen (ca. 1 ml Puffer) gespült, um ungebundene Viruspartikel zu entfernen und die GUVs mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Die Lipidmembran der GUVs waren mit 0,1 % DiD fluoreszenzmarkiert, um ihre Umrisse besser visualisieren zu können. Zusätzlich befand sich als Dichtigkeitsmarker der GUVs 200 nM 10 kDa Dextran, das mit Alexa Fluor 647 fluoreszenzmarkiert war, in der Lösung. Die GUVs, bei denen das Dextran in das Lumen eindringen konnte, wurden von der Messung ausgeschlossen, da sich wahrscheinlich transiente Poren in deren Lipidmembran gebildet hatten und den Austausch mit dem außenliegenden Puffer erlaubten. Diese Kontrolle war für die Bindungsexperimente nicht unbedingt erforderlich, wurde jedoch standardmäßig mitgeführt, da diese Kontrolle in den FCS-Messungen notwendig war (siehe 8.14.3).

Da nur eine Bindung an GUVs, die 10 % Phosphatidylserin enthielten, detektiert werden konnte, war die Bindung der VSV-G pseudotypisierten HI-Viruspartikel für Phosphatidylserin spezifisch. Bei Verwendung von Phosphatidsäure oder Phosphatidylinositol konnte keine Bindung beobachtet werden (Abbildung 37). Wurden Viren ohne Hüllprotein auf der Oberfläche verwendet, so konnte auch bei Phosphatidylserin-haltigen GUVs keine Virusbindung detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

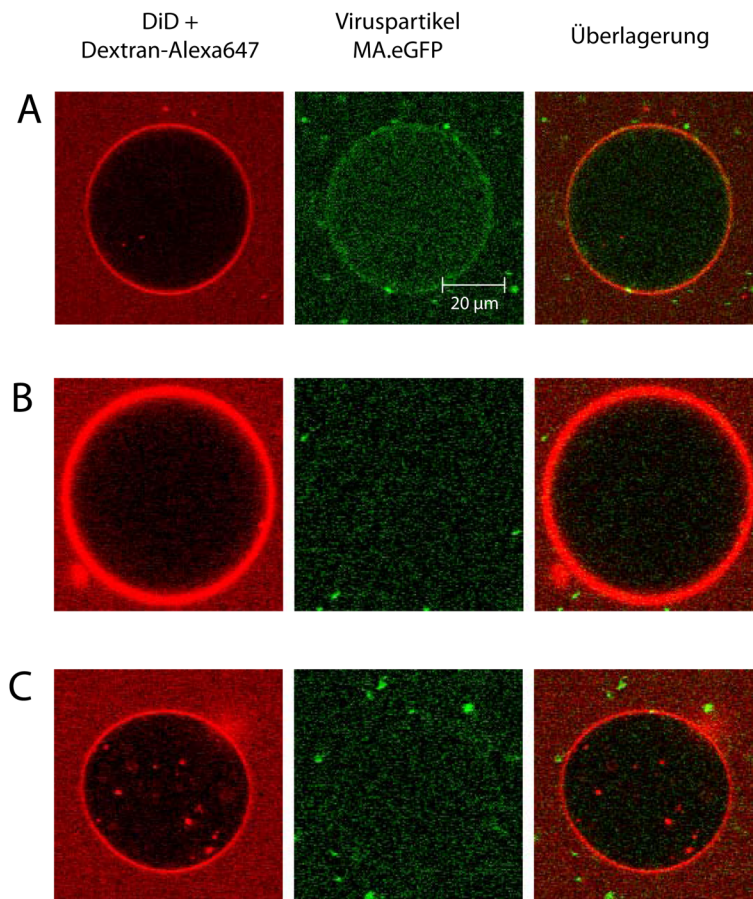


Abbildung 37: Bindung von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln an GUVs unterschiedlicher Lipidzusammensetzung. GUVs unterschiedlicher Lipidzusammensetzung wurden mit VSV-G pseudotypisierten HI-Viruspartikeln für 30 min inkubiert. Die GUVs bestanden zu 90 % aus POPC und zu 10 % aus (A) DOPS, (B) Phosphatidylinositol bzw. (C) Phosphatidsäure. Die VSV-G pseudotypisierten Viruspartikel waren durch MA.eGFP fluoreszenzmarkiert. Die Lipidmembran der GUVs war durch Einbau von 0,1 % DiD markiert. Zusätzlich befand sich 10 kDa-Dextran, das mit AlexaFluor 647 gekoppelt war, als Dichtigkeitsmarker im umgebenden Puffer. Von der GUV-Membran abgeschnürte Vesikel sind als rote Punkte im Lumen des GUV zu erkennen (C).

8.14.3 Messung von (subviralen) Partikeln im Lumen von GUVs mittels FCS

Um die Fusion von fluoreszenzmarkierten Partikeln mit GUVs mittels FCS messen zu können, wurden Experimente mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten VSV-G pseudotypisierten HI-Viren durchgeführt. Optimal wäre eine Kombination von eGFP und mRFP1 bzw. mCherry markierten Viren, die den Zustand der Partikel nach Fusion anzeigen könnten sowie zusätzlichen Kontrollmarkern für die GUV-Membran und deren Dichtigkeit. Hierzu wurden 10 kDa Dextran markiert mit Alexa Fluor 647 als Kontrolle für die Dichtigkeit der Membran und DiD inkorporiert in die GUV-Lipidmembran und zur Detektion von vom GUV abgeschnürten Vesikeln benutzt (siehe auch Abbildung 37). Ursprünglich an die GUV-Membran gebundene Viruspartikel könnten durch diese abgeschnürten Vesikel in das Lumen des GUV gelangen. Diese an GUV-Membranen gebundenen Viren könnten fälschlich für

subvirale Partikel gehalten werden. Zurzeit ist die Messung mit kommerziell erhältlichen stabilen FCS-Systemen technisch nur in zwei Kanälen möglich. Da eine gleichzeitige Nutzung von DiD und AlexaFluor 647 sowie einem mRFP1 bzw. mCherry markierten Virus aufgrund des Überlappens der Emissionsspektren nicht möglich war, wurden die Viren mit eGFP.Vpr fluoreszenzmarkiert und im zweiten Kanal die Kontrollmarker detektiert.

Die GUVs wurden in einem Puffer mit niedriger Ionenstärke (1/20 MT) für 2 h geschwollen und dann der Puffer gegen einen Puffer mit physiologischer Ionenstärke aber gleicher Osmolarität (MT150, pH 7,5) ausgetauscht. Die eGFP.Vpr markierten Viren wurden in Puffer MT150 mit fluoreszenzmarkiertem Dextran eingespült und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein Austausch des Puffers, so dass in der Kammer ein pH-Wert von 6,0 (Puffer MT 150, pH 6,0) vorlag. Die Kammer wurde für 15 min im Brutschrank auf 37°C erwärmt, 15 min abgekühlt und die Messung im Mikroskop gestartet.

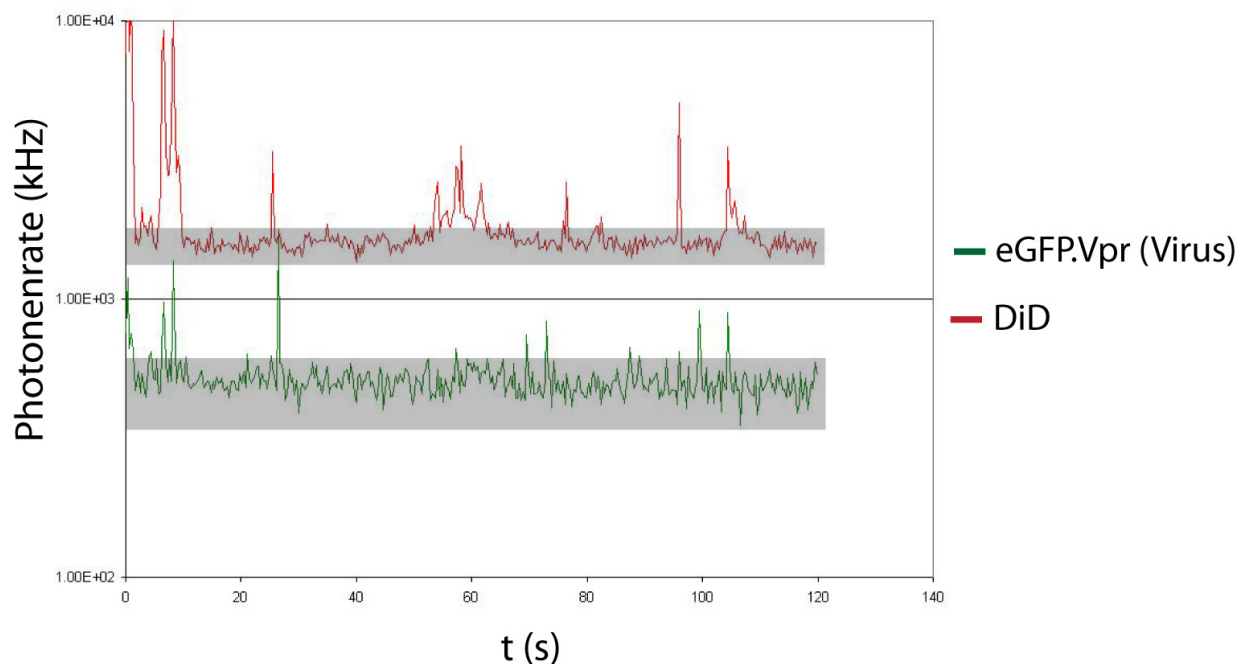


Abbildung 38: Detektion von Fluoreszenzsignalen im GUV-Lumen mittels Fluoreszenzkorrelationspektroskopie. Dargestellt ist die gemessene Photonrate (y-Achse) über die Zeit (x-Achse) bei der Messung in einem GUV-Lumen. Die GUVs waren zuvor 30 min mit eGFP.Vpr fluoreszenzmarkierten und VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln inkubiert worden. Nach einer pH-Änderung auf 6,0 durch Einspülen von Puffer MT150 (pH 6,0) wurde für 15 min auf 37°C erwärmt und anschließend wieder Puffer MT150 (pH 7,5) eingespült. Einige der grünen Virussignale (grüne Linie) konnten unabhängig von den roten Signalen (rote Linie), die mit DiD markierte Membranabschnürungen in das GUV-Innere darstellten, detektiert werden. Die grauen Kästen markieren die jeweiligen Hintergrund-Photonenraten. Diese wurden im Wesentlichen durch Fluorophore außerhalb des GUVs hervorgerufen, die mit sehr geringer Effizienz an den entfernten Rändern des Gauß-förmigen Konfokalkolumens detektiert wurden, aber kaum zu Fluktuationen beitrugen.

Im Lumen eines GUVs war es möglich eGFP-Signale zu detektieren, die nicht mit dem DiD Signal von abgeschnürten Vesikeln von der GUV-Membran korrelierten (Abbildung 38). Die Signale traten in Form von Photonenschüben auf, da sich nur ein oder wenige Partikel durch das Konfokalvolumen bewegten, gefolgt von Phasen in denen nur Hintergrundrauschen zu messen war. Es konnten sowohl Viruspartikel gebunden an von der GUV-Membran abgeschnürten Vesikeln, bei denen rote und grüne Fluoreszenzsignale gleichzeitig das Konfokalvolumen passierten, als auch einzelne rote bzw. grüne Signale gemessen werden. Die einzelnen Photonenschübe im grünen Kanal deuteten auf Viruspartikel, die sich im Lumen des GUVs bewegten, hin. Aufgrund der geringen Anzahl an Photonenschüben war keine aussagekräftige Berechnung der Autokorrelation möglich und somit konnte auch keine Aussage über die Größe dieser Partikel getroffen werden. In weiteren Messungen konnten nur in beiden Kanälen gleichzeitig auftretende Photonenschübe detektiert werden, oder es wurden keine Signale im GUV-Volumen detektiert. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die subviralen Partikel an der lumenseitigen Membran des GUV anhafteten und daher mittels FCS nicht zu detektieren waren, da mittels FCS aufgrund der räumlichen Ausdehnung des Konfokalvolumens nicht zwischen von außen oder von der Lumenseite an die Membran gebundenen Signalen unterschieden werden kann.

8.14.4 Messung der Fusion in Ensembleexperimenten durch R18-Dequenching

Um mit einer anderen Methode zu überprüfen, ob eine effiziente Fusion mit GUVs möglich war, wurden Viren mit R18 fluoreszenzmarkiert, wobei das Fluorophor im Viruspartikel so dicht-gepackt war, dass es sich selbst quenchte. Fusionieren die R18-markierten Viren mit Liposomen, kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität durch Dequenching.

Die Markierung der VSV-G pseudotypisierte Viruspartikel erfolgte durch 45 min Inkubation von Viruspartikeln (1 µg p24) mit 21 µM R18 in PBS. Der freie Farbstoff wurde durch Gelfiltration abgetrennt. Die Gelfiltrationssäule hatte ein Bettvolumen von 16,5 ml und wurde mit MT150 equilibriert. Es wurden 500 µl Viruspartikelsuspension geladen (3 % des Bettvolumens) und mit Puffer MT150 eluiert. Die R-18-markierten Viruspartikel (bestimmt durch p24 ELISA und Fluoreszenzmessung) eluierten im Ausschlussvolumen der Säule (3,5 ml).

Die SUVs bestehend aus den Lipiden POPC und DOPS im Verhältnis 1:1 oder zu 100 % aus POPC wurden durch Sonifizieren hergestellt. Die GUVs wurden aus denselben Ausgangsmischungen an (Platin-)Drähten in einem Kammervolumen von ca. 400 µl geschwollen. Ungefähr 50 % der eingesetzten Lipidmenge wurden in GUVs inkorporiert

(persönliche Kommunikation mit Heiko Keller). Bei SUVs ist von einer Rate von 80-90 % auszugehen (persönliche Kommunikation mit Heiko Keller). Die genauen Werte konnten nicht überprüft werden, da keine geeignete Messeinrichtung zur Quantifizierung der Lipidmengen nach der Herstellung der Liposomen zu Verfügung stand. Die Messungen wurden bei 37°C in Fluoreszenzspektrometer in einem Volumen von 1 ml mit vorgewärmten Lösungen durchgeführt. In der Küvette befand sich ein Rührfisch, der für eine stetige Durchmischung der Suspension sorgte. Die Änderung des pH-Werts erfolgte durch Zugabe von 12 µl 1 normaler Salzsäure, so dass ein pH-Wert von 6,0 erreicht wurde. Der Puffer MT150 wurde so gewählt, dass bei pH 7,5 und pH 6,0 eine ausreichende Pufferkapazität verfügbar war. Das Zugabevolumen der Säure wurde experimentell bestimmt.

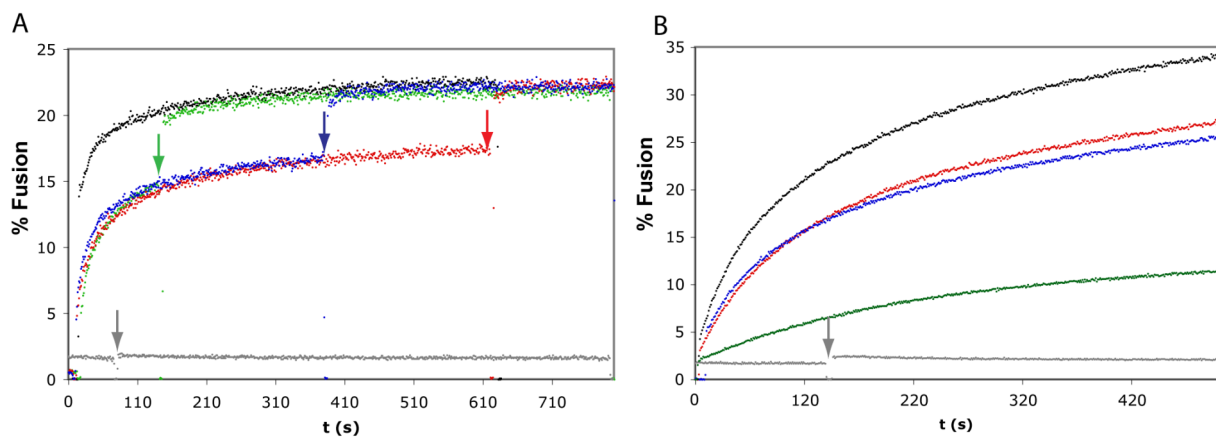


Abbildung 39: Charakterisierung des R18-Dequenching-Assays zur Messung der Virus-Liposomen-Fusion. (A) Bestimmung des optimalen Zeitpunkts für den pH-Wechsel. SUVs mit Phosphatidylserin und R18-markierte VSV-G pseudotypisierte Viruspartikel wurden gemischt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (markiert durch den Pfeil in der jeweiligen Farbe) der pH-Wert von 7,5 auf 6,0 abgesenkt. Die graue Linie stellt R18-markierte Viruspartikel, die ohne Liposomen inkubiert wurden, dar. (B) Bestimmung des unspezifischen R18-Übertrags von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikel auf SUVs, die nur aus PC bestanden. Die graue Linie stellt Viruspartikel, die ohne Liposomen inkubiert wurden, dar. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Reduktion des pH-Werts auf 6,0. Die grüne, blaue und schwarze Linie stellen Viruspartikel dar, die mit SUVs (entsprechend 2,10 und 50 nmol Lipid) inkubiert wurden. Die rote Linie repräsentiert SUVs (10 nmol Lipid), wobei sofort nach Viruszugabe der pH-Wert abgesenkt wurde.

Zuerst wurde der optimale Zeitpunkt für die Änderung des pH-Werts bestimmt. Hierzu wurden die Phosphatidylserin-enthaltenden SUVs vorgelegt, Virus hinzugegeben und nach 1, 120, 360 bzw. 600 s der pH-Wert reduziert (Abbildung 39). Der gemessene Fluoreszenzanstieg wurde auf das maximale Dequenching, ermittelt durch Zugabe von 0,1 % Triton X-100 normiert. Wie zu erkennen ist, stieg die Fluoreszenz auch bei neutralem pH-Wert an, so dass es sich hierbei wahrscheinlich um unspezifischen Fluorophorübertrag von den Viren auf die SUVs handelte. Die Fluoreszenzintensität nahm bei Absenkung des pH-

Werts zu, da nun eine effektive Fusion stattfinden konnte. Die maximale Steigerung der Fluoreszenzintensität wurde erreicht, wenn 1 s nach Viruszugabe zu den SUVs der pH-Wert abgesenkt wurde. In Abwesenheit von Liposomen betrug die Fluoreszenzintensitätszunahme von R18 markierten, VSV-G pseudotypisierten Viren bei pH-Wechsel weniger als 0,6 % des maximalen Dequenchings und konnte vernachlässigt werden (Abbildung 39). Um den unspezifischen Fluorophorübertrag zu untersuchen, wurden SUVs, die kein Phosphatidylserin enthielten und somit nicht mit Viruspartikeln fusionieren konnten, mit Viren mit bzw. ohne pH-Wert Änderung inkubiert. Die Kinetiken bei pH-Wert Änderung waren vergleichbar, so dass ein fusionsunabhängiger Fluorophorübertragung stattfand (Abbildung 39). Die erhaltene Kinetik war somit abhängig von der Liposomenkonzentration, die daher möglichst konstant gehalten werden sollte. Daher war es auch vorteilhaft, die Änderung des pH-Werts durch die Zugabe einer kleinen Menge Säure zu erreichen, anstatt durch Zugabe eines größeren Volumens an Puffer. Bei größeren Volumenänderungen müsste ansonsten für die Veränderung des Fluorophorübertrags während der Datenauswertung kompensiert werden (Daten nicht gezeigt).

8.14.5 Experimente zur Fusion von R18-markierten Viruspartikeln mit GUVs

Die Menge an GUVs, die in einer Kammer produziert wurden, war so gering, dass nur 2 vergleichende Messungen möglich waren.

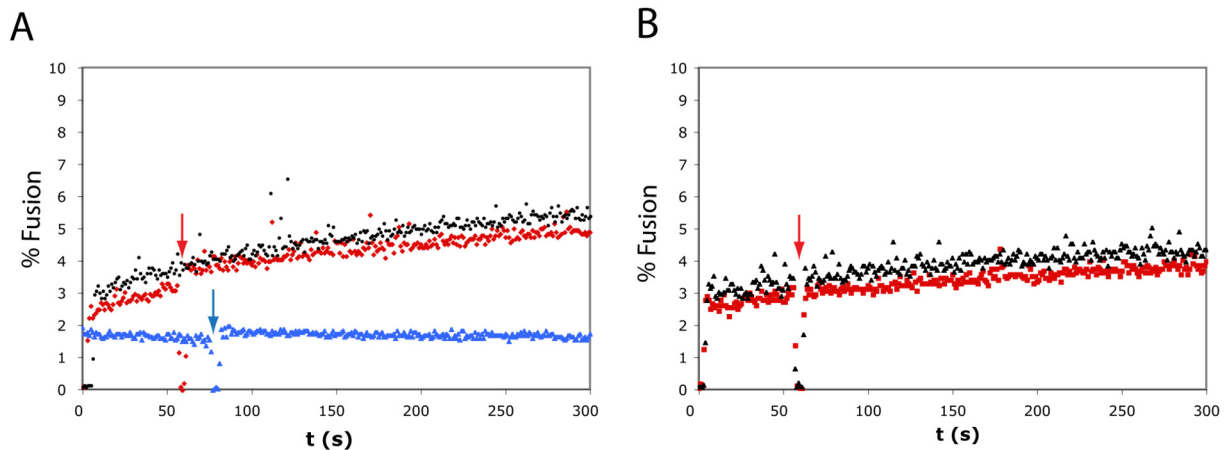


Abbildung 40: Messung des R18-Dequenchings. (A) Inkubation von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln, die mit R18-fluoreszenzmarkiert waren, mit Phosphatidylserin-haltigen GUVs. Bei der schwarzen Messkurve erfolgte die pH-Wert Änderung 1 s nach Viruszugabe, bei der roten Kurve nach 60 s. Der Fluoreszenzintensitätsanstieg der roten Messkurve bei pH-Wert Änderung war in der gleichen Größenordnung (ca. 0,5 % Fusion) wie der Effekt der pH-Wert-Änderung auf Viruspartikel in Abwesenheit von GUVs (blaue Messkurve). (B) Vergleichende Messung von GUVs mit (rote Messkurve) bzw. ohne Phosphatidylserin (schwarze Messkurve) inkubiert mit R18-markierten, VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln. Die pH-Wert Änderung von pH 7,5 auf pH 6,0 ist durch einen Pfeil markiert.

Um gleiche Lipidmengen sicherzustellen, wurde die GUV-Ausbeute einer Kammer geteilt und in zwei Reaktionen eingesetzt: Bei der ersten erfolgte die pH-Wert Änderung zeitgleich mit Viruszugabe, bei der zweiten zeitverzögert. Es war kein spezifischer Effekt der pH-Wert-Änderung auf die ansteigende Fluoreszenz zu detektieren (Abbildung 40). Bei einem Vergleich der Reaktionen zwischen GUVs mit und ohne Phosphatidylserin konnte ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden, wobei hier die eingesetzten Lipidmengen unterschiedlich sein konnten, da die Effizienz der GUV-Formation bei jedem Schwellvorgang variieren konnte (Abbildung 41).

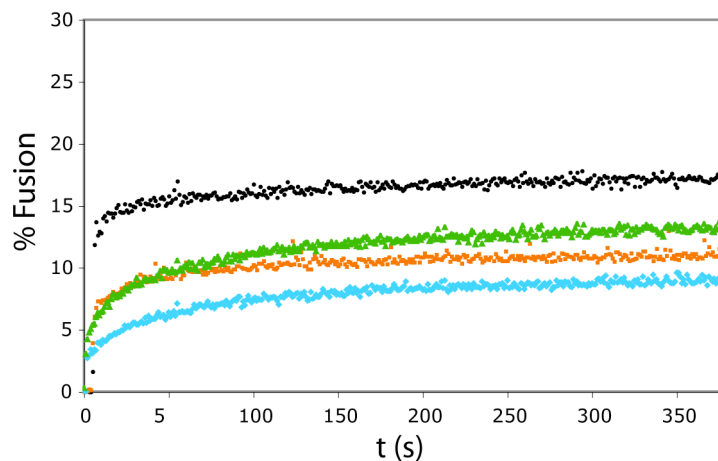


Abbildung 41: Fusion von R18 markierten VSV-G pseudotypierten Viruspartikeln mit SUVs in unterschiedlichen Konzentrationen. Darstellung der gemessenen Fluoreszenzintensität von R18 über die Zeit. Bei vergleichbarer Lipidmenge (10 nmol) wie im Experiment mit GUVs (Abbildung 40) wurde das Dequenching über die Zeit mit bzw. ohne pH-Wert Änderung (Kurven schwarz bzw. grün) ermittelt. Ebenso wurde die Messung mit bzw. ohne pH-Wert Änderung bei fünffach niedrigerer Lipidmenge (2 nmol, orange bzw. türkis) durchgeführt.

Grundsätzlich könnte eine niedrigere Lipidmenge als angenommen Einfluss auf die Detektierbarkeit des fusionsbedingten Dequenchings haben, so dass mit SUVs überprüft wurde, ob mit dieser Virusfraktion und ansonsten identischen Bedingungen eine Fusionsreaktion zu detektieren war. Es wurden auch eine fünffach niedrigere Lipidkonzentration eingesetzt, als sie nach Abschätzung im GUV-Experiment vorhanden war (Abbildung 41). Bei allen eingesetzten SUV-Konzentrationen war eine pH-abhängige Signalsteigerung und folglich eine Fusionsreaktion festzustellen.

9 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, das Eintrittsverhalten von HI-Viren in die Zielzelle durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie fluoreszenzspektroskopischer Methoden zu untersuchen, um detaillierte Erkenntnisse über die Virus-Zell-Interaktion und ihre Kinetik zu gewinnen. Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, die Anheftung des Viruspartikels an die Zielzelle, die nachfolgende Fusion und den Transport des subviralen Viruspartikels zum Zellkern in Echtzeit visuell zu verfolgen. Hierdurch kann u.a. die Rolle des Zytoskeletts und der Motorproteine für den Transport von subviralen Viruspartikeln charakterisiert werden. Langfristig erlaubt die Analyse des Viruseintritts in die Wirtszelle bei unterschiedlichen Rezeptorkonzentrationen auf der Zelloberfläche und/oder bei Inkubation mit verschiedenen Fusionsinhibitoren, neue Erkenntnisse über die einzelnen Intermediate der Virus-Zell-Fusionsreaktion zu gewinnen und damit die Entwicklung medikamentöser Interventionsstrategien zu verbessern.

Zur Unterscheidung vollständiger Viruspartikel von subviralen Partikeln wurden die Viren so mit zwei spektral unterschiedlichen Fluorophoren markiert, dass bei der Fusion ein Fluoreszenzmarker verloren gehen sollte und der subvirale Partikel anhand des zweiten Markers weiterhin verfolgt werden könnte.

Die reifen Viruspartikel trugen ein fluoreszenzmarkiertes Matrixprotein, das sich an der Lipidmembran des Virus befindet, und ein fluoreszenzmarkiertes Vpr-Protein, das im viralen *Core* lokalisiert ist. Da am Präintegrationskomplex nur geringe Mengen Matrixprotein nachgewiesen wurden (Übersicht in (Bukrinsky, 2004)), war davon auszugehen, dass das Signal des Matrixproteins bei der Fusion (nahezu) vollständig verloren geht. Fluoreszenzmarkiertes Vpr wurde bereits als Marker für subvirale Partikel nach Fusion etabliert und sollte folglich eine zeitlich aufgelöste Verfolgung des subviralen Komplexes ermöglichen (McDonald *et al.*, 2002).

9.1 Produktion zweifarbiger Viruspartikel und ihre Charakterisierung

Die Produktion markierter Viruspartikel erfolgte durch Transfektion von 293T-Zellen mit proviralen Plasmiden. Die Analyse der Proteinzusammensetzung der Viruspartikel mittels Westernblot zeigte das erwartete Ergebnis (8.5.1). In den Westernblots zum Nachweis der Proteinzusammensetzung des Virus fiel auf, dass bei steigender Inkorporation von mRFP1.Vpr in die Viruspartikel die Spaltung des Gag-Polyproteins durch die virale Protease

zunehmend unvollständiger abließ (8.11). Die Prozessierung des Gag-Polyproteins durch die virale Protease ist für die Reifung des Virus notwendig, um aus dem nicht-infektiösen, unreifen Virus das reife, infektiöse Partikel zu erzeugen (Ikuta *et al.*, 2000; Wyma *et al.*, 2000). In Wyma *et al.*, 2000 wurde publiziert, dass unreife Viruspartikel nicht mit Zellen fusionieren können und durch Punktmutationen in den Proteaseschnittstellen erzeugte, partiell (also unvollständig) prozessierte Viruspartikel eine starke Reduktion in der Fusionskompetenz aufweisen (siehe auch 9.5).

Daher wurde angestrebt, eine möglichst vollständige Spaltung der Gag-Polyproteine durch die virale Protease zu erzielen. Hierzu war die Menge an mRFP1.Vpr im Viruspartikel so gering wie möglich zu halten. Andererseits ist für die fluoreszenzmikroskopische Detektion ein starkes Signal vorteilhaft. Da sich beide Forderungen widersprechen, sollte die Inkorporation des fluoreszenzmarkierten Vpr im Viruspartikel soweit reduziert werden, dass gerade noch eine zuverlässige Detektion der Partikel im Fluoreszenzmikroskop bei Lebendzellaufnahmen in Echtzeit möglich war (8.5.1). In Experimenten mit den so optimierten doppelt markierten Viruspartikeln wurde eine Reduktion der Infektiosität um ca. 80 % festgestellt. Allerdings war die Fusionskompetenz der doppelt markierten Viruspartikel nicht beeinträchtigt (8.5.3). Daher ist davon auszugehen, dass die beobachtete Reduktion der Infektiosität durch die Fluoreszenzmarkierung auf eine Beeinträchtigung eines Schritts nach der Fusion zurückzuführen ist. Die mikroskopische Analyse der Doppelmarkierungseffizienz ergab, dass über 90 % der Viruspartikel zweifarbig fluoreszenzmarkiert waren (8.5.2). Somit können die Einzelpartikelmessungen mit Ensemblemessungen, z.B. Messungen zur Infektiosität, verglichen werden. Die Viruspräparationen wiesen eine deutliche Variation in der Anzahl der inkorporierten Fluorophore auf und somit war auch das Verhältnis der beiden Fluorophore eGFP und mRFP1 im Partikel nicht konstant (8.5.2). Die Schwankungen in der Anzahl der eingebauten Fluorophore lassen sich zum Teil über die bereits in der Cryo-Elektronenmikroskopie beobachteten Größenschwankungen von HI-Viren erklären (Briggs *et al.*, 2004; Briggs *et al.*, 2003). Ein weiterer Grund für die Schwankungen könnte aus der Kotransfektion der 293T-Zellen mit drei unterschiedlichen Plasmiden, wie es für die Produktion der Viren notwendig war, resultieren, da nicht gewährleistet ist, dass in allen Zellen das gleiche Verhältnis der drei Plasmide zueinander vorliegt. Hieraus würden Veränderungen in der Partikelzusammensetzung und damit in der Anzahl der inkorporierten Fluorophore bzw. des Verhältnisses der beiden Fluoreszenzmarker zueinander resultieren. Das Auftreten von ausschließlich mit MA.eGFP markierten Partikel kann folglich dadurch erklärt werden, dass die Produzentenzellen dieser Partikel entweder kein oder zu geringe

Mengen des Plasmids kodierend für mRFP1.Vpr enthielten. Ausschließlich mit mRFP1.Vpr markierte Partikel können entstehen, wenn die Produzentenzellen nur mit pmRFP1.Vpr und dem proviralen Plasmid pCHIV ohne kodierende Sequenz für eGFP, transfiziert wurden. Allerdings traten auch in Viruspräparationen, bei denen die Produzentenzellen nur mit pCHIV.eGFP und pmRFP1.Vpr transfiziert worden waren, ungefähr 1 % nur rot markierte Partikel auf. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass diese Signale von bei der Virusaufreinigung oder bei dem Kontakt mit dem Deckglas zerfallenen Viruspartikeln stammen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es sich um zelluläre Vesikel, in die mRFP1.Vpr inkorporiert worden war, handelte, die beim Aufreinigungsprozess nicht vollständig abgetrennt werden konnten. Allerdings konnte nach Transfektion von Produzentenzellen mit pmRFP1.Vpr ohne provirale Plasmide und anschließender Aufreinigung keine mit mRFP1.Vpr markierten Strukturen auf dem Deckglas nachgewiesen werden. Somit scheint mRFP1.Vpr alleine keine Vesikelbildung zu induzieren. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass Virus-produzierende Zellen zu einer verstärkten Vesikelbildung neigen und damit eine erhöhte Anzahl mRFP1.Vpr markierter Vesikel freigesetzt werden könnten. Trotz der genannten Hypothesen muss bei der Interpretation von Virus-Zell-Interaktionsexperimenten davon ausgegangen werden, dass ca. 1 % der Signale im Zytosol durch komplette Viruspartikel, die nur die Vpr-Fluoreszenzmarkierung aufweisen, hervorgerufen werden können. Somit kann nur bei einer ausreichend hohen Anzahl von allein mit Vpr-markierten Viruspartikeln oder bei Beobachtung einer Farbtrennung in Echtzeit von einem erfolgten Fusionsereignis ausgegangen werden.

Für Einzelpartikelmessungen ist es essentiell, dass die im Fluoreszenzmikroskop beobachteten Signale auch einzelnen Viruspartikeln entsprechen bzw. einzelne Signale aufgrund ihrer Beweglichkeit und/oder Helligkeit von Aggregaten unterschieden werden können. Um dies zu adressieren, wurden Viruspartikel in wässriger Suspension auf ihre Diffusionseigenschaften untersucht. Die Viruspartikel wiesen einen hydrodynamischen Radius von ca. 86 ± 5 nm auf (8.5.4). Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem mittels Cryo-Elektronenmikroskopie ermittelten Durchmesser von 145 ± 25 nm (Briggs *et al.*, 2003). Lediglich 2 % der gemessenen Trajektorien wiesen abweichende Diffusionskoeffizienten auf. Hierbei handelte es sich vermutlich um Virusaggregate.

Aus den Experimenten zur Charakterisierung der Viruspartikel ergab sich, dass die Viren für die Verwendung in der Lebendzellmikroskopie tauglich waren und ein Vergleich der Einzelpartikelmessungen mit klassisch virologischen wie auch biochemischen Ensemblemessungen möglich war.

9.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens von HI-Viren an die Zielzelle

Die Infektion einer Wirtszelle beginnt mit der Bindung des Virus an diese. Die Fluoreszenzmikroskopie auf Einzelpartikelebene bietet die Möglichkeit, die Bindung an die Plasmamembran detailliert in Echtzeit zu untersuchen. In initialen Experimenten wurde festgestellt, dass Viruspartikel an HeLaP4-Zellen und HeLa-Zellen, die kein CD4 auf der Zelloberfläche trugen, gleich effizient banden (8.7.2). Somit musste eine andere Interaktion als die Bindung des Hüllproteins an CD4 für diese Interaktion verantwortlich sein.

In Experimenten auf Einzelpartikelebene und in durchflußzytometrischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Virusbindung von der Heparansulfat-Konzentration und nicht von der CD4-Konzentration auf der Zelloberfläche abhing (8.7.2).

Erwartet wurde, dass zumindest ein Teil der Viruspartikel CD4-abhängig an die verschiedenen Zielzellen bindet, wenn diese kein Heparansulfat auf der Zelloberfläche trugen oder Heparansulfat durch enzymatischen Verdau mit Heparinase I entfernt wurde. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Deshalb wurden die Kontaktzeiten der Viren näher untersucht, um eventuelle transiente Wechselwirkungen zu identifizieren, die über die binäre Information des Bindens oder Nicht-Bindens eines Viruspartikels bei Membrankontakt hinausgingen. Bei genauer Betrachtung der mittleren Kontaktzeiten für die verschiedenen Zelllinien, darunter Zellen mit und ohne CD4 bzw. Heparansulfat auf der Zelloberfläche, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (8.7.2). Allerdings bildete sich in Abwesenheit von Heparansulfat auf der Zelloberfläche und in Gegenwart von CD4 eine „Schulter“ im Kontaktzeiten-Histogramm aus (8.7.3). Die „Schulter“ lies sich nicht mit einer einfachen exponentiellen Funktion anpassen. Die resultierende Kontaktzeit wurde mit 140 ms abgeschätzt. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine spezifische gp120-CD4-Interaktion. Dies wäre eine sehr kurze Interaktion, während der es zu einer Fusion kommen müsste, falls es die einzige relevante CD4-Interaktion der Viruspartikel mit der Zelle wäre. Um dies zu klären, sind in der Zukunft eine genauere Charakterisierung dieser transienten Virus-Zell-Interaktionen und die Detektion von Fusionsereignissen in Echtzeit nötig. Aufgrund der für eine detaillierte Analyse dieser Interaktion zu geringen Zeitauflösung der Bildsequenzen, konnte dieser Effekt nicht weitergehend untersucht werden. Daher ist es erforderlich, um auch die kurzen Virus-Plasmamembran-Interaktionen direkt visualisieren zu können, die Aufnahme Frequenz auf mindestens 100-200 Hz (entsprechend 10 oder 5 ms Belichtungszeit) zu erhöhen.

Die beobachtete Virusbindung an die Zielzellen war nicht CD4- aber Heparansulfat abhängig. Die Rolle von Heparansulfat als Adhäsionsfaktor ist bereits in der Literatur beschrieben

(Mondor *et al.*, 1998; Moulard *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002). Die Virusbindung wird dabei durch eine Interaktion von der V3-Schleifen-Region des gp120 mit dem Heparansulfat auf der Zelloberfläche vermittelt (Moulard *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002). Diese Interaktion von Heparansulfat führt in vielen Fällen zu einer Steigerung der Infektiosität der Viren. Für HeLaCD4-Zellen (ähnlich HeLaP4-Zellen) wurde bei Verwendung des Laborstamms Hx10 eine nahezu vollständige Inhibition der Virusinfektion nach Heparinase I-Behandlung berichtet (Mondor *et al.*, 1998). In einer vergleichenden Studie wurde gezeigt, dass Heparansulfat abhängig vom Virusstamm bzw. -isolat sowohl negative, keine, als auch positive Effekte auf die Infektiosität haben kann (Zhang *et al.*, 2002). Inwieweit die Interaktion mit Heparansulfat für die Virusinfektion *in vivo* vorteilhaft ist, bleibt unklar, da auf primären CD4-positiven T-Zellen kein Heparansulfat vorhanden ist (Ibrahim *et al.*, 1999)(und eigene Daten). Für den hier verwendeten Virusklon NL4-3 schien die Bindung an Heparansulfat nur einen geringen Effekt auf die Infektion der Zielzelle zu haben, da die Reduktion von Heparansulfat auf der Zelloberfläche die Infektiosität nur um das ca. 2,5fache verminderte (8.7.2). Die Virusbindung und die Endozytose von HI-Viren waren dagegen um mehr als das 10fache herabgesetzt (8.7.2). Die moderate Reduktion der Infektiosität korrelierte mit der verminderten Endozytose. Dies legt den Schluss nahe, dass Viruspartikel noch im Endosom, bevor ihre Degradation einsetzt, sporadisch mit der Endosomenmembran fusionieren und so zur produktiven Infektion der Zellen beitragen. Tatsächlich konnte in unserer Abteilung gezeigt werden, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose zu 40-60 % an der produktiven Infektion von HeLaP4-Zellen beteiligt ist (Daecke *et al.*, 2005). Die Mehrheit der an Heparansulfat gebundenen Viruspartikel wurde jedoch nicht innerhalb der ersten Stunden internalisiert, sondern blieb auf der Zelloberfläche immobilisiert. Diese Viruspartikel waren zweifarbig und hatten wahrscheinlich noch nicht mit der Plasmamembran fusioniert (8.7.3). Somit konnte durch eine Heparinase I-Behandlung vor der eigentlichen Virusinkubation diese mehrheitlich nicht zur Infektion beitragenden Viren entfernt und dadurch die mikroskopische Detektion der Vorgänge an der Plasmamembran verbessert werden.

In weiteren Experimenten wurde festgestellt, dass die Virusbindung von Env(-)- und Env(+)-Viruspartikeln an HeLaP4-Zellen vergleichbar war (8.7.2). Somit wurde der Großteil der Virusbindung an Heparansulfat nicht durch das HIV-Hüllprotein Env, sondern durch andere Faktoren auf der Virusoberfläche vermittelt. Dieser Faktor oder diese Faktoren stammen wahrscheinlich von der Produzentenzelllinie 293T und vermitteln die Virusbindung an Heparansulfatmoleküle auf der Zielzelle.

In der Literatur war bisher nur die Interaktion von Heparansulfat mit dem HIV-Hüllprotein und die dadurch vermittelte Bindung an die Zielzelle beschrieben (Mondor *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002). Allerdings sind andere Hüllprotein-unabhängige, jedoch Produzenten- und Zielzell-spezifische Interaktionen in der Literatur bekannt. So führt die Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 zu einer 10fachen Steigerung der Infektiosität durch Erhöhung der Virusbindung an die Zielzelle (Hildreth und Orentas, 1989; Tominaga *et al.*, 1998; Tremblay *et al.*, 1998). Auch die Interaktion von HI-Viruspartikeln mit ICAM-3 auf der Zielzelle wurde beschrieben (Sommerfelt und Asjo, 1995).

Die hier beschriebene Virus-Zell-Interaktion war weder von CD4 auf der Zielzelle noch vom HIV-Hüllprotein auf dem Viruspartikel abhängig. Weiterin ist die *in vivo* Funktion von Heparansulfat aufgrund des Fehlens von Heparansulfat auf den Haupt-Zielzellen, den CD4-positiven Lymphozyten, fraglich. Daher wurde nicht nach dem diese Bindung vermittelnden Faktor gesucht, sondern, wie bereits erwähnt, die über Heparansulfat-vermittelte Virusanheftung durch Heparinase I-Behandlung reduziert.

9.3 Verbesserungen zur Detektion von Farbtrennungseignissen

In über 10.000 manuell ausgewerteten Trajektorien konnte kein eindeutiges Farbtrennungseignis identifiziert werden. Weiterhin wurden mehrere hundert Bildsequenzen, die schätzungsweise weitere 10.000 Virustrajektorien enthielten, erfolglos auf mögliche Farbtrennungseignisse untersucht, indem diese Bildsequenzen visuell betrachtet und nach einem quantitativen Verlust des MA-Fluorophors gesucht wurde. Da kein Farbtrennungseignis identifiziert werden konnte, wurde die bisherige Vorgehensweise analysiert und eine Reihe von möglichen Optimierungsschritten ermittelt.

Die fluoreszenzmikroskopische Detektion der Virus-Zell-Interaktion begann ca. 2 min nach Viruszugabe und dauerte bis zu 2 h. Ob in diesem Zeitraum auch die Mehrheit der Fusionsereignisse zu erwarten gewesen wäre, wurde in Infektionsexperimenten von Bärbel Glass untersucht, wobei die Infektion nach bestimmten Inkubationszeiten der Zellen mit Viruspartikeln durch Zugabe des Korezeptorantagonisten AMD3100 beendet wurde. Die Infektion der TZM-Zellen war innerhalb der ersten Stunde schon zu ca. 40-50 % und nach 2 h zu 80-85 % abgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Ergebnisse wurden mittels Zell-Zell-Fusionsassays gewonnen. In diesen Experimenten erreichte die Fusion nach 50-100 min einen Plateauwert. Bei Experimenten mit X4-Viren wurde in Zell-Zell-Fusionsassays eine 10-15 min dauernde Verzögerungsphase bis zum Einsetzen der Fusionsreaktion detektiert (Dimitrov *et al.*, 1991; Gallo *et al.*, 2003; Gallo *et al.*, 2001; Golding *et al.*, 2002; Klinger *et*

al., 2001; LaBranche *et al.*, 1999; Lineberger *et al.*, 2002; Munoz-Barroso *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1996). Die halbmaximale Fusion wurde in vergleichenden Experimenten bestimmt und lag für HIV-1 (IIIB) bei 60 min, für HIV-2 (SBL bzw. ROD) bei ca. 25 min. Die Fusion für die getesteten HIV-Derivate verläuft bei HIV-2 somit schneller als bei HIV-1 (Gallo *et al.*, 2006). Bei CCR5-tropen Viren war die Fusion nach 1 h zu ca. 40 % und nach 2 h zu ca. 60 % abgeschlossen (Platt *et al.*, 2005).

Der für die visuelle Beobachtung genutzte Zeitrahmen deckte also den Zeitbereich maximaler Fusionsrate für die meisten HI-Viren inklusive der verwendeten NL4-3 basierten Viruspartikel ab. Eine Ausdehnung der Beobachtungszeit über 2 h hinaus erschien damit wenig sinnvoll. Messungen nach mehr als 2 h wurden zusätzlich durch das vermehrte Auftreten von Virusaggragaten erschwert.

Es wäre auch möglich, dass die Fusion effizienter an nicht beobachteten Regionen der Zelle stattfand. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da es sich bei HeLaP4-Zellen um nicht-polarisierte Zellen handelt. Weiterhin bilden HeLaP4-Zellen nur wenige Filopodien aus, so dass das „Einfangen“ von Viruspartikel durch diese und der Transport entlang der Filopodien zum Zellkörper eine eher untergeordnete Rolle spielen dürfte (sog. *Surfing*, (Lehmann *et al.*, 2005)).

Es könnte sein, dass es nicht, wie bei den anfänglichen Auswertungen (8.7) angenommen, zu einer quantitativen Trennung von MA.eGFP und mRFP1.Vpr bei der Fusion kommt. Würde die „Farbtrennung“ aber nur durch eine Reduktion und nicht den kompletten Verlust des Matrixsignals gekennzeichnet sein, so besteht die Möglichkeit, dass dieses Ereignis bei einer visuellen Auswertung (auch aufgrund des reduzierten Farbumfangs der Darstellung (8.8)) unberücksichtigt bliebe. Um auch eine graduelle Veränderung in den Fluoreszenzverhältnissen der beiden Marker erkennen zu können, war es notwendig, die Helligkeit aller Viruspartikel in einer Bildsequenz quantitativ zu analysieren (8.8). Um die Analyse zu beschleunigen, wurde die Entwicklung einer Tracking-Software in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. Karl Rohr begonnen (8.13).

Zusätzlich wurde angestrebt, die Zahl der Fusionsereignisse zu steigern, um so die Wahrscheinlichkeit der Detektion dieses Ereignisses im Beobachtungsfeld während der Beobachtungszeit zu erhöhen. Um die Fusionseffizienz zu steigern, wurden zweifarbig fluoreszenzmarkierte HI-Viruspartikel mit VSV-G pseudotypisiert, da bekannt ist, dass durch die Inkorporation des viralen Hüllproteins des Vesikulären Stomatitis Virus in die Lipidmembran von HI-Viren die Fusionsrate gesteigert werden kann (Canki *et al.*, 2001; Cronin *et al.*, 2005; Landau und Littman, 1992). Allerdings erfolgt die Fusion der VSV-G

pseudotypisierten Viruspartikel nicht mehr an der Plasmamembran, sondern nach Clathrin-vermittelter Endozytose im angesäuerten Endosom. Die Ansäuerung des Milieus ist für die Konformationsänderung des VSV-Glykoproteins essentiell, damit dieses seine fusionskompetente Konformation einnehmen kann (Blumenthal *et al.*, 1987; Matlin *et al.*, 1982; Schlegel *et al.*, 1982; Schlegel *et al.*, 1983).

Da die Ansäuerung des Milieus eine essentielle Bedingung der Fusion von mit VSV-G pseudotypisierten HI-Viruspartikeln ist und die Emission von verschiedenen Fluorophoren zum Teil erheblich vom pH-Wert der Umgebung abhängig ist, wurde die pH-Stabilität der Markerfluorophore in den Viruspartikeln experimentell ermittelt (8.8.1). Dieses sollte gewährleisten, dass die optimale Fluorophorkombination gewählt wird, so dass auch im sauren Milieu eine eindeutige Klassifizierung von kompletten und subviralen Viruspartikeln möglich ist. Würde das pH-instabilere Fluorophor an das Matrix-Protein gekoppelt, so könnte dessen Fluoreszenz im Endosom gequencht und damit ein subvirales Partikel vorgetäuscht werden. Bei den Kontrollmessungen von Viruspartikeln im Fluoreszenzspektrometer erwies sich eGFP verglichen mit mRFP1 als das pH-sensitivere Fluorophor (8.8.1). Die für eGFP-gemessenen Werte sind in guter Übereinstimmung mit dem in (Shaner *et al.*, 2004; Shaner *et al.*, 2005) publizierten pKa-Wert von 6,0. Für mRFP1 waren noch keine Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz veröffentlicht. mRFP1 erwies sich im untersuchten pH-Bereich von pH 4,0 bis pH 9,0 als stabil (8.8.1). Für mCherry ist ein pKa-Wert von < 4,5 publiziert (Shaner *et al.*, 2004; Shaner *et al.*, 2005).

Aufgrund der besseren pH-Stabilität von mRFP1 bzw. mCherry wurde für Einzelpartikelmessungen mit pseudotypisierten Viruspartikeln die inverse Farbkombination mit MA.mCherry, einer Weiterentwicklung von mRFP1, und eGFP.Vpr bevorzugt.

9.4 Experimente mit VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln

In initialen fluoreszenzmikroskopischen Experimenten zur Analyse der Interaktion von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln mit HeLaP4-Zellen wurde mit zunehmender Inkubationszeit im Zytosol wie auch im Kern eine diffuse Fluoreszenz beobachtet. Hierbei fand sich das Vpr-Signal bevorzugt im Zellkern, aber auch in geringem Maße im Zytosol, während das MA-Signal ausschließlich diffus im Zytoplasma lokalisiert war (8.8.3). Dieser Effekt trat nicht auf, wenn die Fusion durch Inhibition der Ansäuerung des Endosoms durch Bafilomycin A1 inhibiert wurde (8.8.3). Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass eine vom pH-Wert in den Endosomen abhängige Fusion und Farbtrennung von fluoreszenzmarkierten VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln stattfand.

Es wurde beschrieben, dass freies Vpr in den Kern transportiert wird und sich mit der Zeit darin anreichert (Di Marzio *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 1998; Karni *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1993; Mahalingam *et al.*, 1997; Subbramanian *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998).

Die diffuse Anfärbung des Zytoplasmas durch MA.eGFP deutet auf freies, nicht an eine Lipidmembran gebundenes MA hin. Weiterhin war keine Markierung einer Lipidmembran zu erkennen (8.8.3). Dies kann als indirekter Hinweis auf den beschriebenen „Myristyl-Switch“ gewertet werden, bei dem der Myristyl-Anker bei proteolytischer Spaltung des Gag-Polyproteins aufgrund einer konformationellen Änderung im Matrixprotein aus der Lipidmembran gezogen wird (Saad *et al.*, 2006; Spearman *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2004).

Die Echtzeit-Messungen wurden mit MA.mCherry und eGFP.Vpr markierten VSV-G pseudotypierten Viruspartikeln und HeLaP4-Zellen durchgeführt. Ein Fusionsereignis sollte durch eine deutliche Änderung im Intensitätsverhältnis der beiden Fluoreszenzmarker definiert sein. Allerdings konnte der genaue Ablauf des Ereignisses nicht sicher vorhergesagt werden und daher war es notwendig alle Trajektorien, bei denen auffällige Änderungen des Fluoreszenzverhältnisses auftraten, manuell zu verifizieren. Die überwiegende Mehrheit der Trajektorien, bei denen sich das Fluoreszenzverhältnis änderte, war auf Artefakte zurückzuführen (8.8.4). Dennoch gelang es, ein Farbtrennungseignis zu identifizieren (8.8.5), auf das später eingegangen wird.

Die Analyse des Bewegungsverhaltens der intrazellulären VSV-G pseudotypierter Viruspartikel in HeLaP4-Zellen sollte Aufschluss darüber geben, ob sich das Bewegungsverhalten der Viruspartikel in Gegenwart der Ansäuerung der Endosomen und dadurch die Fusion inhibierenden Bafilomycin A1 änderte, um so eventuell typische Bewegungsmuster von subviralen Viruspartikeln identifizieren zu können.

Die Auswertung des Bewegungsverhaltens der Viruspartikel erfolgte unter Verwendung der Tracking-Software (8.13). Diese zeigte zwar die Auftragung des mittleren Verschiebungswertes gegen das Zeitintervall an, jedoch keine automatisierte Auswertung des Bewegungsprofils. Deshalb wurde die vorherrschende Partikelbewegung einer Trajektorie manuell ermittelt. Bei Vergleich der Bewegungsmuster ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Bewegungsverhalten zwischen fusogenen und nicht-fusogenen Bedingungen (8.8.4). Eine detaillierte Untersuchung der Trajektorien, bei der nicht nur die vorherrschende Bewegungsart der Gesamtrajektorie berücksichtigt werden kann, ist für eine weitere Entwicklungsstufe der Tracking-Software geplant. Hierbei soll die Software in der Lage sein, eine Trajektorie in einzelne Sequenzen nach Art ihrer Bewegung zu zerlegen und

weitergehend auszuwerten. Erfolgversprechende Ansätze zur sequenziellen Analyse von Trajektorien mittels neuronaler Netzwerke wurden kürzlich veröffentlicht (Helmuth *et al.*, 2007).

Bei der Auswertung des Bewegungsverhaltens der Viruspartikel wurde nicht zwischen Trajektorien im Zytoplasma und an der Plasmamembran unterschieden, da diese Unterteilung wie bereits erwähnt schwierig ist (8.8.4). Es konnten Viruspartikel identifiziert werden, die eine freie oder eingeschränkte Diffusion aufwiesen (8.8.4), wobei sich einige Partikel im Zytosol befanden. Zur Bestätigung dieser ersten, manuellen Auswertung ist es jedoch unabdingbar, eine Auswertung der ermittelten Trajektorien durch Anpassung mathematischer Funktionen, die das Diffusionsverhalten beschreiben, durchzuführen. Die Beobachtung der freien Diffusion von Partikeln im Zytosol steht im Widerspruch zu Veröffentlichungen, in denen für Partikel, deren Durchmesser größer als 20 nm ist, keine freie Diffusion im Zytosol detektiert wurde (Greber und Way, 2006; Luby-Phelps *et al.*, 1987; Luby-Phelps *et al.*, 1986). Diese Aussage beruht jedoch auf der Messung des Ensembleverhaltens von in Zellen mikroinjizierten Dextranen oder anderen inerten Makromolekülen verschiedener Größe und der Analyse des Bewegungsverhaltens mittels FRAP (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*). Daher wäre es dennoch möglich, dass es in der Zelle (begrenzte) Regionen im Zytoplasma gibt, in denen weiterhin eine beschränkte oder freie Diffusion für eine gewisse Zeit möglich ist, was in Ensemblemessungen nicht räumlich aufzulösen ist.

Bei der systematischen Auswertung der Bildsequenzen der Virus-Zell-Interaktion von mit VSV-G pseudotypisierten Viruspartikel gelang es, ein eindeutiges Farbtrennungseignis zu identifizieren. Ein zu Beginn der Bildsequenz zweifarbiges Viruspartikel, das sich wahrscheinlich in einem Endosom befand, zeigte zuerst eine gerichtete Bewegung. Dann verlor dieses in einer Phase mit geringer Beweglichkeit den überwiegenden Teil des MA.mCherry-Signals, was als Fusion gewertet werden kann. Das eGFP.Vpr-Signal stieg zu diesem Zeitpunkt leicht an und das Partikel ging wieder in eine gerichtete Bewegung über. Anschließend diffundierte das Partikel in einem begrenzten Bereich (beschränkte Diffusion) für die verbleibende Beobachtungszeit im Zytosol (8.8.5). Das Partikel befand sich über die gesamte Beobachtungszeit im Bereich der Fokusebene, da keine für defokussierte Partikel typische Signalverbreiterung beobachtet wurde. Somit ist ein reines Detektionsartefakt aufgrund chromatischer Abberation auszuschließen. Die Tracking-Software konnte das Partikel über die gesamte Beobachtungszeit verfolgen. Die detaillierte Analyse der Trajektorie ergab, dass nicht das gesamte Matrixsignal zum Zeitpunkt der „Farbtrennung“ verloren ging (8.8.5). Dies ist in Übereinstimmung mit Publikationen, bei denen auf biochemischem Wege

MA am subviralen Partikel nachgewiesen werden konnte (Bukrinsky, 2004; Bukrinsky *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1997).

Bei der Fusion blieb kein Matrixsignal in Form eines Membranpatches zurück, so dass es wahrscheinlich ist, dass die Matrixmoleküle in das Zytsosol diffundierten. Dies stünde in Übereinstimmung mit der diffusen Färbung des Zytsosols durch fluoreszenzmarkiertes MA, wenn Zielzellen für mehr als 1 h mit Virus inkubiert wurden (8.8.3). Der Anstieg der eGFP-Fluoreszenz des Vpr-Signals zum Zeitpunkt der „Farbtrennung“ könnte durch die Änderung des pH-Werts bedingt sein, da der Partikel vom sauren Endosom in das neutrale Zytsosol gelangt sein könnte. Ein Anstieg des pH-Werts vom sauren Milieu zu einer neutralen Umgebung führte bei Ensemblemessungen von Viruspartikeln im Fluoreszenzspektrometer zu einem Anstieg der eGFP-Fluoreszenz (8.8.1). Eine weitere Erklärung für das Ansteigen der eGFP-Fluoreszenz wäre eine verstärkte Anregung der eGFP-Moleküle, da die Absorption von Anregungslicht durch die mCherry-Moleküle der Matrix-Hülle entfällt. Weiterhin könnte im vollständigen Viruspartikel auch ein Teil des von eGFP emittierten Fluoreszenzlichts durch die mCherry-Moleküle absorbiert werden. Es kann auch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass eine geringe Bewegung des Partikels senkrecht zur Beobachtungsebene die Intensitätssteigerung des eGFP-Signals verursachte. Um den Grund für das Ansteigen des eGFP-Signals genauer zu definieren, wäre zuerst eine Analyse vieler Fusionsereignisse und die Bestimmung ihrer charakteristischen Eigenschaften notwendig.

Die Trajektorie des Viruspartikels wurde manuell segmentiert und mittels Analyse des mittleren Verschiebungsquadrats analysiert (8.8.5). Während das Partikel zweifarbig war, kann davon ausgegangen werden, dass sich das Partikel in einem Endosom befand, da nur dieses für das Viruspartikel eine fusogene (angesäuerte) Umgebung bereitstellen konnte. Zuerst führte das Viruspartikel eine Phase gerichteter Bewegung aus, die aufgrund ihrer Geschwindigkeit (von ca. 0,6 $\mu\text{m/s}$) sowie auch der Charakteristik im MSD-Plot einem Motorprotein getriebenen Transport zugeordnet werden kann (Schliwa und Woehlke, 2003). Darauf folgt eine Phase in der sich das Partikel kaum bewegte ($<0,1 \mu\text{m}$) und in der die Farbtrennung erfolgte. Der subvirale Partikel bewegte sich in der folgenden Phase mit einer Geschwindigkeit von ca. 1,3 $\mu\text{m/s}$, wie es wiederum typisch für einen Motorprotein-getriebenen Transport ist (Schliwa und Woehlke, 2003). Eventuell handelte es sich hierbei um das Motorprotein Dynein, das schon in (McDonald *et al.*, 2002) mit der Bewegung von subviralen Partikeln assoziiert wurde. Danach scheint das Partikel keinen Kontakt mehr zum Zytskelett zu haben und sich in einem abgegrenzten Bereich frei zu bewegen, da die Bewegungscharakteristik auf eine beschränkte Diffusion im Zytsosol hindeutet.

Da keine weiteren Farbtrennungseignisse detektiert wurden, konnten keine charakteristischen Merkmale der Fusion bestimmt werden. Aus dem einen beobachteten Farbtrennungseignis kann jedoch die Annahme abgeleitet werden, dass sich subvirale Partikel im Zytosol anhäufen sollten.

Um subvirale Partikel in statistisch signifikanter Anzahl in Zellen nachweisen zu können, wurden HeLaP4-Zellen mit VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln für verschiedene Zeiträume bei 37°C inkubiert, fixiert und mindestens 10 Zellen zu jedem Zeitpunkt in 3D mikroskopiert. Das Fluoreszenzverhältnis der automatisch detektierten Viruspartikel wurde mit der mit Bafilomycin A1 behandelten Kontrollgruppe verglichen (8.9). Erwartet wurde, dass nach 1 h bis zu 70 % der Viruspartikel fusioniert waren (Campbell *et al.*, 2007; Marechal *et al.*, 1998). In den durchgeführten Messungen konnte kein Unterschied zwischen fusogenen und nicht-fusogenen Bedingungen festgestellt werden (8.9). Somit konnte kein Hinweis auf eine Anhäufung subviraler Viruspartikel nach Fusion im Zytosol gefunden werden. Da es aber nach ca. 1 h zu einer diffusen Färbung der Zellen mit den durch das Virus eingebrachten Fluorophoren kam (8.8.3), war gezeigt, dass die Fusion effektiv stattfand. Daher war zu adressieren, warum die Farbtrennung in der Mehrzahl der untersuchten Ereignisse scheinbar nicht wie im bereits dargestellten Farbtrennungseignis ablief (8.8.5). Hierzu wurde die Lipidmembran des Viruspartikels durch Behandlung mit einem Detergenz *in vitro* entfernt und anschließend deren Fluoreszenzmarkierung mikroskopisch untersucht (8.10).

9.5 Partikelstabilität der fluoreszenzmarkierten Viruspartikel

Die Behandlung von Viruspartikeln mit dem Detergenz Triton X-100 entfernt die Lipidhülle des Virus und erlaubt so bei unreifen Viruspartikeln die Detektion der stabilen Gag-Hülle mittels Elektronenmikroskopie bzw. bei reifen Partikeln nach entsprechender Aufreinigung die Isolation der viralen *Core*-Struktur (Welker *et al.*, 2000; Wilk *et al.*, 2001). Partiiell prozessierte Viruspartikel wurden bisher nicht systematisch auf ihre Stabilität untersucht.

Wurden Viruspartikel mit Triton X-100 behandelt, die mit mRFP1.Vpr und mit eGFP, das über einen Src-Anker an die Plasmamembran assoziiert war (Src-NLS.eGFP), markiert waren, ging das eGFP-Signal im Gegensatz zum Vpr-Signal verloren. Dies zeigt, dass es möglich war, die Lipidmembran unter den gegebenen Bedingungen vollständig zu entfernen und weiterhin das Vpr-Signal zu detektieren (8.10). Wurden mit MA.eGFP und mRFP1.Vpr fluoreszenzmarkierte Viruspartikel verwendet, konnten nach der Triton-Behandlung noch zweifarbige Viruspartikel detektiert werden. Es kam folglich zu einer unvollständigen Farbtrennung (8.10). Bei Verwendung von mit Src-NLS.eGFP und MA.mCherry markierten

Viruspartikeln kam es zu einem (nahezu) vollständigen Verlust an detektierbaren Signalen (8.10). Dies legt nahe, dass bei mit MA.eGFP und mRFP1.Vpr markierten Viruspartikeln eine (zumindest partielle) Stabilisierung der Matrixhülle vorlag, da bei Tritonbehandlung diese mit dem Vpr-Marker assoziiert blieb. Mit steigender Menge an mRFP1.Vpr im Partikel nahm nicht nur die Prozessierung des Gag-Polyproteins ab, sondern auch gleichzeitig die Stabilität der Matrixhülle zu, da mehr partikuläre Signale (ohne Lipidhülle) nach Tritonbehandlung auf dem Deckglas detektiert werden konnten (8.11). Da ein Effekt von Triton auf die (quantitative) Anheftung der Partikel auf dem Deckglas nicht ausgeschlossen werden kann, lassen die Werte der nach Tritonbehandlung detektierten Signale keinen Rückschluss auf die tatsächliche Anzahl zerfallener Partikel zu. Um festzustellen, ob allein eine reduzierte Prozessierung des Gag-Polyproteins Viruspartikel stabilisieren konnte, wurden die mit MA.eGFP fluoreszenzmarkierten Viruspartikel in der Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Proteaseinhibitors Lopinavir produziert. Hierdurch konnten sowohl Partikelpräparationen mit einer partiellen Gag-Prozessierung wie auch vollständig unprozessierte Viruspartikel hergestellt werden. Bei diesem Experiment wurde wieder die steigende Partikelstabilität bei einer Reduktion der Gag-Prozessierung deutlich (8.11).

Die Stabilisierung der Gag-/MA-Hülle bei durch Proteaseinhibitor-Zugabe teilprozessierten Viruspartikeln konnte nicht nur auf Einzelpartikelebene, sondern auch in Ensembleexperimenten gezeigt werden, bei denen der Zerfall der Hülle mittels FRET zwischen MA.CFP und MA.YFP nach Tritonzugabe gemessen wurde (persönliche Kommunikation mit Barbara Müller). Hierbei zeigte sich, dass das verbleibende FRET-Signal nach Tritonbehandlung linear mit steigender Inkorporation des mCherry.Vpr-Fusionsproteins in die Viruspartikel anstieg. Bei steigender Inhibition der viralen Protease durch den Proteaseinhibitor Lopinavir konnte mittels FRET ebenfalls eine ansteigende Stabilität der Gag-/MA-Hülle nach Tritonbehandlung nachgewiesen werden.

Ob die Stabilisierung der Gag-/MA-Hülle zum Teil auch auf einer Interaktion von Ma.XFP bzw. Gag.XFP und XFP.Vpr im Viruspartikel beruht, kann nicht vollständig geklärt werden, da alle Messungen auf der Fluoreszenzdetektion von MA.XFP bzw. Gag.XFP beruhen (X steht hier für ein beliebes Fluorophor: eGFP, CFP, YFP, mCherry, mRFP1 etc.). Der Einfluss auf XFP.Vpr auf die Prozessierung des unmarkierten Gag-Polyproteins im Viruspartikel war mit der von fluoreszenzmarkierten Partikeln vergleichbar, so dass es keine Hinweise für eine Verstärkung der Effekte durch MA.XFP gibt. Auch bei Viruspartikeln, die β -Lactamase.Vpr inkorporiert hatten, konnte eine Reduzierung der Gag-Prozessierung gezeigt werden (persönliche Kommunikation mit Maria Anders und Barbara Müller), so dass dieser Effekt

nicht spezifisch für das gekoppelte Fluorophor zu sein scheint. Der Effekt von übermäßig inkorporiertem unmarkiertem Vpr in den Viruspartikel kann nicht untersucht werden, da die Überexpression von Vpr für die Produzentenzelle toxisch ist (Alimonti *et al.*, 2003; Roumier *et al.*, 2002).

Bei Viruspartikeln, in denen durch gerichtete Mutagenese der Proteasespaltstellen die Prozessierung durch die virale Protease verhindert wurde, zeigte sich eine Beeinträchtigung der Fusionskompetenz der Viren. Vollständig unprozessierte Partikel waren nicht mehr fusionskompetent (Wyma *et al.*, 2000). Wurde die Spaltung des Gag-Polypeptids jedoch durch Proteaseinhibitoren gehemmt, so waren diese noch fusionskompetent (persönliche Kommunikation mit Barbara Müller). Dies deutet darauf hin, dass die genetischen Mutationen der Proteaseschnittstellen noch weitere Effekte auf die Struktur der Gag-Proteine hat, die zusätzlich die Fusion beeinträchtigen. Allerdings zeigten Viruspartikel, die in Gegenwart von geringen Proteaseinhibitorkonzentrationen hergestellt wurden, nur eine geringe Inhibition der Gag-Prozessierung. Die Fusionsrate ist verglichen mit dem Wildtyp unverändert, die Viren sind aber nicht mehr infektiös (persönliche Kommunikation mit Bärbel Glass und Barbara Müller). Dies könnte auch die Reduktion der Infektiosität bei unveränderter Fusionskompetenz der zweifarbig fluoreszenzmarkierten Viruspartikel erklären (8.5.1), da diese noch geringe Mengen Gag bzw. Gag.eGFP im Viruspartikel aufwiesen. Eventuell könnte unprozessiertes Gag an den subviralen Partikeln gebunden bleiben und so die weiteren Schritte bis hin zum Kernimport, an denen Matrix beteiligt sein könnte, behindern (Übersicht in (Bukrinsky, 2004)).

Die Stabilisierung der Gag-/MA-Hülle führt eventuell bei Fusion der Viruspartikel mit der Zelle zur Generierung eines noch mit Gag- bzw. MA-umhüllten *Cores*, das wahrscheinlich nicht die *in vivo* Situation widerspiegelt. Diese Struktur wäre noch zweifarbig mit MA.XFP und XFP.Vpr fluoreszenzmarkiert und würde daher nicht als „subvirales Partikel“ identifiziert. Messungen, die diesen Effekt quantitativ adressieren würden, sind im vorliegenden System nicht mit hinreichender Genauigkeit möglich, da Proteine von zerfallenen Partikeln ungleichmäßig an das Deckglas binden und durch diesen Hintergrund die genaue Bestimmung der Helligkeiten der Partikel nicht möglich ist. Durch die Etablierung einer Methode zur Glasreinigung bzw. entsprechender Vorbehandlung, die ein gleichmäßiges Binden der freien Fluorophore ermöglicht, wäre in Zukunft eine detailliertere Auswertung der Helligkeiten möglich.

Wäre die obige Hypothese, dass eine Gag-/MA-Hülle am Partikel nach Fusion verbleibt, zutreffend, so würde das detektierte Farbtrennungseignis eine (positive) Ausnahme

darstellen (8.8.5). An dieser Stelle ist anzumerken, dass das Vpr-Signal des Partikels sehr schwach war und somit von einer geringen Zahl eingebauter fluoreszenzmarkierter Vpr-Moleküle auszugehen ist. Somit könnte dieser Viruspartikel eine relativ gute Gag-Prozessierung aufweisen.

In der Publikation von (Campbell *et al.*, 2007) konnte eine Farbseparation von zweifarbig fluoreszenzmarkierten VSV-G pseudotypisierte HI-Viren gezeigt werden. Die Fluoreszenzmarker waren hierbei eGFP.Vpr und ein Marker an der Lipidmembran des Virus, S15.mCherry, der aus den ersten 15 Aminosäuren des Src-Ankers fusioniert mit mCherry besteht. Diese Membranmarkierung könnte jedoch für Echtzeit-Lebendzelleexperimente zu schwach sein (persönliche Kommunikation mit O. Perez und E. Campbell). Eigene Experimente mit einem eGFP-Fusionprotein (Src-NLS.eGFP), das über eine den ersten 15 Aminosäuren des Src-Ankers ähnliche Struktur an die Lipidmembran rekrutiert wurde, zeigten ein für die Lebendzellmikroskopie zu schwaches Signal (8.10).

Verbleibt nach der Fusion eine vollständige Gag-/MA-Hülle am subviralen Partikel, die das virale *Core* bzw. den Präintegrationskomplex umschließt, könnte damit die Dissoziation von nicht oder nur schwach gebundenen Proteinen verhindert werden. Somit könnte auch nicht an den Präintegrationskomplex gebundenes fluoreszenzmarkiertes Vpr in der Struktur verbleiben und so zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal führen. Auch die (deutliche) Detektion von MA an intrazellulären Partikeln nach Inkubation der Zellen mit VSV-G pseudotypisierten Viren (McDonald *et al.*, 2002), kann ein Hinweis darauf sein, dass in dieser Studie wie auch in (Campbell *et al.*, 2007), noch eine Gag-/MA-Hülle an den Viruspartikeln nach Fusion gebunden ist.

Durch die Gag-/MA-Hülle könnte eine bessere Detektion des Vpr-Fluoreszenzsignals gewährleistet sein, da auch nicht an den Präintegrationkomplex gebundenes Vpr am subviralen Partikel verbleibt. Dies bleibt spekulativ, da in diesen Veröffentlichungen keine Daten über Proteinzusammensetzung der Viruspartikel (z.B. mittels Westernblot) zu finden sind bzw. kein fluoreszenzmarkiertes Matrixprotein verwendet wurde.

Diese Ausführungen machen deutlich, wie wichtig das genaue Verständnis des zeitlichen Ablaufs der Fusion unter Wildtyp-Bedingungen auch für die Interpretation bisher gewonnener Daten ist. Daher ist es notwendig, mit weiteren Markierungsstrategien die Viruspartikel so zu markieren, dass die Fluorophore keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp hervorrufen.

9.6 Alternative Fluoreszenzmarkierungen für HI-Viruspartikel

Seit Beginn meiner Doktorarbeit wurden in zwei Veröffentlichungen virale Komponenten fluoreszenzmarkiert, die auch als potentielle Marker für den subviralen Komplex in unserem System tauglich schienen. Es gelang die Markierung der HIV-Integrase mittels eines Cystein-Tags (FlasH-System) (Arhel *et al.*, 2006) und erst kürzlich die Markierung der RNA des Poliovirus mit Syto82 (Brandenburg *et al.*, 2007). Ob sich auch die HIV-RNA mit Syto82 markieren lässt, wurde bisher noch nicht experimentell untersucht.

Die fluoreszenzmarkierte Integrase konnte in (Arhel *et al.*, 2006) mittels Spinning Disk Mikroskopie über mehrer z-Stapel, die die gesamte Zelle umfassten, verfolgt werden. Dies steht in Diskrepanz zu den bisher von uns erzielten Ergebnissen, bei denen die mit FlasH-Tag Integrase markierten Partikel nur schwach zu erkennen waren und schnell ausbleichen, so dass entweder in unseren Händen die Fluoreszenzmarkierung nicht optimal abläuft bzw. in der Publikation keine einzelnen subviralen Partikel verfolgt wurden (persönliche Kommunikation mit Manon Eckhardt). In der Studie von Arhel und Kollegen wurden keine Experimente gezeigt, die nachweisen, dass es sich bei den beobachteten Signalen um einzelne Viruspartikel handelt. So wurden keine Experimente zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten der Viren in Puffer (siehe in dieser Arbeit 8.5.4) durchgeführt, um die Fluoreszenzintensität einzelner Viruspartikel zu bestimmen und mit den intrazellulären Signalen zu vergleichen. In den aufgeführten Experimenten in Arhel *et al.* wurden VSV-G pseudotypisierte Viren verwendet; es wurden jedoch keine Kontrollen durchgeführt, ob die beobachteten Signale (ein oder mehrere) Viruspartikel in einem Endosom sind, oder ob ein einzelnes subvirales Partikel im Zytosol nach erfolgter Fusion verfolgt wird. Daher können keine endgültigen Schlüsse gezogen werden, ob die Markierungseffizienz in Arhel *et al.* höher ist als in unseren Experimenten oder in der Veröffentlichung (zum Teil) nicht relevante Signale analysiert wurden.

Aufgrund der negativen Vorexperimente mit einer fluoreszenzmarkierten Integrase als subviralem Marker und des grundsätzlich größeren Aufwands für die folgende Charakterisierung eines solchen Markers, wurde zunächst versucht, eine zuverlässige Fluoreszenzmarkierung der Lipidmembran des Virus zu etablieren.

Eine fluoreszenzmarkierte Lipidmembran des Virus in Kombination mit XFP.Vpr (X steht hier für ein beliebiges Fluorophor: eGFP, CFP, YFP, mCherry, mRFP1 etc.) würde Eintrittsstudien unabhängig von der Stabilität der Gag-/MA-Hülle erlauben. Daher würde es die Etablierung einer Membranmarkierung ermöglichen, erste Fusionsexperimente mit XFP.Vpr als subviralem Marker durchzuführen.

Die Markierung der Lipidmembran des HI-Virus kann auf den in (8.12) dargestellten Wegen erfolgen. Hervorzuheben ist die gute Doppelmarkierungseffizienz bei mit GM1-Bodipy markierten Viruspartikeln. Allerdings scheint GM1-Bodipy nur begrenzt stabil in die Membran zu inserieren und wird somit auch fusionsunabhängig auf andere Membranen übertragen. Abschließende Experimente hierzu werden derzeit von Peter Koch durchgeführt.

Alternativ wurde der AGT-Tag über einen GPI-Linker auf die Außenseite der Plasmamembran der Produzentenzelle dirigiert und so beim Knospungsprozess in das Virion eingebaut. Die Markierung von aufgereinigten Viren mit einem für den AGT-Tag spezifischen fluoreszenzmarkierten Substrat gelang mit bis zu 40 %iger Markierungseffizienz (8.12). Da hier nur das schwache Fluorophor Fluorescein verwendet wurde, waren lange Belichtungszeiten notwendig und konnten wahrscheinlich nicht alle das AGT-Tag tragende Viruspartikel identifiziert werden. In weiteren Experimenten ist es notwendig, die Doppelmarkierungsrate anzuheben und den Einfluss des Markierungsprozesses auf die Infektiosität und Fusionseffizienz des Virus zu adressieren.

Um eine gleichmäßige Markierung der Viruspartikel zu erreichen, könnte es notwendig werden, eine stabil-transfizierte Zelllinie, die das GPI-AGT-Fusionsprotein exprimiert, herzustellen. Damit könnte eine homogenere Verteilung des Fusionsproteins auf der Zelloberfläche und damit auch auf den von diesen Zellen produzierten Viruspartikeln erreicht werden. Durch Verwendung anderer Fluorophore sollte es möglich sein, die Helligkeit der Partikel deutlich anzuheben. Bei Auswahl eines Fluorophors mit Emission im nahen Infrarotbereich wäre es möglich, Dreifarben-Viruspartikel herzustellen. Dieser experimentelle Ansatz setzt voraus, dass das GPI-AGT-Fusionsprotein gleichmäßig in alle Viren integriert wird. Gäbe es zwei Populationen von Viren, die sich z.B. in ihrer Lipidzusammensetzung unterscheiden, so kann es möglich sein, dass nur eine Subpopulation mit diesem Fusionsprotein markierbar wäre, da GPI-Fusionsproteine in bestimmten Mikrodomänen der Plasmamembran (sog. *Lipid rafts*) lokalisieren sollen (Sharom und Lehto, 2002).

Wäre es möglich, eine homogene Färbung funktioneller Viruspartikel (>80 %) zu erzielen, bliebe die Signalstärke der Lipidmarkierung allerdings zu schwach für Lebendzelleexperimente, so könnten dennoch Erkenntnisse über den Verbleib des MA-Proteins nach der Fusion gewonnen werden. Hierzu könnten Zellen mit VSV-G pseudotypierten Viruspartikeln, die eine Lipidmarkierung mit einem Fluorophor mit Emission im nahen Infrarot, MA-mCherry und eGFP.Vpr tragen, inkubiert und diese zu bestimmten Zeitpunkten fixiert werden. Anschließend könnten fusionierte Partikel durch den Verlust der Lipidmarkierung identifiziert und die Anzahl der MA- und Vpr-markierten

Viruspartikel ausgewertet werden. In weiteren Experimenten müsste während der Virusproduktion ein Proteaseinhibitor zugesetzt werden, um die Gag-Prozessierung unabhängig von den Fluoreszenzmarkern verändern zu können. Ist das Gag-Polyprotein nahezu unprozessiert, so sollten alle Partikel nach Fusion (angezeigt über den Verlust des Lipidmarkers) noch eine MA- und Vpr-Markierung zeigen und mit steigender Prozessierung des Gag-Polyproteins die Zahl der MA- und Vpr-fluoreszenzmarkierten Partikel zugunsten der nur mit Vpr-markierten Partikel abnehmen. Werden keine nur mit Vpr-markierten Partikel detektiert, so kann dies als indirekter Hinweis darauf gewertet werden, dass ohne umschließende Matrixhülle zu viele XFP.Vpr-Moleküle vom Präintegrationskomplex abdiffundieren, um eine zuverlässige Detektion sicherzustellen. Bei Verzicht auf eine XFP.Vpr-Markierung der Viruspartikel sollten bei vollständiger Gag-Prozessierung keine oder nur eine geringe Anzahl an MA-Signalen im Zytosol ohne Lipidmarkierung zu detektieren sein. Ist dies der Fall, so kann davon ausgegangen werden, dass die MA-Hülle, die nicht durch XFP.Vpr oder ähnliches artifiziell stabilisiert wurde, zum Zeitpunkt der Fusion oder kurz danach abfällt. Dies direkt zu zeigen, wäre allerdings nur in Lebendzelleexperimenten in Echtzeit möglich.

Eine weitere Möglichkeit eine Fluoreszenzmarkierung an der Membran zu erzielen, wäre die Verwendung des mit YFP-fluoreszenzmarkierten Hüllproteins des Murinen-Leukämie-Virus (Lehmann *et al.*, 2005) zur Pseudotypisierung von mit mCherry.Vpr markierten HI-Viren. Diese Pseudotypen wurden bereits für initiale Lebendzelleexperimente verwendet (persönliche Kommunikation mit Maik Lehmann und eigene Experimente). Dieses hochfusogene Hüllprotein vermittelt eine pH-unabhängige Fusion an der Plasmamembran und wird nach der Fusion Bestandteil dieser.

9.7 Entwicklung einer Tracking-Software zur Detektion von Viruspartikeln

Eine systematische Analyse des Bewegungsverhaltens und der Fluoreszenzintensität der Viruspartikel, setzt, wie in (8.8) dargelegt, die Kenntnisse der Trajektorien voraus. Da die manuelle Erstellung der Trajektorien praktisch nicht zu bewältigen war, wurde die Entwicklung einer Tracking-Software in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Karl Rohr durchgeführt. Ziel war es, Viruspartikel mit ihrem komplexen Bewegungsverhalten zuverlässig in zellulärer Umgebung verfolgen zu können und gleichzeitig Informationen über die Partikelhelligkeit aufzuzeichnen (8.13).

Die Entwicklung der Software erfolgte in Zyklen kontinuierlicher Verbesserung der Algorithmen und Überprüfung der Trackinggenauigkeit mit simulierten und realen Viruspartikeln. Dabei wurde die Tracking-Effizienz kontinuierlich gesteigert.

Die Auswertung der Virus-Zell-Interaktionen wurde zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Softwareentwicklung begonnen. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurde ein schneller und zuverlässiger Algorithmus ausgewählt und danach beibehalten (SEF+GNN, 8.13.2). In der Zwischenzeit wurden bessere Algorithmen entwickelt, so dass für zukünftige Arbeiten ein Wechsel des verwendeten Algorithmus sinnvoll wäre (8.13.2.1).

Insbesondere der neu entwickelte IPF (*Independent Particle Filter*) war den anderen Algorithmen überlegen (8.13.2.4). Wahrscheinlich würde er eine deutlich bessere Leistung im Vergleich mit den anderen Algorithmen erreichen, wenn eine höhere Anzahl schneller Bewegungen (z.B. Motorprotein-getriebener Transport von Viren) in den Testsequenzen vorhanden gewesen wäre, da in der korrekten Verfolgung von Partikeln mit unterschiedlichen und wechselnden Bewegungsmuster die Stärke dieses Algorithmus liegt. Für die Auswertung von partikulären Signalen in Zellen ist die entwickelte Software ein großer Fortschritt, der die vergleichende und schnelle Analyse von komplexen Partikelbewegungen in Zellen auf objektiver Basis erlaubt.

In Zukunft ist die Automatisierung der Auswertung der Bewegungsmuster der Trajektorien geplant. Hierbei würden längerer Trajektorien durch automatische Segmentierung in Sub-Trajektorien aufgeteilt. Die Analyse des Bewegungsverhaltens in diesen Subtrajektorien mittels des mittleren Verschiebungsquadrats würde detaillierte Erkenntnisse über das Bewegungsverhalten der Partikel erlauben. Verwendet werden könnte eine modifizierte Variante der in (Helmuth *et al.*, 2007) dargestellten Methode, die auf neuronalen Netzwerken basiert, und daher mit Beispielen trainiert werden muss. Erfolgt die Auswahl der Beispiele nicht sorgfältig genug oder mit einem unbewussten Schwerpunkt auf bestimmten Bewegungsmustern, kann dies die ganze Analyse beeinflussen. Daher sollten auch noch Alternativen untersucht werden, bei denen die Analyseprozedur auf deterministischen Algorithmen beruht und somit für den Benutzer im Prinzip nachvollziehbar ist.

Von großer Bedeutung wäre weiterhin die automatische Detektion von Farbseparationsereignissen. Hierzu ist es allerdings unabdingbar, dass objektive Kriterien für eine Fusion aus einer größeren Anzahl von manuell oder semi-automatisch gefundenen Ereignissen zur Definition dieser Kriterien zur Verfügung stehen. Dies ist – wie oben geschildert – derzeit nicht gegeben.

Da in der Praxis keine 100 %ige Trackinggenauigkeit erreicht werden kann, wird es immer falsch positive Ereignisse in einer automatischen Auswertung geben, die manuell aussortiert werden müssen. Um dies auch für eine große Anzahl an Trajektorien zügig durchführen zu können, ist die Gestaltung der Benutzerschnittstelle entsprechend anzupassen, z.B. sind automatisch ermittelte Trajektorien mit einer potentiellen Farbseparierung entsprechend hervorgehoben zu präsentieren. Weiterhin sind alle relevanten Informationen so zu präsentieren, dass eine Entscheidung des Benutzers innerhalb kürzester Zeit stattfinden kann.

9.8 Liposomen als kontrolliertes *in vitro* Fusionssystem

Bei der Lebendzellmikroskopie wird eine komplexe Interaktion zwischen Virus und Zelle beobachtet, an der nicht nur die Rezeptoren CD4 und CXCR4 bzw. CCR5 beteiligt sind, sondern auch andere zelluläre Proteine, Lipide und Zucker (wie z.B. Heparansulfat), die Einfluss auf den Ablauf der Fusionsreaktion nehmen. Ein wesentlich definierteres und leichter kontrollierbares *in vitro* System auf Basis von Liposomen würde die gezielte Manipulation einzelner Komponenten (wie z.B. die Lipidzusammensetzung) und die Analyse ihres Effekts auf die Fusionsreaktion erlauben. Die Rekonstitution von Proteinen mit Transmembrandomänen in Liposomen ist relativ anspruchsvoll. Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit angestrebt, ein vereinfachtes liposomenbasiertes System zur Fusion von HI-Viren zu etablieren. Hierzu wurde die Fusion zwischen VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln und GUVs (*Giant Unilamellar Vesicles*), die phosphatidylserinhaltige Lipide enthalten, untersucht. GUVs wurden gewählt, da diese aufgrund ihrer Größe und Membrankrümmung Zellen sehr ähnlich und der Lichtmikroskopie zugänglich sind. Außerdem können mit GUVs eine Reihe von Membranmodifikationen bis hin zu Phasentrennung von Lipiden untersucht werden (Bacia *et al.*, 2006; Bacia *et al.*, 2004b; Bacia *et al.*, 2005; Chiantia *et al.*, 2006; Kahya *et al.*, 2005a; Kahya *et al.*, 2004; Kahya *et al.*, 2005b; Kahya und Schwille, 2006; Kim *et al.*, 2007; Kohl und Schwille, 2005). Um die Fusion auch bei geringer Fusionsrate detektieren zu können, wurde die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie zur Detektion der Prozesse an der Membran und der Post-Fusionspartikel im Lumen der GUVs ausgewählt. Zuerst wurde experimentell gezeigt, dass es mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) möglich war, die Größe der Viruspartikel korrekt zu bestimmen (8.14.1). Mit konfokaler Mikroskopie konnte die Spezifität der Virusbindung für phosphatidylserinhaltige Lipide gezeigt werden (8.14.2). Das Detektionslimit von FCS liegt im nanomolaren Bereich (Kim *et al.*, 2007; Kim und Schwille, 2003). Rechnerisch müsste es daher möglich sein, dass bei Fusion von 10 Viruspartikeln mit

einem GUV mit einem Durchmesser von 24 μm eine detektierbare Konzentration (10 nmol/l) an Matrixmolekülen erreicht wird unter Annahme, dass in die Matrixhülle jeweils 1.000 MA.eGFP-Moleküle inkorporiert sind und diese bei Fusion komplett in Monomere zerfällt. Bei der Detektion von subviralen Partikeln (oder bei stabilisierten Gag-/MA-Hüllen) würden nur Partikel mit hoher Fluorophordichte im GUV-Lumen erwartet, die zu Photonenschüben in der Detektionseinheit führen sollten. Tatsächlich konnten Photonenschübe, aber keine diffuse Verteilung von Fluorophoren nachgewiesen werden. Allerdings traten diese Signale oft in Konjugation mit Signalen von Lipidmembranen auf, so dass davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um Einstülpungen der mit Viren bedeckten Lipidmembran in das GUV-Lumen handelte, die sich abschnürten und danach im Lumen diffundierten (8.14.3). In einer Messung konnten Photonenschübe von eGFP.Vpr detektiert werden, die nicht mit Membranbestandteilen kolokalisierten (8.14.3). Allerdings konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert werden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine nicht detektierbare Fusion stattgefunden hat, wobei die Viruskomponenten nach der Fusion an der luminalen Seite der Lipidmembran aufgrund der unphysiologisch niedrigen Ionenstärke im GUV-Lumen anhafteten. Die mittels FCS detektierten Prozesse an der Lipidmembran eines GUVs können aufgrund der räumlichen Ausdehnung des Konfokalkolumens nicht der Außen- oder Innenseite zugeordnet werden. Daher war es notwendig, einen alternativen Assay zu verwenden. Hierzu wurden R18-Dequenching-Experimente mit GUVs und SUVs (*Small Unilamellar Vesicles*) im Fluoreszenzspektrometer durchgeführt.

Um die Fusion von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln und Liposomen im Fluoreszenzspektrometer detektieren zu können, wurde die Lipidmembran des Virus mit R18 markiert. Bei der Fusion von R18 markierten Viruspartikeln (meist VSV) mit kleinen Liposomen (SUVs) kommt es zu einer detektierbaren Fluoreszenzsteigerung aufgrund von Dequenching (Blumenthal *et al.*, 1987; Matlin *et al.*, 1982; Schlegel *et al.*, 1982; Schlegel *et al.*, 1983). Bei Experimenten mit VSV-G pseudotypisierten R18-markierten HI-Viruspartikeln und SUVs (Durchmesser $<50\text{ nm}$) konnte eine pH-abhängige Fusion gezeigt werden, der Effekt war jedoch von der Lipidkonzentration abhängig (8.14.4). Wurden die SUVs durch GUVs ersetzt, konnte keine Fusion nachgewiesen werden (8.14.5). Dies könnte allerdings auch an einer drastisch reduzierten Fusionsrate zwischen den Viren und den schwächer gekrümmten GUVs liegen. Der genaue Einfluss der Membrankrümmung auf die Fusionseffizienz konnte nicht quantitativ bestimmt werden. In Zukunft könnte dies durch eine Messreihe mit exakter Bestimmung der eingesetzten Lipidmengen (z.B. über den Einbau

radioaktiv-markierter Lipide) und einer Größenbestimmung der Liposomen mittels Lichtstreuung genauer untersucht werden. In der Literatur gibt es einige Untersuchungen zur Abhängigkeit der Fusion von der Vesikelgröße, wobei beobachtet wurde, dass mit steigender Vesikelgröße die Fusionsrate zwischen den untersuchten SUVs und LUVs drastisch abnimmt (Arnhold *et al.*, 1994; de Arcuri *et al.*, 1999). Steigt die Größe der Liposomen über 100 nm, so nimmt die Fusionsrate der über Glycerinaldehyd-3-phosphatase (GAPDH) bzw. über Lysozym vermittelten Fusion deutlich ab (de Arcuri *et al.*, 1999). Ebenso wurde bei Rezeptor-unabhängiger, Polyethylenglykol (PEG)-vermittelter Fusion eine Abnahme der Fusionsrate mit sinkender Membrankrümmung festgestellt (Arnhold *et al.*, 1994; Haque *et al.*, 2001). In dem von uns verwendeten System ist eine nicht Rezeptor-vermittelte Fusion unwahrscheinlich, da weder PEG noch Kalziumionen in der Pufferlösungen vorhanden waren, die zu einer Rezeptor-unabhängigen Fusion von Liposomen notwendig sind (Arnhold *et al.*, 1994; Holland *et al.*, 1996).

In den durchgeführten Experimenten wurde ein unspezifischer Übertrag von R18 auf Liposomenmembranen auch unter nicht fusogenen Bedingungen beobachtet. In Veröffentlichungen ist die Meinung hierzu nicht eindeutig; einige Gruppen beobachten keinen unspezifischen Fluorophorübertrag (Arbuzova *et al.*, 1994; Blumenthal *et al.*, 1987; Hoekstra *et al.*, 1984), andere jedoch schon (Stegmann *et al.*, 1993; Wunderli-Allenspach *et al.*, 1993). In den erwähnten Studien wurde hauptsächlich mit VSV gearbeitet. Die Lipidzusammensetzung der dort verwendeten Viruspartikel könnte von der HIV-Lipidzusammensetzung (Brugger *et al.*, 2006) abweichen, so dass ein Austausch von R18 für HIV-Partikel im Gegensatz zu VSV-Partikeln begünstigt werden könnte.

Die Etablierung eines *in vitro* Fusionssystems auf GUV-Basis gelang aufgrund der geringen Fusionseffizienz zwischen VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln und GUVs nicht, da in unabhängigen Messreihen sowohl mit FCS als auch mit Fluoreszenzdequenching keine Fusion detektiert werden konnte. Für zukünftige Experimente zur Optimierung des *in vitro* Fusionssystems würden sich Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 400 nm (LUVs, *large unilamellar vesicles*) anbieten, da diese eine Fusion mit VSV-G pseudotypisierten, R18-fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln erlauben (persönliche Kommunikation mit Maier Lorizate) und eine geringere, der eukaryotischen Zelle ähnlichere Membrankurvatur aufweisen als SUVs.

9.9 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden zweifarbig fluoreszenzmarkierte Viruspartikel hergestellt und diese mit mikroskopischen, biochemischen und virologischen Methoden charakterisiert. Mit diesen fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln war es erstmals möglich, die Interaktion von HI-Viren mit der Plasmamembran von Zielzellen in Echtzeit zu beobachten und damit Informationen über die Häufigkeit der Kontakte bzw. deren Dauer zu gewinnen. Die mittels Einzelpartikelstudien erhobenen Daten zur Virusimmobilisierung konnten mit klassischen Ensemblemessungen korreliert werden und zeigten, dass die Einzelpartikelmessungen das Ensembleverhalten gut beschreiben. Im Gegensatz zu Ensemblemessungen, die eine Synchronisation von dynamischen Ereignissen erfordern, können Einzelpartikelmessungen genutzt werden, um Prozesse zu untersuchen, die nicht oder nur unter artifiziellen Bedingungen synchronisiert werden können. Hierzu zählt die Fusion von HI-Viren mit der Zielzelle, die bisher nicht mittels Fluoreszenzmikroskopie kinetisch untersucht wurde. Ein Farbtrennungseignis eines VSV-G pseudotypisierten Viruspartikels konnte beobachtet werden. Die Zahl der beobachteten Farbtrennungseignisse blieb deutlich hinter den Erwartungen zurück, obwohl eine fusionsabhängige Farbtrennung im Ensemble mikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Der Grund für Schwierigkeiten bei der Detektion von Farbtrennungseignissen auf Einzelpartikelebene könnte in der Stabilisierung der Matrixhülle durch den zweiten Fluoreszenzmarker, das fluoreszenzmarkierte Vpr, begründet sein. Möglichkeiten für alternative Markierungsstrategien wurden untersucht und zukünftige Experimente aufgezeigt. Außer einer Membranmarkierung mittels eines GPI-AGT-Fusionsproteins dürfte die Verwendung von mit YFP-markierten MLV-Hüllproteinen pseudotypisierten HI-Viruspartikeln (Vorexperimente durchgeführt von Maik Lehmann) eine tragfähige Strategie für die Zukunft darstellen. Durch die Entwicklung einer Tracking-Software in Zusammenarbeit mit der Gruppe um Prof. Dr. Rohr (Biomedical Computer Vision Gruppe, IPMB, Abteilung Bioinformatik & Funktionelle Genomik, Universität Heidelberg) wurde die Grundlage für eine umfassende quantitative und automatisierte Auswertung von Einzelpartikel-Experimenten geschaffen, so dass auch seltene Ereignisse aus umfangreichen Experimentreihen rasch und objektiv ausgewertet werden können. Mit der Tracking-Software wird in Zukunft die Analyse von transienten Interaktionen der Viruspartikel mit der Zellmembran (z.B. die Bestimmung der Kontaktzeiten; siehe 8.7.3) oder die Charakterisierung des intrazellulären Transports von subviralen Partikeln möglich. Die an diesen Prozessen beteiligten zellulären und viralen Proteine können studiert werden.

Die Etablierung eines Fusionssystems zwischen Liposomen in Zellgröße (GUVs) und VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln konnte nicht vollständig umgesetzt werden, da keine Fusion detektiert werden konnte. Auf der Basis von Liposomen mit ca. 400 nm Durchmesser (LUVs) sollte es es möglich sein, die experimentellen Bedingungen für eine effektive Virusfusion soweit zu optimieren, dass anschließend mit LUVs (oder sogar mit GUVs) *in vitro* Studien, z.B. zum Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Fusionsrate, durchführbar sind.

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Charakterisierung fluoreszierender HI-Derivate zur Untersuchung der Virus-Zell-Interaktion und den sich daraus ergebenden Optimierungsmöglichkeiten sollte eine quantitative Einzelpartikelanalyse von Viren in Bindungs- und Fusionsstudien zukünftig möglich sein. Durch die Etablierung der hochsensitiven Lebendzellmikroskopie in Echtzeit mittels Weitfeld- und TIRF-Mikroskopie in der Abteilung sowie die Mitentwicklung einer geeigneten Tracking-Software wurden im Rahmen meiner Arbeit die Grundlagen zur Detektion und Analyse der Einzelpartikel-Zell-Interaktion geschaffen.

10 Literaturverzeichnis

- Accola MA, Bukovsky AA, Jones MS, Gottlinger HG.** 1999. A conserved dileucine-containing motif in p6(gag) governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV(mac) and SIV(agn). *J Virol* 73(12):9992-9.
- Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA.** 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59(2):284-91.
- Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR.** 2003. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol* 84(Pt 7):1649-61.
- Almeda J, Casabona J, Simon B, Gerard M, Rey D, Puro V, Thomas T.** 2004. Proposed recommendations for the management of HIV post-exposure prophylaxis after sexual, injecting drug or other exposures in Europe. *Euro Surveill* 9(6):35-40.
- Andersen KB, Nexø BA.** 1983. Entry of murine retrovirus into mouse fibroblasts. *Virology* 125(1):85-98.
- Angelova MI, Dimitrov DS.** 1986. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81:303-311.
- Arbuzova A, Korte T, Müller P, Herrmann A.** 1994. On the validity of lipid dequenching assays for estimating virus fusion kinetics. *Biochim Biophys Acta* 1190(2):360-6.
- Arhel N, Genovesio A, Kim KA, Miko S, Perret E, Olivo-Marin JC, Shorte S, Charneau P.** 2006. Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods* 3(10):817-24.
- Arnhold J, Wiegel D, Hussler O, Arnold K.** 1994. Quenching and dequenching of octadecyl Rhodamine B chloride fluorescence in Ca(2+)-induced fusion of phosphatidylserine vesicles: effects of poly(ethylene glycol). *Biochim Biophys Acta* 1191(2):375-83.
- Axelrod D.** 1989. Total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol* 30:245-70.
- Axelrod D.** 2003. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Methods Enzymol* 361:1-33.
- Axelrod D, Thompson NL, Burghardt TP.** 1983. Total internal reflection fluorescence microscopy. *J Microsc* 129(Pt 1):19-28.
- Ayyavoo V, Mahboubi A, Mahalingam S, Ramalingam R, Kudchodkar S, Williams WV, Green DR, Weiner DB.** 1997. HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B. *Nat Med* 3(10):1117-23.
- Bachand F, Yao XJ, Hrimech M, Rougeau N, Cohen EA.** 1999. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *J Biol Chem* 274(13):9083-91.
- Bacia K, Kim SA, Schwille P.** 2006. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat Methods* 3(2):83-9.
- Bacia K, Scherfeld D, Kahya N, Schwille P.** 2004a. Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophys J* 87(2):1034-43.
- Bacia K, Schuette CG, Kahya N, Jahn R, Schwille P.** 2004b. SNAREs prefer liquid-disordered over "raft" (liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles. *J Biol Chem* 279(36):37951-5.
- Bacia K, Schwille P.** 2003. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods* 29(1):74-85.
- Bacia K, Schwille P, Kurzchalia T.** 2005. Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(9):3272-7.
- Bahlmann K, Jakobs S, Hell SW.** 2001. 4Pi-confocal microscopy of live cells. *Ultramicroscopy* 87(3):155-64.
- Balog K, Minarovits J.** 2006. Nef: a pleiotropic modulator of primate lentivirus infectivity and pathogenesis. *Acta Microbiol Immunol Hung* 53(1):51-75.
- Baribaud F, Doms RW, Pohlmann S.** 2002. The role of DC-SIGN and DC-SIGNR in HIV and Ebola virus infection: can potential therapeutics block virus transmission and dissemination? *Expert Opin Ther Targets* 6(4):423-31.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM.** 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657-700.
- Billinton N, Knight AW.** 2001. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal Biochem* 291(2):175-97.
- Blumenthal R, Bali-Puri A, Walter A, Covell D, Eidelman O.** 1987. pH-dependent fusion of vesicular stomatitis virus with Vero cells. Measurement by dequenching of octadecyl rhodamine fluorescence. *J Biol Chem* 262(28):13614-9.
- Bohne J, Krausslich HG.** 2004. Mutation of the major 5' splice site renders a CMV-driven HIV-1 proviral clone Tat-dependent: connections between transcription and splicing. *FEBS Lett* 563(1-3):113-8.

- Brandenburg B, Lee LY, Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X, Hogle JM.** 2007. Imaging Poliovirus Entry in Live Cells. *PLoS Biol* 5(7):e183.
- Brandenburg B, Zhuang X.** 2007. Virus trafficking - learning from single-virus tracking. *Nat Rev Microbiol* 5(3):197-208.
- Brauchle C, Seisenberger G, Endress T, Ried MU, Buning H, Hallek M.** 2002. Single virus tracing: visualization of the infection pathway of a virus into a living cell. *Chemphyschem* 3(3):299-303.
- Briggs JA, Grunewald K, Glass B, Forster F, Krausslich HG, Fuller SD.** 2006. The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure* 14(1):15-20.
- Briggs JA, Simon MN, Gross I, Krausslich HG, Fuller SD, Vogt VM, Johnson MC.** 2004. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* 11(7):672-5.
- Briggs JA, Wilk T, Welker R, Krausslich HG, Fuller SD.** 2003. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo J* 22(7):1707-15.
- Brugger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, Krausslich HG.** 2006. The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8):2641-6.
- Bukrinsky M.** 2004. A hard way to the nucleus. *Mol Med* 10(1-6):1-5.
- Bukrinsky M, Adzubei A.** 1999. Viral protein R of HIV-1. *Rev Med Virol* 9(1):39-49.
- Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL, Pushkarskaya T, Tarpley WG, Stevenson M.** 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13):6125-9.
- Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC.** 1994a. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371(6492):37-43.
- Bullough PA, Hughson FM, Treharne AC, Ruigrok RW, Skehel JJ, Wiley DC.** 1994b. Crystals of a fragment of influenza haemagglutinin in the low pH induced conformation. *J Mol Biol* 236(4):1262-5.
- Campbell EM, Perez O, Melar M, Hope TJ.** 2007. Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell. *Virology* 360(2):286-93.
- Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY.** 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12):7877-82.
- Canki M, Thai JN, Chao W, Ghorpade A, Potash MJ, Volsky DJ.** 2001. Highly productive infection with pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) indicates no intracellular restrictions to HIV-1 replication in primary human astrocytes. *J Virol* 75(17):7925-33.
- Cantin R, Fortin JF, Lamontagne G, Tremblay M.** 1997. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J Virol* 71(3):1922-30.
- Carneiro FA, Bianconi ML, Weissmuller G, Stauffer F, Da Poian AT.** 2002. Membrane recognition by vesicular stomatitis virus involves enthalpy-driven protein-lipid interactions. *J Virol* 76(8):3756-64.
- Carneiro FA, Lapido-Loureiro PA, Cordo SM, Stauffer F, Weissmuller G, Bianconi ML, Juliano MA, Juliano L, Bisch PM, Da Poian AT.** 2006a. Probing the interaction between vesicular stomatitis virus and phosphatidylserine. *Eur Biophys J* 35(2):145-54.
- Carneiro FA, Stauffer F, Lima CS, Juliano MA, Juliano L, Da Poian AT.** 2003. Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation. *J Biol Chem* 278(16):13789-94.
- Carneiro FA, Vandebussche G, Juliano MA, Juliano L, Ruyschaert JM, Da Poian AT.** 2006b. Charged residues are involved in membrane fusion mediated by a hydrophilic peptide located in vesicular stomatitis virus G protein. *Mol Membr Biol* 23(5):396-406.
- Cavrois M, De Noronha C, Greene WC.** 2002. A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol* 20(11):1151-4.
- Cavrois M, Neidleman J, Bigos M, Greene WC.** 2004a. Fluorescence resonance energy transfer-based HIV-1 virion fusion assay. *Methods Mol Biol* 263:333-44.
- Cavrois M, Neidleman J, Yonemoto W, Fenard D, Greene WC.** 2004b. HIV-1 virion fusion assay: uncoating not required and no effect of Nef on fusion. *Virology* 328(1):36-44.
- Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89(2):263-73.
- Charneau P, Alizon M, Clavel F.** 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* 66(5):2814-20.
- Chiantia S, Kahya N, Ries J, Schwille P.** 2006. Effects of ceramide on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS. *Biophys J* 90(12):4500-8.
- Coil DA, Miller AD.** 2004. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J Virol* 78(20):10920-6.
- Colman PM, Lawrence MC.** 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(4):309-19.
- Connor RI, Chen BK, Choe S, Landau NR.** 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206(2):935-44.

- Conti L, Rainaldi G, Matarrese P, Varano B, Rivabene R, Columba S, Sato A, Belardelli F, Malorni W, Gessani S.** 1998. The HIV-1 vpr protein acts as a negative regulator of apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line: possible implications for the pathogenesis of AIDS. *J Exp Med* 187(3):403-13.
- Cronin J, Zhang XY, Reiser J.** 2005. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 5(4):387-98.
- Csucs G, Michel R, Lussi JW, Textor M, Danuser G.** 2003. Microcontact printing of novel co-polymers in combination with proteins for cell-biological applications. *Biomaterials* 24(10):1713-20.
- Cullen BR.** 2001. Journey to the center of the cell. *Cell* 105(6):697-700.
- Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Krausslich HG.** 2005. Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* 79(3):1581-94.
- Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A.** 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* 168(3):477-88.
- Davidovits P, Egger MD.** 1973. Photomicrography of corneal endothelial cells in vivo. *Nature* 244(5415):366-7.
- de Arcuri BF, Vechetti GF, Chehin RN, Goni FM, Morero RD.** 1999. Protein-induced fusion of phospholipid vesicles of heterogeneous sizes. *Biochem Biophys Res Commun* 262(3):586-90.
- de Noronha CM, Sherman MP, Lin HW, Cavrois MV, Moir RD, Goldman RD, Greene WC.** 2001. Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* 294(5544):1105-8.
- de Rocquigny H, Petitjean P, Tanchou V, Decimo D, Drouot L, Delaunay T, Darlix JL, Roques BP.** 1997. The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr. *J Biol Chem* 272(49):30753-9.
- Deneka M, Pelchen-Matthews A, Byland R, Ruiz-Mateos E, Marsh M.** 2007. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol* 177(2):329-41.
- Depienne C, Roques P, Creminon C, Fritsch L, Casseron R, Dormont D, Dargemont C, Benichou S.** 2000. Cellular distribution and karyophilic properties of matrix, integrase, and Vpr proteins from the human and simian immunodeficiency viruses. *Exp Cell Res* 260(2):387-95.
- Devesa F, Chams V, Dinadayala P, Stella A, Ragas A, Auboiroux H, Stegmann T, Poquet Y.** 2002. Functional reconstitution of the HIV receptors CCR5 and CD4 in liposomes. *Eur J Biochem* 269(21):5163-74.
- Di Marzio P, Choe S, Ebright M, Knoblauch R, Landau NR.** 1995. Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 69(12):7909-16.
- Dimitrov DS, Golding H, Blumenthal R.** 1991. Initial stages of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion monitored by a new assay based on redistribution of fluorescent dyes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 7(10):799-805.
- Dimitrov DS, Hillman K, Manischewitz J, Blumenthal R, Golding H.** 1992. Correlation between kinetics of soluble CD4 interactions with HIV-1-Env-expressing cells and inhibition of syncytia formation: implications for mechanisms of cell fusion and therapy for AIDS. *Aids* 6(3):249-56.
- Doms RW, Peiper SC.** 1997. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 235(2):179-90.
- Egger MD, Petran M.** 1967. New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. *Science* 157(786):305-7.
- Egner A, Hell SW.** 2005. Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections. *Trends Cell Biol* 15(4):207-15.
- Egner A, Verrier S, Goroshkov A, Soling HD, Hell SW.** 2004. 4Pi-microscopy of the Golgi apparatus in live mammalian cells. *J Struct Biol* 147(1):70-6.
- Emi N, Friedmann T, Yee JK.** 1991. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 65(3):1202-7.
- Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, Ahuja M, Turner JD, McKnight A, Thomas JF, Stoebenau-Haggarty B, Choe S, Vance PJ, Wells TN, Power CA, Sutterwala SS, Doms RW, Landau NR, Hoxie JA.** 1996. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 87(4):745-56.
- Este JA, Telenti A.** 2007. HIV entry inhibitors. *Lancet* 370(9581):81-8.
- Ewers H, Smith AE, Sbalzarini IF, Lilie H, Koumoutsakos P, Helenius A.** 2005. Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(42):15110-5.
- Fassati A, Goff SP.** 2001. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75(8):3626-35.

- Fassati A, Gorlich D, Harrison I, Zaytseva L, Mingot JM.** 2003. Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. *Embo J* 22(14):3675-85.
- Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, Gonda MA, Aldovini A, Debouk C, Gallo RC, et al.** 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 320(6060):367-71.
- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM.** 2004. Principles of virology. Washington, D.C.: ASM Press.
- Fortin JF, Cantin R, Lamontagne G, Tremblay M.** 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* 71(5):3588-96.
- Fouchier RA, Malim MH.** 1999. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv Virus Res* 52:275-99.
- Freed EO.** 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26(1-6):13-33.
- Freed EO, Martin MA.** 1995. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem* 270(41):23883-6.
- Frey S, Marsh M, Gunther S, Pelchen-Matthews A, Stephens P, Ortlepp S, Stegmann T.** 1995. Temperature dependence of cell-cell fusion induced by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 69(3):1462-72.
- Gallo SA, Clore GM, Louis JM, Bewley CA, Blumenthal R.** 2004. Temperature-dependent intermediates in HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion revealed by inhibitors that target N- and C-terminal helical regions of HIV-1 gp41. *Biochemistry* 43(25):8230-3.
- Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R.** 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 1614(1):36-50.
- Gallo SA, Puri A, Blumenthal R.** 2001. HIV-1 gp41 six-helix bundle formation occurs rapidly after the engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-mediated fusion process. *Biochemistry* 40(41):12231-6.
- Gallo SA, Reeves JD, Garg H, Foley B, Doms RW, Blumenthal R.** 2006. Kinetic studies of HIV-1 and HIV-2 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Retrovirology* 3:90.
- Geijtenbeek TB, van Kooyk Y.** 2003. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr Top Microbiol Immunol* 276:31-54.
- Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA.** 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156(1):171-6.
- Geyer M, Fackler OT, Peterlin BM.** 2001. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep* 2(7):580-5.
- William J. Godinez, Marko Lampe; Stefan Wörz, Barbara Müller, Roland Eils, Karl Rohr,** (2007), „Tracking of Virus Particles in Time Lapse Fluorescence Microscopy Image Sequences“, *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2007. ISBI 2007. 4th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, pp.256-259, 12-15 April 2007
- William J. Godinez, Marko Lampe; Stefan Wörz, Barbara Müller, Roland Eils, Karl Rohr** (2007), „Tracking of Virus Particles in Time-lapse Fluorescence Microscopy Image Sequences“, *Proc. Workshop Bildverarbeitung für die Medizin 2007 -- Algorithmen, Systeme, Anwendungen --*, München/Germany, Informatik aktuell, A. Horsch, H. Handels, H.-P. Meinzer, and T. Tolxdorff (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007, pp.6-10, March 25-27, 2007
- William J. Godinez, Marko Lampe; Stefan Wörz, Barbara Müller, Roland Eils, Karl Rohr** (2008), „Tracking of Virus Particles in Time-lapse Fluorescence Microscopy Image Sequences“, *Proc. Workshop Bildverarbeitung für die Medizin 2008 -- Algorithmen, Systeme, Anwendungen --*, München/Germany, Informatik aktuell, A. Horsch, H. Handels, H.-P. Meinzer, and T. Tolxdorff (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008, April 6-8, 2008 (*im Druck*)
- Golding H, Zaitseva M, de Rosny E, King LR, Manischewitz J, Sidorov I, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Dimitrov DS, Weiss CD.** 2002. Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates. *J Virol* 76(13):6780-90.
- Greber UF, Way M.** 2006. A superhighway to virus infection. *Cell* 124(4):741-54.
- Greenberg ME, Bronson S, Lock M, Neumann M, Pavlakis GN, Skowronski J.** 1997. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *Embo J* 16(23):6964-76.
- Gugel H, Bewersdorf J, Jakobs S, Engelhardt J, Storz R, Hell SW.** 2004. Cooperative 4Pi excitation and detection yields sevenfold sharper optical sections in live-cell microscopy. *Biophys J* 87(6):4146-52.
- Gummuluru S, Emerman M.** 1999. Cell cycle- and Vpr-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression in primary and transformed T-cell lines. *J Virol* 73(7):5422-30.
- Haller C, Rauch S, Michel N, Hannemann S, Lehmann MJ, Keppler OT, Fackler OT.** 2006. The HIV-1 pathogenicity factor Nef interferes with maturation of stimulatory T-lymphocyte contacts by modulation of N-Wasp activity. *J Biol Chem* 281(28):19618-30.

- Haque ME, McIntosh TJ, Lentz BR.** 2001. Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: "nature's own" fusogenic lipid bilayer. *Biochemistry* 40(14):4340-8.
- Haustein E, Schwille P.** 2004. Single-molecule spectroscopic methods. *Curr Opin Struct Biol* 14(5):531-40.
- Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M, Emerman M.** 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15):7311-5.
- Helmuth JA, Burckhardt CJ, Koumoutsakos P, Greber UF, Sbalzarini IF.** 2007. A novel supervised trajectory segmentation algorithm identifies distinct types of human adenovirus motion in host cells. *J Struct Biol* 159(3):347-58.
- Henderson HI, Hope TJ.** 2006. The temperature arrested intermediate of virus-cell fusion is a functional step in HIV infection. *Virology* 336:36.
- Hildreth JE, Orentas RJ.** 1989. Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation. *Science* 244(4908):1075-8.
- Hoekstra D, de Boer T, Klappe K, Wilschut J.** 1984. Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry* 23(24):5675-81.
- Holde KEv, Johnson WC, Ho PS, editors. 1998. *Principles of Physical Biochemistry*. Upper Saddle River: Prentice-Hall.
- Holland JW, Hui C, Cullis PR, Madden TD.** 1996. Poly(ethylene glycol)-lipid conjugates regulate the calcium-induced fusion of liposomes composed of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. *Biochemistry* 35(8):2618-24.
- Hrimech M, Yao XJ, Bachand F, Rougeau N, Cohen EA.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection. *J Virol* 73(5):4101-9.
- Ibrahim J, Griffin P, Coombe DR, Rider CC, James W.** 1999. Cell-surface heparan sulfate facilitates human immunodeficiency virus Type 1 entry into some cell lines but not primary lymphocytes. *Virus Res* 60(2):159-69.
- Ikezawa H.** 2002. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull* 25(4):409-17.
- Ikuta K, Suzuki S, Horikoshi H, Mukai T, Luftig RB.** 2000. Positive and negative aspects of the human immunodeficiency virus protease: development of inhibitors versus its role in AIDS pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4):725-45.
- Jameson DM, Croney JC, Moens PD.** 2003. Fluorescence: basic concepts, practical aspects, and some anecdotes. *Methods Enzymol* 360:1-43.
- Janeway CA, Travers P.** 1997. *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jenkins Y, McEntee M, Weis K, Greene WC.** 1998. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol* 143(4):875-85.
- Jenkins Y, Sanchez PV, Meyer BE, Malim MH.** 2001. Nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Vpr is not required for virion packaging. *J Virol* 75(17):8348-52.
- Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* 69(10):6304-13.
- Kahya N, Brown DA, Schwille P.** 2005a. Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry* 44(20):7479-89.
- Kahya N, Scherfeld D, Bacia K, Schwille P.** 2004. Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy. *J Struct Biol* 147(1):77-89.
- Kahya N, Scherfeld D, Schwille P.** 2005b. Differential lipid packing abilities and dynamics in giant unilamellar vesicles composed of short-chain saturated glycerol-phospholipids, sphingomyelin and cholesterol. *Chem Phys Lipids* 135(2):169-80.
- Kahya N, Schwille P.** 2006. Fluorescence correlation studies of lipid domains in model membranes. *Mol Membr Biol* 23(1):29-39.
- Kamata M, Aida Y.** 2000. Two putative alpha-helical domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr mediate nuclear localization by at least two mechanisms. *J Virol* 74(15):7179-86.
- Karni O, Friedler A, Zakai N, Gilon C, Loyer A.** 1998. A peptide derived from the N-terminal region of HIV-1 Vpr promotes nuclear import in permeabilized cells: elucidation of the NLS region of the Vpr. *FEBS Lett* 429(3):421-5.
- Keppler A, Arrivoli C, Sironi L, Ellenberg J.** 2006. Fluorophores for live cell imaging of AGT fusion proteins across the visible spectrum. *Biotechniques* 41(2):167-70, 172, 174-5.
- Keppler A, Pick H, Arrivoli C, Vogel H, Johnsson K.** 2004. Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(27):9955-9.
- Kim SA, Heinze KG, Schwille P.** 2007. Fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Nat Methods* 4(11):963-973.
- Kim SA, Heinze KG, Waxham MN, Schwille P.** 2004. Intracellular calmodulin availability accessed with two-photon cross-correlation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1):105-10.

- Kim SA, Schwille P.** 2003. Intracellular applications of fluorescence correlation spectroscopy: prospects for neuroscience. *Curr Opin Neurobiol* 13(5):583-90.
- Kliger Y, Gallo SA, Peisajovich SG, Munoz-Barroso I, Avkin S, Blumenthal R, Shai Y.** 2001. Mode of action of an antiviral peptide from HIV-1. Inhibition at a post-lipid mixing stage. *J Biol Chem* 276(2):1391-7.
- Kohl T, Schwille P.** 2005. Fluorescence correlation spectroscopy with autofluorescent proteins. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 95:107-42.
- Konig K.** 2000. Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc* 200(Pt 2):83-104.
- Kotsopoulou E, Kim VN, Kingsman AJ, Kingsman SM, Mitrophanous KA.** 2000. A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *J Virol* 74(10):4839-52.
- LaBranche CC, Hoffman TL, Romano J, Haggarty BS, Edwards TG, Matthews TJ, Doms RW, Hoxie JA.** 1999. Determinants of CD4 independence for a human immunodeficiency virus type 1 variant map outside regions required for coreceptor specificity. *J Virol* 73(12):10310-9.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X.** 2003. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16):9280-5.
- Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X.** 2004. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* 6(10):929-36.
- Lampe M, Briggs JA, Endress T, Glass B, Riegelsberger S, Krausslich HG, Lamb DC, Brauchle C, Muller B.** 2007. Double-labelled HIV-1 particles for study of virus-cell interaction. *Virology* 360(1):92-104.
- Landau NR, Littman DR.** 1992. Packaging system for rapid production of murine leukemia virus vectors with variable tropism. *J Virol* 66(8):5110-3.
- Le Rouzic E, Benichou S.** 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2:11.
- Lehmann MJ, Sherer NM, Marks CB, Pypaert M, Mothes W.** 2005. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol* 170(2):317-25.
- Leonard JT, Roy K.** 2006. The HIV entry inhibitors revisited. *Curr Med Chem* 13(8):911-34.
- Lineberger JE, Danzeisen R, Hazuda DJ, Simon AJ, Miller MD.** 2002. Altering expression levels of human immunodeficiency virus type 1 gp120-gp41 affects efficiency but not kinetics of cell-cell fusion. *J Virol* 76(7):3522-33.
- Lippincott-Schwartz J, Patterson GH.** 2003. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300(5616):87-91.
- Liu H, Wu X, Xiao H, Kappes JC.** 1999. Targeting human immunodeficiency virus (HIV) type 2 integrase protein into HIV type 1. *J Virol* 73(10):8831-6.
- Lu YL, Spearman P, Ratner L.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* 67(11):6542-50.
- Luby-Phelps K, Castle PE, Taylor DL, Lanni F.** 1987. Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(14):4910-3.
- Luby-Phelps K, Taylor DL, Lanni F.** 1986. Probing the structure of cytoplasm. *J Cell Biol* 102(6):2015-22.
- Mahalingam S, Ayyavoo V, Patel M, Kieber-Emmons T, Weiner DB.** 1997. Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 71(9):6339-47.
- Marechal V, Clavel F, Heard JM, Schwartz O.** 1998. Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72(3):2208-12.
- Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, Munk C, Nymark-McMahon H, Landau NR.** 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114(1):21-31.
- Markosyan RM, Cohen FS, Melikyan GB.** 2005. Time-resolved imaging of HIV-1 Env-mediated lipid and content mixing between a single virion and cell membrane. *Mol Biol Cell* 16(12):5502-13.
- Matlin KS, Reggio H, Helenius A, Simons K.** 1982. Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J Mol Biol* 156(3):609-31.
- McClure MO, Sommerfelt MA, Marsh M, Weiss RA.** 1990. The pH independence of mammalian retrovirus infection. *J Gen Virol* 71 (Pt 4):767-73.
- McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, Hope TJ.** 2002. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159(3):441-52.
- McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ.** 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300(5623):1295-7.
- Meier O, Gastaldelli M, Boucke K, Hemmi S, Greber UF.** 2005. Early steps of clathrin-mediated endocytosis involved in phagosomal escape of Fcγ receptor-targeted adenovirus. *J Virol* 79(4):2604-13.

- Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM, Cohen FS.** 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* 151(2):413-23.
- Miller MD, Farnet CM, Bushman FD.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71(7):5382-90.
- Mondor I, Ugolini S, Sattentau QJ.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol* 72(5):3623-34.
- Morita E, Sundquist WI.** 2004. Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:395-425.
- Moulard M, Lortat-Jacob H, Mondor I, Roca G, Wyatt R, Sodroski J, Zhao L, Olson W, Kwong PD, Sattentau QJ.** 2000. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* 74(4):1948-60.
- Muller B, Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Zentgraf H, Krausslich HG.** 2004. Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. *J Virol* 78(19):10803-13.
- Muller B, Tessmer U, Schubert U, Krausslich HG.** 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J Virol* 74(20):9727-31.
- Munk C, Brandt SM, Lucero G, Landau NR.** 2002. A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21):13843-8.
- Munoz-Barroso I, Durell S, Sakaguchi K, Appella E, Blumenthal R.** 1998. Dilution of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41. *J Cell Biol* 140(2):315-23.
- Nakano MY, Boucke K, Suomalainen M, Stidwill RP, Greber UF.** 2000. The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J Virol* 74(15):7085-95.
- Nakano MY, Greber UF.** 2000. Quantitative microscopy of fluorescent adenovirus entry. *J Struct Biol* 129(1):57-68.
- Neil SJ, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD.** 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2(5):e39.
- Nermut MV, Fassati A.** 2003. Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes. *J Virol* 77(15):8196-206.
- Ohshiro Y, Murakami T, Matsuda K, Nishioka K, Yoshida K, Yamamoto N.** 1996. Role of cell surface glycosaminoglycans of human T cells in human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection. *Microbiol Immunol* 40(11):827-35.
- Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, Gendelman HE.** 1988. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol* 62(8):2578-86.
- Padow M, Lai L, Deivanayagam C, DeLucas LJ, Weiss RB, Dunn DM, Wu X, Kappes JC.** 2003. Replication of chimeric human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) containing HIV-2 integrase (IN): naturally selected mutations in IN augment DNA synthesis. *J Virol* 77(20):11050-9.
- Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD.** 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338(13):853-60.
- Palm GJ, Wlodawer A.** 1999. Spectral variants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol* 302:378-94.
- Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, Kain SR, Piston DW.** 1997. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 73(5):2782-90.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D.** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18):8392-6.
- Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M.** 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162(3):443-55.
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A.** 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3(5):473-83.
- Pelkmans L, Puntener D, Helenius A.** 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296(5567):535-9.
- Perez-Caballero D, Hatzioannou T, Martin-Serrano J, Bieniasz PD.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1 matrix inhibits and confers cooperativity on gag precursor-membrane interactions. *J Virol* 78(17):9560-3.
- Planelles V, Jowett JB, Li QX, Xie Y, Hahn B, Chen IS.** 1996. Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *J Virol* 70(4):2516-24.
- Platt EJ, Durnin JP, Kabat D.** 2005. Kinetic factors control efficiencies of cell entry, efficacies of entry inhibitors, and mechanisms of adaptation of human immunodeficiency virus. *J Virol* 79(7):4347-56.

- Platt EJ, Wehrly K, Kuhmann SE, Chesebro B, Kabat D.** 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72(4):2855-64.
- Poon B, Grovit-Ferbas K, Stewart SA, Chen IS.** 1998. Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents. *Science* 281(5374):266-9.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ.** 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2):229-33.
- Prendergast A, Tudor-Williams G, Jeena P, Burchett S, Goulder P.** 2007. International perspectives, progress, and future challenges of paediatric HIV infection. *Lancet* 370(9581):68-80.
- Puri A, Grimaldi S, Blumenthal R.** 1992. Role of viral envelope sialic acid in membrane fusion mediated by the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* 31(41):10108-13.
- Puri A, Winick J, Lowy RJ, Covell D, Eidelman O, Walter A, Blumenthal R.** 1988. Activation of vesicular stomatitis virus fusion with cells by pretreatment at low pH. *J Biol Chem* 263(10):4749-53.
- Raviv Y, Viard M, Bess J, Jr., Blumenthal R.** 2002. Quantitative measurement of fusion of HIV-1 and SIV with cultured cells using photosensitized labeling. *Virology* 293(2):243-51.
- Roumier T, Vieira HL, Castedo M, Ferri KF, Boya P, Andreau K, Druillennec S, Joza N, Penninger JM, Roques B, Kroemer G.** 2002. The C-terminal moiety of HIV-1 Vpr induces cell death via a caspase-independent mitochondrial pathway. *Cell Death Differ* 9(11):1212-9.
- Roux KH, Taylor KA.** 2007. AIDS virus envelope spike structure. *Curr Opin Struct Biol* 17(2):244-52.
- Rucker J, Doranz BJ, Edinger AL, Long D, Berson JF, Doms RW.** 1997. Cell-cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Methods Enzymol* 288:118-33.
- Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X.** 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol* 11(6):567-73.
- Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF.** 2006. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30):11364-9.
- Sako Y, Uyemura T.** 2002. Total internal reflection fluorescence microscopy for single-molecule imaging in living cells. *Cell Struct Funct* 27(5):357-65.
- Schaeffer E, Soros VB, Greene WC.** 2004. Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes. *J Virol* 78(3):1375-83.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO.** 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97(5):695-710.
- Schindler M, Munch J, Kutsch O, Li H, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Muller-Trutwin MC, Novembre FJ, Peeters M, Courgnaud V, Bailes E, Roques P, Sodora DL, Silvestri G, Sharp PM, Hahn BH, Kirchhoff F.** 2006. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell* 125(6):1055-67.
- Schlegel R, Dickson RB, Willingham MC, Pastan IH.** 1982. Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(7):2291-5.
- Schlegel R, Tralka TS, Willingham MC, Pastan I.** 1983. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* 32(2):639-46.
- Schliwa M, Woehlke G.** 2003. Molecular motors. *Nature* 422(6933):759-65.
- Schrofelbauer B, Yu Q, Landau NR.** 2004. New insights into the role of Vif in HIV-1 replication. *AIDS Rev* 6(1):34-9.
- Sei Y, Inoue M, Yokoyama MM, Bekesi JG, Arora PK.** 1990. Characterization of human B cell (DK) and promonocyte (U937) clones after HIV-1 exposure: accumulation of viral reverse transcriptase activity in cells and early syncytia induction against SupT1 cells. *Cell Immunol* 125(1):1-13.
- Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Buning H, Hallek M, Brauchle C.** 2001. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 294(5548):1929-32.
- Selig L, Pages JC, Tanchou V, Preveral S, Berlioz-Torrent C, Liu LX, Erdtmann L, Darlix J, Benarous R, Benichou S.** 1999. Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses. *J Virol* 73(1):592-600.
- Sena-Esteves M, Saeki Y, Camp SM, ChioCCA EA, Breakefield XO.** 1999. Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons. *J Virol* 73(12):10426-39.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY.** 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22(12):1567-72.
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY.** 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2(12):905-9.
- Sharom FJ, Lehto MT.** 2002. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Cell Biol* 80(5):535-49.

- Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Ingmundson A, Horner SM, Cicchetti G, Allen PG, Pypaert M, Cunningham JM, Mothes W.** 2003. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* 4(11):785-801.
- Simon V, Ho DD.** 2003. HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat Rev Microbiol* 1(3):181-90.
- Smith AE, Helenius A.** 2004. How viruses enter animal cells. *Science* 304(5668):237-42.
- Sommerfelt MA, Asjo B.** 1995. Intercellular adhesion molecule 3, a candidate human immunodeficiency virus type 1 co-receptor on lymphoid and monocytoid cells. *J Gen Virol* 76 (Pt 6):1345-52.
- Spearman P, Horton R, Ratner L, Kuli-Zade I.** 1997. Membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein in vivo supports a conformational myristyl switch mechanism. *J Virol* 71(9):6582-92.
- Stegmann T, Schoen P, Bron R, Wey J, Bartoldus I, Ortiz A, Nieva JL, Wilschut J.** 1993. Evaluation of viral membrane fusion assays. Comparison of the octadecylrhodamine dequenching assay with the pyrene excimer assay. *Biochemistry* 32(42):11330-7.
- Subbramanian RA, Kessous-Elbaz A, Lodge R, Forget J, Yao XJ, Bergeron D, Cohen EA.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages. *J Exp Med* 187(7):1103-11.
- Suomalainen M, Nakano MY, Keller S, Boucke K, Stidwill RP, Greber UF.** 1999. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol* 144(4):657-72.
- Tang C, Loeliger E, Luncsford P, Kinde I, Beckett D, Summers MF.** 2004. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(2):517-22.
- Tominaga Y, Kita Y, Satoh A, Asai S, Kato K, Ishikawa K, Horiuchi T, Takashi T.** 1998. Affinity and kinetic analysis of the molecular interaction of ICAM-1 and leukocyte function-associated antigen-1. *J Immunol* 161(8):4016-22.
- Tremblay MJ, Fortin JF, Cantin R.** 1998. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol Today* 19(8):346-51.
- Trkola A, Kuhmann SE, Strizki JM, Maxwell E, Ketas T, Morgan T, Pugach P, Xu S, Wojcik L, Tagat J, Palani A, Shapiro S, Clader JW, McCombie S, Reyes GR, Baroudy BM, Moore JP.** 2002. HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1):395-400.
- Tsien RY.** 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67:509-44.
- Tsien RY.** 1999. Rosy dawn for fluorescent proteins. *Nat Biotechnol* 17(10):956-7.
- Ugolini S, Moulard M, Mondor I, Barois N, Demandolx D, Hoxie J, Brelot A, Alizon M, Davoust J, Sattentau QJ.** 1997. HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J Immunol* 159(6):3000-8.
- Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S, Butel C, Liegeois F, Bienvenue Y, Ngolle EM, Sharp PM, Shaw GM, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M.** 2006. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* 444(7116):164.
- Van Heuverswyn F, Peeters M.** 2007. The Origins of HIV and Implications for the Global Epidemic. *Curr Infect Dis Rep* 9(4):338-346.
- van Maanen M, Sutton RE.** 2003. Rodent models for HIV-1 infection and disease. *Curr HIV Res* 1(1):121-30.
- Verkman AS.** 1999. Green fluorescent protein as a probe to study intracellular solute diffusion. *Methods Enzymol* 302:250-64.
- Vodicka MA, Koepf DM, Silver PA, Emerman M.** 1998. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev* 12(2):175-85.
- von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B, Ward DM, Chung HY, Morita E, Wang HE, Davis T, He GP, Cimbora DM, Scott A, Krausslich HG, Kaplan J, Morham SG, Sundquist WI.** 2003. The protein network of HIV budding. *Cell* 114(6):701-13.
- Wagner R, Graf M, Bieler K, Wolf H, Grunwald T, Foley P, Uberla K.** 2000. Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 11(17):2403-13.
- Walsh MG, Bateson M, Tan J, Greenway AL, McPhee DA.** 2003. Studies with GFP-Vpr fusion proteins: induction of apoptosis but ablation of cell-cycle arrest despite nuclear membrane or nuclear localization. *Virology* 313(1):91-104.
- Wei X, Decker JM, Liu H, Zhang Z, Arani RB, Kilby JM, Saag MS, Wu X, Shaw GM, Kappes JC.** 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46(6):1896-905.
- Weiss CD.** 2003. HIV-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition. *AIDS Rev* 5(4):214-21.
- Weiss CD, Barnett SW, Cacalano N, Killeen N, Littman DR, White JM.** 1996. Studies of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion using a simple fluorescence assay. *Aids* 10(3):241-6.
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387(6631):426-30.

- Welker R, Hohenberg H, Tessmer U, Huckhagel C, Krausslich HG.** 2000. Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 74(3):1168-77.
- Welsch S, Keppler OT, Habermann A, Allespach I, Krijnse-Locker J, Krausslich HG.** 2007. HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog* 3(3):e36.
- Wieggers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, Krausslich HG.** 1998. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol* 72(4):2846-54.
- Wilk T, Gross I, Gowen BE, Rutten T, de Haas F, Welker R, Krausslich HG, Boulanger P, Fuller SD.** 2001. Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75(2):759-71.
- Willig KI, Rizzoli SO, Westphal V, Jahn R, Hell SW.** 2006. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 440(7086):935-9.
- Wright ER, Schooler JB, Ding HJ, Kieffer C, Fillmore C, Sundquist WI, Jensen GJ.** 2007. Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and SP1 Gag shells. *Embo J* 26(8):2218-26.
- Wu L, KewalRamani VN.** 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6(11):859-68.
- Wu X, Liu H, Xiao H, Conway JA, Hehl E, Kalpana GV, Prasad V, Kappes JC.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *J Virol* 73(3):2126-35.
- Wu X, Liu H, Xiao H, Conway JA, Hunter E, Kappes JC.** 1997. Functional RT and IN incorporated into HIV-1 particles independently of the Gag/Pol precursor protein. *Embo J* 16(16):5113-22.
- Wu X, Liu H, Xiao H, Kim J, Seshiah P, Natsoulis G, Boeke JD, Hahn BH, Kappes JC.** 1995. Targeting foreign proteins to human immunodeficiency virus particles via fusion with Vpr and Vpx. *J Virol* 69(6):3389-98.
- Wunderli-Allespach H, Gunthert M, Ott S.** 1993. Inactivation of PR8 influenza virus through the octadecylrhodamine B chloride membrane marker. *Biochemistry* 32(3):900-7.
- Wyma DJ, Kotov A, Aiken C.** 2000. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 74(20):9381-7.
- Yao XJ, Subbramanian RA, Rougeau N, Boisvert F, Bergeron D, Cohen EA.** 1995. Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol* 69(11):7032-44.
- Yasuda J, Miyao T, Kamata M, Aida Y, Iwakura Y.** 2001. T cell apoptosis causes peripheral T cell depletion in mice transgenic for the HIV-1 vpr gene. *Virology* 285(2):181-92.
- Zacharias DA.** 2002. Sticky caveats in an otherwise glowing report: oligomerizing fluorescent proteins and their use in cell biology. *Sci STKE* 2002(131):PE23.
- Zacharias DA, Tsien RY.** 2006. Molecular biology and mutation of green fluorescent protein. *Methods Biochem Anal* 47:83-120.
- Zanetti G, Briggs JA, Grunewald K, Sattentau QJ, Fuller SD.** 2006. Cryo-electron tomographic structure of an immunodeficiency virus envelope complex in situ. *PLoS Pathog* 2(8):e83.
- Zhang YJ, Hatzioannou T, Zang T, Braaten D, Luban J, Goff SP, Bieniasz PD.** 2002. Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on human immunodeficiency virus type 1 attachment and infection. *J Virol* 76(12):6332-43.
- Zhou Y, Lu Y, Ratner L.** 1998. Arginine residues in the C-terminus of HIV-1 Vpr are important for nuclear localization and cell cycle arrest. *Virology* 242(2):414-24.

Internetquellen:

(1) http://data.unaids.org/pub/EpiReport/2006/2006_EpiUpdate_de.pdf

(2) <http://www.hiv.net/2010/buch.htm>

(3) <http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf>

(Confocal Microscopy von Claxton, Fellers und Davidson)

11 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1** Das offene Leseraster von HIV und eine schematische Darstellung des Virions
- Abbildung 2** Schematische Darstellung des HIV-Replikationszyklus
- Abbildung 3** Excitations- und Emissionsspektren verschiedener fluoreszierender Proteine
- Abbildung 4** Skizze zum Grundprinzip eines TIRF-Mikroskops vom Objektivtyp mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur
- Abbildung 5** Grundprinzip der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
- Abbildung 6** Schematische Darstellung des Detektionssystems zur Virus-Zell-Fusion
- Abbildung 7** Schematische Darstellung verwendeter proviraler Plasmide
- Abbildung 8** Plasmidkarte und Kontrollrestriktion des hergestellten Plasmids pmRFP1.Vpr
- Abbildung 9** Zelluläre Autofluoreszenz von HeLaP4-Zellen
- Abbildung 10** Charakterisierung von HeLaP4-Zellen kultiviert in Hybridomed 1000F im Vergleich zur Standardkultur in DMEM mit 10 % (v/v) FKS
- Abbildung 11** Charakterisierung doppelt fluoreszenzmarkierter Viruspartikel
- Abbildung 12** Bestimmung der Proteinzusammensetzung von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln bei Veränderung der Plasmidverhältnisse von pCHIV, pCHIV.eGFP und pmRFP1.Vpr bzw. peGFP.Vpr zur Transfektion der Produzentenzellen.
- Abbildung 13** Bindung von Viruspartikeln an vorbehandelte und nicht vorbehandelte Deckgläser
- Abbildung 14** Quantifizierung der Doppelmarkierungseffizienz der Viruspartikel
- Abbildung 15** Bestimmung der Eintrittskompetenz von fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln mittels β -Lactamase-Fusionsassays
- Abbildung 16** Bestimmung der Partikelgröße über die Diffusionseigenschaften der Viruspartikel
- Abbildung 17** Zweifarbig fluoreszenzmarkierte Viruspartikel gebunden an HeLaP4-Zellen detektiert mit konfokaler Mikroskopie
- Abbildung 18** Schematische Darstellung der Beobachtung von Viruspartikel mittels TIRF-Mikroskopie und Visualisierung von Zellen auf einem speziell beschichteten Deckglas.
- Abbildung 19** Verschiedene Arten von Virus-Zell-Interaktionen detektiert in Lebendzelleexperimenten
- Abbildung 20** Einfluss der Heparinase I Behandlung auf die Virusbindung, die Virusendozytose und die Infizierbarkeit der Zellen
- Abbildung 21** Korrelation der Virusbindung an die Plasmamembran in Abhängigkeit von der Heparansulfat- und CD4-Konzentration auf der Zelloberfläche
- Abbildung 22** Dauer der Virus-Zellinteraktion bestimmt mittels Einzelpartikelmessungen
- Abbildung 23** Effekt von pH-Wert-Änderungen auf die Fluoreszenzintensität von eGFP und mRFP1 im Viruspartikel
- Abbildung 24** Bestimmung der optimalen Bafilomycin A1-Konzentration zur Hemmung der Virusfusion für Lebendzelleexperimente
- Abbildung 25** Intrazelluläre Trennung von MA- und Vpr-Fluoreszenzsignalen nach Fusion von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln mit HeLaP4-Zellen.
- Abbildung 26** Analyse der Bewegung von Viruspartikeln anhand der Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats $\langle r^2 \rangle$ gegen das Zeitintervall Δt .

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 27	Charakterisierung der Bewegungsmuster von Viruspartikeln
Abbildung 28	Analyse eines Farbtrennungseignisses
Abbildung 29	Analyse der Farbzusammensetzung von Viruspartikeln unter fusogenen und nicht-fusogenen Bedingungen
Abbildung 30	Detektierbarkeit von an unterschiedlichen Positionen im Viruspartikel inkorporierten Fluoreszenzmarkern vor und nach Tritonbehandlung
Abbildung 31	Quantifizierung der Partikelstabilität nach Tritonbehandlung
Abbildung 32	Alternative Fluoreszenzmarkierungen der viralen Lipidmembran
Abbildung 33	Beispielsequenz aus einem Lebendzellexperiment
Abbildung 34	Arbeitsoberfläche der Software
Abbildung 35	<i>Giant Unilamellar Vesicles</i> und Fluoreszenzkorrelationsspektroskope
Abbildung 36	Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Viruspartikeln
Abbildung 37	Bindung von VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln an GUVs unterschiedlicher Lipidzusammensetzung
Abbildung 38	Detektion von Fluoreszenzsignalen im GUV-Lumen mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
Abbildung 39	Charakterisierung des R18-Dequenching-Assays zur Messung der Virus-Liposomen-Fusion
Abbildung 40	Messung des R-18 Dequenchings
Abbildung 41	Fusion von R18 markierten VSV-G pseudotypisierten Viruspartikeln mit SUVs in unterschiedlichen Konzentrationen
Tabelle 1	Aufstellung verschiedener Quellen zellulärer Autofluoreszenz und ihrer spektralen Eigenschaften
Tabelle 2	Ausgetestete Zellkulturmedien zur Reduktion der punktierten Autofluoreszenz
Tabelle 3	Zugänglichkeit der Zelloberseite für unterschiedliche Partikel
Tabelle 4	Zusammenhang zwischen Virusbindung und Heparansulfatkonzentration auf der Zelloberfläche

12 Danksagung

Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich gilt mein erster Dank für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können. Seine Unterstützung, Kommentare und hilfreichen Anregungen während meiner Promotionszeit haben dieses Projekt maßgeblich beeinflusst.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Barbara Müller für ihre intensive Betreuung und anhaltende Unterstützung sowie für das überaus interessante Thema. Ich danke ihr für die langen Diskussionen und die Möglichkeit, an verschiedenen Konferenzen teilzunehmen.

Ich möchte PD Dr. Stephan Urban für die Übernahme des Gutachtens zu der vorliegenden Arbeit und für seine hilfreichen und interessanten Anregungen in meinem PhD-Committee danken.

Prof. Dr. Oliver Fackler danke ich für Teilnahme an meinem PhD-Committee und seine konstruktiven Vorschläge und kritischen Fragen während meiner Promotionszeit.

Ich danke Dr. Rainer Pepperkok für seine Teilnahme an meinem PhD-Committee, seine Vorschläge und besonders für die zwei Jahre, in denen ich als Gast in seiner Gruppe Experimente am EMBL durchführen durfte. Den weiteren Mitgliedern der *Advanced Light Microscope Facility* insbesondere Dr. Stefan Terjung und Dr. Jens Rietdorf danke ich für ihre stete Hilfe bei mikroskopischen Fragen.

Während meiner Promotion hatte ich die Möglichkeit, an verschiedenen Kooperationen aktiv und erfolgreich mitzuwirken. Mein besonderer Dank gilt hierfür an der LMU München Prof. Dr. Christoph Bräuchle und PD Dr. Don C. Lamb sowie Dr. John Briggs, Dr. Sergey Ivanchenko, Stefan Riegelsberg, Dr. Christophe Jung, Monika Franke und Dr. Thomas Endress, bei denen die Lebendzelleexperimente begonnen wurden und im steten Austausch eine kontinuierliche Verbesserung erfahren haben.

An der TU Dresden danke ich Prof. Dr. Petra Schwille, Heiko Keller und Wolfgang Staroske für die Möglichkeit mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und *Giant Unilamellar Vesicles* zu arbeiten.

Danksagung

Die interessanten Einblicke, die ich durch die Analyse von Virus-Zell-Interaktionen mittels TIRF-Mikroskopie an der ETH Zürich gewinnen konnte, verdanke ich Prof. Dr. Ari Helenius, Dr. Helge Ewers, Dr. Gabor Csucs und im besonderen Dr. Akiko Tagawa für ihre stete Hilfe und überaus interessante Diskussionen.

Besonderer Dank gehört auch den Bioinformatikern um Prof. Dr. Karl Rohr, William Godinez und Stefan Wörz, in der Abteilung von Prof. Dr. Roland Eils für die einmalige Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Tracking-Software. Besonders William hat mit seinem Enthusiasmus maßgeblich zum Gelingen dieses Projekts beigetragen.

In unserem Labor danke ich Maria Anders und Manon Eckhardt für die stete Hilfe, anregende Diskussionen und auch dafür, dass ich einige ihrer Plasmide und Viruspräparationen in meinen Experimenten einsetzen durfte. Für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor danke ich Dr. Christa Kuhn, Anja Meier, Oliver Meub, Denise Müller und unserem Gast Prof. Dr. Tom Meenes.

Im Labor von Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich danke ich besonders Bärbel Glass für die Durchführung der S3-Experimente. Maier Lorizate danke ich für ihre Hilfe bei Experimenten mit Liposomen. Zusätzlich hat die Zusammenarbeit mit Dr. Maik Lehmann und Peter Koch maßgeblich zu meiner Doktorarbeit beigetragen.

Für die Einführung in die Durchflußzytometrie danke ich PD Dr. Oliver Keppler und Dr. Nico Michel.

Für die freundliche Atmosphäre danke ich allen Mitgliedern der Abteilung, besonders jedoch meinen Mitstreitern: Sebastian Hannemann, Claudia Haller, Christine Goffinet, Steffi Jäger, Steffi Venzke und Patrick Kaumanns.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern und meiner Schwester, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt Susanne für ihre stete und großartige Unterstützung und dass sie immer an meiner Seite war.