
***Untersuchung zum Pathogenitätspotential von
HIV-1-Primärisolaten
und mechanistische Analysen zur antiviralen
Aktivität wässriger Extrakte und
Flavonoide aus Lamiaceen***

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

Silvia Geuenich

2008

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

vorgelegt von
Diplom-Biologin Silvia Geuenich
aus Neuss

Tag der mündlichen Prüfung:

***Untersuchung zum Pathogenitätspotential von
HIV-1-Primärisolaten
und mechanistische Analysen zur antiviralen
Aktivität wässriger Extrakte und
Flavonoide aus Lamiaceen***

Gutachter:

Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich
Prof. Dr. Valerie Bosch

Zusammenfassung

HIV (*human immunodeficiency virus*) hat als Erreger von AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) 25 Jahre nach seiner Entdeckung bereits zum Tod von weltweit etwa 25 Millionen Menschen geführt. Über zwei Drittel der HIV-Infizierten leben in Afrika. Zwischen weltweit verbreiteten HIV-1-Gruppe M-Viren und nur regional in Afrika vorkommenden HIV-1-Gruppe O-Viren bestehen ausgeprägte genotypische Unterschiede, deren Einflüsse auf Replikation und Pathogenese dieser Primärisolate jedoch weitgehend unbekannt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane Tonsillen-Histokultur als physiologisch relevantes experimentelles *ex vivo*-Modellsystem der HIV-Infektion etabliert. Hierin durchgeführte vergleichende Infektionsstudien zeigten, dass (i) keine grundsätzlichen Unterschiede des Replikationsvermögens zwischen Gruppen M- und O-Viren bestehen, (ii) Gruppe M-Viren sich, in Abhängigkeit von ihrer Korezeptor-Verwendung, untereinander zwar stark in ihrem Replikationsvermögen, nicht jedoch in ihrer Pathogenität (CD4⁺-T-Zell-Depletion) unterscheiden, und, im Gegensatz dazu, (iii) Gruppe O-Viren sich untereinander stark in ihrer Pathogenität, nicht jedoch in ihrem Replikationsvermögen unterscheiden. Hierbei konnten insbesondere zwei R5-HIV-1-Gruppe O-Viren identifiziert werden, die CD4⁺-T-Zellen in einem hohen X4-HIV-1-Viren vergleichbaren Maße depletierten. Weiterhin wurde aufgezeigt, dass die bioinformatische Vorhersage der Korezeptor-Verwendung für HIV-1-Gruppe O-Viren mittels `geno2pheno[coreceptor]` oft fehlerhaft ist, was die Bedeutung phänotypischer Korezeptoranalysen für weniger verbreitete Primärisolate hervorhebt.

Trotz immenser Fortschritte bei der Prävention und Therapie von HIV-Infektionen besteht ein dringender Bedarf zur Identifikation und Entwicklung neuer anti-HIV-Wirkstoffe. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine potente anti-HIV-Aktivität in wässrigen Blatt-Extrakten der Lippenblütler Melisse, Pfefferminze und Salbei nachgewiesen und deren Wirkmechanismus analysiert. Es zeigte sich, dass diese Extrakte rasch und nachhaltig die Infektiosität von HIV-1 in nicht-zytotoxischen Konzentrationen verminderten und dadurch die Virus-Fusion beeinträchtigten. Eine Extrakt-induzierte Erhöhung der Viruspartikel-Dichte stellt das wahrscheinliche Korrelat der viruziden Aktivität dar. Weiterführend konnten aus komplexen Lippenblütler-Extrakten einzelne Flavone mit hoher anti-HIV-Aktivität aufgereinigt und näher charakterisiert werden. Diese könnten eine innovative Basis für die Entwicklung neuer topischer Mikrobizide im Kampf gegen HIV darstellen.

Abstract

HIV (human immunodeficiency virus), the causative agent of AIDS (acquired immunodeficiency syndrome), was discovered 25 years ago and has resulted in 25 million deaths worldwide. Two-thirds of HIV-infected individuals are living in Africa. HIV-1 group M viruses have a global distribution, while HIV-1 group O viruses are endemic in distinct regions of Africa. Primary isolates from these HIV-1 groups display pronounced genotypic differences, the consequences of which on the replication capacity and pathogenesis are largely unclear.

In this Ph.D. thesis, the human tonsil histoculture was established as a physiologically relevant experimental *ex vivo* model system of HIV infection. Comparative infection studies conducted herein revealed that (i) no fundamental differences exist between the replicative capacities of HIV-1 group O and M isolates, (ii) group M viruses, depending on the coreceptor usage, widely differ in their replicative ability, but not in their pathogenicity (CD4⁺ T-cell depletion), and (iii) group O isolates differ markedly in their pathogenicity, but not in their replicative ability. In this context, two R5 HIV-1 group O isolates were identified that caused massive depletion of CD4⁺ T-cells, to an extent comparable to X4 HIV-1 viruses. Furthermore, the bioinformatic prediction of HIV-1 coreceptor usage of primary O types using the geno2pheno_[coreceptor] software proved to be error-prone, emphasizing the importance of phenotypic coreceptor analyses for less prevalent primary isolates.

Despite major advances in HIV prevention and pharmacotherapy there remains an urgent need to identify and develop novel anti-HIV agents. A potent anti-HIV activity of aqueous leaf extracts from the Lamiaceae lemon balm, sage, and peppermint was identified and the mode of action was analysed in the framework of this study. These extracts rapidly and effectively reduced the infectivity of HIV-1 virions at non-cytotoxic concentrations resulting in an inhibition of virion fusion. An extract-induced enhancement of the virion density is the likely correlate of the viricidal activity. In addition, individual flavones, purified from complex extracts of Lamiaceae, displayed potent anti-HIV-1 activity. These may provide an innovative basis for the development of topical microbicides in the fight against HIV.

Publikationsliste

Originalpaper:

Geuenich, S., Goffinet, C., Venzke, S., Nolkemper, S., Baumann, I., Plinkert, P., Reichling, J., and Keppler, O.T.: Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density. *Retrovirology* (2008), 5 (27)

Posterpräsentationen:

Geuenich, S., Pietschmann, T., Nolkemper, S., Bartenschlager, R., Reichling, J., and Keppler, O.T.: Antiviral activity of aqueous extracts from species of the *Lamiaceae* family against human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. Jahrestagung der GfV, 15. - 18.03.2006, München

Geuenich, S., Nolkemper, S., Reichling, J., and Keppler, O.T.: Anti-HIV activity of aqueous extracts from species of Lamiaceae. Jahrestagung der GfV, 01. - 05.09.2007, Nürnberg

Geuenich, S., Goffinet, C., Venzke, S., Nolkemper, S., Baumann, I., Plinkert, P., Reichling, J., and Keppler, O.T.: Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density. Jahrestagung der GfV, 05. - 08.03.2008, Heidelberg

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Virologie des Hygiene-Instituts am Universitätsklinikum Heidelberg von Juli 2005 bis Dezember 2008 durchgeführt.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich für die Möglichkeit bedanken, an diesem exzellenten wissenschaftlichen Umfeld teilgehabt haben zu können, für seine konstruktiven Vorschläge als Mitglied meines Phd-Komitees und für die Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Prof. Dr. Valerie Bosch bedanke ich mich für die Bereitschaft nicht nur hilfreiche Kommentare bei der Teilnahme an meinem Phd-Komitee beizusteuern, sondern auch als Zweitgutachterin zu fungieren.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Oliver Keppler bedanken. Seine ausgezeichnete Betreuung war gekennzeichnet durch viele wertvolle Ideen und Ratschläge, seine wissenschaftliche Kompetenz sowie große Begeisterung für die Arbeit, und sein kommunikatives und freundliches Wesen. Ich weiß sehr zu schätzen, dass er immer ein offenes Ohr für Fragen aller Art hatte.

Liebe „Kepplers“, Christine Goffinet, Ina Allespach, Hanna-Mari Tervo, Daniel Rupp, und Lena Oberbremer, ich danke Euch sehr, dass ich mich an jedem Tag auf die Laborarbeit freuen konnte, denn dazu habt ihr alle maßgeblich beigetragen.

Christine, Du hast Dir immer für alle wissenschaftlichen und auch nicht-wissenschaftlichen Fragen und Probleme für mich Zeit genommen - Danke, auch für die lustigen Abende im „Fritz“! Ina, Deine hilfsbereite, witzige und herzliche Art werde ich vermissen. Ich danke, Dir auch für die Einweisung in die Laborarbeit, nicht nur im S3. Hanna, Du hast mit Deinem liebenswerten und zuverlässigen Wesen nicht nur meinen Laboralltag, diesen zum Beispiel mit der Erschließung der PCR-Welt, bereichert, vielen Dank! Christine und Hanna, ich danke Euch außerdem sehr für das kritische Lesen dieser Arbeit. Sarah, ich weiß mein ehemaliger Platz ist bei Dir in guten Händen!

Ich danke der gesamten Abteilung für die offene und angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Es hat mich gefreut, so viele nette Menschen aus verschiedenen Kulturkreisen kennen zu lernen. Vielen Dank insbesondere an Kate für das Primer-Design und die Auswertung der zugehörigen Daten.

Ich bin OA Dr. Ingo Baumann, Dr. Serkan Sertel und Ihren Kollegen dankbar. Die zuverlässige „Belieferung“ mit Tonsillen-Gewebe aus der HNO-Abteilung der Universitäts-Kopfklinik Heidelberg hat einen wichtigen Teil dieser Arbeit ermöglicht. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Steffi Homann und Nadine Tibroni für die gemeinsame und stets gutgelaunte Bewältigung der „Tonsillenflut“ danken.

Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Lutz Gürtler, Dr. Matthias Dittmar und Prof. Dr. Jan Münch für HIV-1-Gruppe O-Primärisolate sowie Prof. Dr. Valerie Bosch für HIV-1-Gruppe M-Isolate, diese haben einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Ich danke Prof. Dr. Françoise Bailleul (Universität Lille, Frankreich) für unzählige Flavonoid-Aliquots, und insbesondere Dr. Elisabeth Davioud-Charvet (Biochemie-Zentrum Heidelberg) für die Überbringung und Analysen dieser, und ihre ausführlichen und höchst begeisterten Informationen bezüglich chemischer Sachverhalte zur Klärung der „virologisch-chemischen Zusammenarbeit“.

Ich danke Monika Langlotz, Julia Lenz und Dr. Blanche Schwappach (ZMBH Heidelberg) für die BD FACSAria-Analysen zur Messung der Virionen-Fusionstests.

Ich möchte mich herzlich bei meiner Familie und Freunden bedanken. Papa und Margret, vielen Dank für Euer herzliches Interesse an meinem Leben und den sicheren Rückhalt, den Ihr mir bietet.

Banu, dass Deine Promotion Dich nach Heidelberg geführt hat, hat die Zeit hier und unsere Freundschaft für mich noch bedeutender gemacht. Danke dafür!

Thomas, ich genieße jeden Tag mein Leben mit Dir. Die Promotion wird sehr wertvoll für mich sein, doch das Beste, das die Zeit in Heidelberg für mich bereit gehalten hat, bist Du. Vielen Dank für Alles!

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS..... | 1 |
| 1. EINLEITUNG | 5 |
| 1.1 RETROVIREN | 5 |
| 1.2 DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS (HIV) UND AIDS | 5 |
| 1.2.1 Ursprung und Klassifizierung von HIV | 6 |
| 1.2.2 Die HIV-Epidemie und Transmissionswege | 7 |
| 1.2.3 Klinische Aspekte der HIV-Pathogenese | 9 |
| 1.2.4 Die Morphologie der Viruspartikel | 10 |
| 1.2.5 Die genomische Organisation von HIV | 10 |
| 1.2.6 Der HIV-Replikationszyklus | 13 |
| 1.2.6.1 HIV-Eintritt in Zielzellen | 13 |
| 1.2.6.1.1 CD4- und Ko-Rezeptoren | 15 |
| 1.2.6.2 Vorgänge nach der Membranfusion | 15 |
| 1.3 ANTIRETROVIRALE THERAPIE | 16 |
| 1.3.1 HAART (<i>highly active antiretroviral therapy</i>) | 17 |
| 1.3.2 Mikrobizide | 20 |
| 1.3.3 Phytotherapie | 22 |
| 1.4 DIE HUMANE LYMPHOIDE HISTOKULTUR (HLH) ALS <i>EX VIVO</i> -MODELLSYSTEM DER HIV-INFESTION | 23 |
| 1.5 HIV-1-GRUPPE O-VIREN IN DER LITERATUR | 24 |
| 1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 26 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 27 |
| 2.1 ALLGEMEINE LABORAUSSTATTUNG UND VERBRAUCHSMATERIALIEN | 27 |
| 2.1.1 Laborausstattung | 27 |
| 2.1.2 Chemikalien | 28 |
| 2.1.3 Plastikverbrauchsmaterial | 29 |
| 2.1.4 Kits und andere Materialien | 29 |
| 2.1.5 Enzyme | 29 |
| 2.1.6 Antiseren | 29 |
| 2.1.7 Antivirale Substanzen | 30 |
| 2.1.8 Wässrige Lamiaceen-Extrakte | 30 |
| 2.1.9 Flavonoide aus Lamiaceen und Verbenaceen | 31 |
| 2.1.10 Fraktionen aus <i>Marrubium peregrium</i> | 32 |
| 2.1.11 Flavonoide von Extrasynthese | 32 |
| 2.1.12 Puffer und Lösungen | 34 |
| 2.2 ZELLEN | 35 |
| 2.2.1 Bakterienstämme | 35 |
| 2.2.2 Medien für die Bakterienkultivierung | 36 |
| 2.2.3 Zelllinien | 36 |
| 2.2.4 Medien und Lösungen für die Zellkultivierung | 37 |
| 2.3 PLASMIDE | 38 |
| 2.4 HIV-1-PRIMÄRISOLATE | 39 |
| 2.5 PRIMER-SEQUENZEN | 40 |
| 2.6 SOFTWARE | 40 |
| 2.7 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN | 40 |
| 2.7.1 Bakterientransformation | 40 |
| 2.7.2 Präparative DNS-Aufreinigung | 41 |
| 2.7.3 Analyse der DNS-Konzentration und -Reinheit | 41 |
| 2.7.4 Restriktionsverdau von DNS | 41 |
| 2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese | 41 |
| 2.8 METHODEN DER ZELLKULTUR | 42 |
| 2.8.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen | 42 |
| 2.8.2 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen | 42 |
| 2.8.3 Zell-Viabilitätstest (MTT-Assay) | 42 |
| 2.9 PRÄPARIERUNG UND KULTIVIERUNG VON ZELL- UND GEWEBEKULTUREN | 43 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.9.1 | Isolierung von humanen Lymphozyten aus Vollblut und deren Kultivierung | 43 |
| 2.9.2 | Isolierung von humanen Monozyten-abgeleiteten Makrophagen | 43 |
| 2.9.3 | Präparierung und Kultivierung primärer Ratten-T-Zellen | 43 |
| 2.9.4 | Präparierung und Kultivierung von humanen lymphoiden Aggregationskulturen | 44 |
| 2.10 | VIROLOGISCHE METHODEN | 44 |
| 2.10.1 | Calcium-Phosphat-Transfektion von 293T-Zellen | 44 |
| 2.10.2 | Ernte und Konzentrierung von Virusstocks | 45 |
| 2.10.3 | Expansion von HI-Viren in primären T-Zellkulturen | 45 |
| 2.10.4 | Nachweise der Infektiosität | 45 |
| 2.10.4.1 | Luziferase-Reporter-Virus-Test | 45 |
| 2.10.4.1.1 | Bestimmung der Korezeptor-Benutzung von HIV-1 | 46 |
| 2.10.4.2 | HIV-Infektiositätstest | 46 |
| 2.11 | INFEKTIONEN ZUR UNTERSUCHUNG ANTIVIRALER EFFEKTE | 46 |
| 2.11.1 | Behandlung von Virus und Zellen | 46 |
| 2.11.2 | Vorbehandlung von Zellen | 47 |
| 2.11.3 | Infektion von T-Zelllinien und humanen Tonsillenhistokulturen | 47 |
| 2.11.4 | Infektion von humanen Makrophagen unter kontinuierlicher Extraktbehandlung | 47 |
| 2.11.5 | Infektion von primären Ratten-T-Zellen | 47 |
| 2.11.6 | HIV-1 single-round-Infektionen | 47 |
| 2.11.6.1 | Bindung von Viruspartikeln an Zelloberflächen | 48 |
| 2.11.7 | Infektionen mit Adenovirus Typ 5 GFP-Reporterviren | 48 |
| 2.12 | IMMUNOLOGISCHE METHODEN | 48 |
| 2.12.1 | Nachweis von HI-Viren durch p24CA-ELISA | 48 |
| 2.12.2 | HIV-1-Virionen-Fusionstest | 49 |
| 2.12.3 | Durchflusszytometrie | 50 |
| 2.12.3.1 | Messung der CD4 ⁺ -T-Zell-Depletion | 50 |
| 2.13 | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 51 |
| 2.13.1 | DNS-Extraktion | 51 |
| 2.13.2 | PCR (polymerase chain reaction) | 51 |
| 2.13.3 | DNS-Aufreinigung | 52 |
| 2.13.4 | Sequenzierung und Auswertung | 52 |
| 2.13.5 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot | 52 |
| 2.13.5.1 | SDS-PAGE zur Darstellung von Proteinen | 52 |
| 2.13.5.2 | Semi Dry Western Blot und Detektion von Proteinen | 53 |
| 2.13.5.2.1 | Western blot-Analyse viraler Strukturproteine nach Extraktbehandlung | 54 |
| 2.13.6 | Lipofektion von Zellen | 54 |
| 2.13.6.1 | HIV-Env vermittelter Zell-zu-Zell-Fusionstest | 54 |
| 2.14 | PHYSIKALISCHE METHODEN | 55 |
| 2.14.1 | Saccharose-Dichte-Gradienten-Analyse | 55 |
| 2.14.2 | Dialyse | 55 |
| 3. | ERGEBNISSE | 57 |
| 3.1 | ANTI-HIV-AKTIVITÄT WÄSSRIGER EXTRAKTE VON <i>MELISSA OFFICINALIS</i> , <i>MENTHA X PIPERITA</i> UND <i>SALVIA OFFICINALIS</i> | 57 |
| 3.1.1 | Wässrige Lamiaceen-Extrakte zeigen eine konzentrationsabhängige anti-HIV-1-Aktivität auf humanen T-Zellen | 57 |
| 3.1.2 | Potente Inhibition der HIV-1-Infektion ex vivo in der humanen Tonsillen-Histokultur und in primären Makrophagen durch wässrige Lamiaceen-Extrakte | 58 |
| 3.1.3 | Wässrige Lamiaceen-Extrakte wirken auf die HIV-1-Partikel | 59 |
| 3.1.4 | Wässrige Lamiaceen-Extrakte inhibieren die Fusion von HI-Viren mit der Zelle | 62 |
| 3.1.5 | Melissen-Extrakt inhibiert Enfuvirtid-insensitive HIV-1-Mutanten | 64 |
| 3.1.6 | Die anti-HIV-1-Aktivität des Melissen-Extrakts wirkt schnell, aber ist reduziert gegen Oberflächen-gebundene Virionen | 65 |
| 3.1.7 | Melissen-Extrakt führt nicht zur Inhibition einer HIV-1-Env-vermittelten Zell-Zell-Fusion | 65 |
| 3.1.8 | Wässrige Lamiaceen-Extrakte inhibieren Viruspartikel, die R5-Envs oder das Glykoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus tragen, als auch das Moloney-Maus-Leukämie-Virus | 68 |
| 3.1.9 | Bestimmte Hauptinhaltsstoffe der wässrigen Lamiaceen-Extrakte sind nicht gegen HIV-1 aktiv | 70 |
| 3.1.10 | Die Stabilität der Virionen und die Virus-assoziierten Mengen von Env und prozessiertem Gag werden durch Melissen-Extrakt nicht negativ beeinflusst | 72 |
| 3.1.11 | Die Dichte der Viruspartikel wird durch wässrige Lamiaceen-Extrakte erhöht | 72 |
| 3.2 | IDENTIFIKATION ANTIVIRALER FLAVONOIDE AUS LAMIACEEN | 75 |
| 3.2.1 | Spezifische Flavonoide inhibieren potent die HIV-1-Replikation | 75 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.2 BJ486K, chemisch synthetisiertes MP-03, ist vergleichbar wirksam gegen HIV-1 wie pflanzliches MP-03..... | 79 |
| 3.2.3 Die antivirale Aktivität von MP-03 richtet sich gegen Viruspartikel und hemmt deren Fusion mit Zielzellen | 80 |
| 3.2.4 Potente Inhibition der HIV-1-Infektion durch die antivirale Aktivität mehrerer MP-03 enthaltender Fraktionen eines Lamiaceen-Extrakts | 82 |
| 3.3 ANALYSE DER HIV-PATHOGENITÄT VERSCHIEDENER HIV-1-GRUPPE O-ISOLATE IN PRIMÄREN MODELLSYSTEMEN DER INFEKTION..... | 87 |
| 3.3.1 Etablierung der humanen lymphoiden Aggregationskultur..... | 87 |
| 3.3.2 Replikationskinetiken laboradaptierter HI-Viren und primärer Virus-Isolate der HIV-1-Gruppen M und O | 88 |
| 3.3.3 X4-HI-Viren und zwei R5-HIV-1-Gruppe O-Isolate depletieren effizient CD4 ⁺ -T-Zellen in humanen Tonsillen-Histokulturen | 92 |
| 3.3.4 R5-HIV-1-Gruppe O-Viren besitzen ein variables CD4 ⁺ -T-Zell-Depletionsvermögen, wobei die Depletionskapazität nicht vom Replikationspotential abhängt..... | 95 |
| 3.3.5 Phänotypische Analysen bestätigen die CCR5-Verwendung der HIV-1-Gruppe O-Primärisolate 2549 und 13740..... | 97 |
| 3.3.6 Vorhersagen der Korezeptor-Verwendung, basierend auf der V3-Schleifen-Sequenz der HIV-1-Gruppe O-Isolate, stimmen nur teilweise mit den phänotypischen Analysen überein..... | 97 |
| 4. DISKUSSION..... | 100 |
| 4.1 WÄSSRIGE EXTRAKTE VON MELISSA OFFICINALIS, MENTHA X PIPERITA UND SALVIA OFFICINALIS SIND ANTIVIRAL AKTIV..... | 100 |
| 4.1.1 Wässrige Lamiaceen-Extrakte zeigen eine konzentrationsabhängige anti-HIV-1-Aktivität auf humanen T-Zelllinien, primären Makrophagen und in der Tonsillen-Histokultur ex vivo..... | 100 |
| 4.1.2 Die wässrigen Lamiaceen-Extrakte wirken direkt und schnell auf die HIV-1-Partikel und beeinträchtigen somit die Virionen-Fusion | 101 |
| 4.1.3 Wässrige Lamiaceen-Extrakte inhibieren effizient die Infektionen mit diversen Virusstämmen, darunter Enfuvirtid-insensitive HIV-1-Mutanten, aber führen nicht zur Inhibition einer HIV-1-Env-vermittelten Zell-Zell-Fusion..... | 102 |
| 4.1.4 Die bis dato identifizierten Hauptinhaltsstoffe liefern keine Erklärung für die anti-HIV-Aktivität der wässrigen Lamiaceen-Extrakte | 104 |
| 4.1.5 Wässrige Lamiaceen-Extrakte verändern die Dichte der Viruspartikel, aber weder deren Stabilität noch die virus-assoziierte Menge von Env und Gag..... | 105 |
| 4.2 FLAVONOIDE LAMIACEEN ZEIGEN ANTI-HIV-AKTIVITÄT..... | 107 |
| 4.2.1 Spezifische Flavonoide inhibieren potent die HIV-1-Replikation..... | 108 |
| 4.2.2 BJ486K, chemisch synthetisiertes MP-03, ist antiviral aktiv..... | 110 |
| 4.2.3 Die direkte Interaktion mit HIV-1-Partikeln und die Inhibition der Fusion mit Zielzellen bestimmen die MP-03-Aktivität | 112 |
| 4.2.4 HIV-1-Infektion werden effektiv durch MP-03 enthaltende Fraktionen eines Lamiaceen-Extrakts inhibiert | 113 |
| 4.3 UNTERSUCHUNG DES REPLIKATIONS- UND PATHOGENITÄTSPOTENTIALS PRIMÄRER HIV-1-GRUPPE O-ISOLATE | 115 |
| 4.3.1 Verwendung der humanen lymphoiden Aggregationskultur..... | 115 |
| 4.3.2 HIV-1-Gruppe M-Viren weisen, im Gegensatz zu Gruppe O-Isolaten, große Variabilität in ihrem Replikationspotential auf..... | 116 |
| 4.3.3 Effiziente CD4 ⁺ -T-Zell-Depletion in humanen Tonsillen-Histokulturen durch X4- und zwei R5-HI-Viren der Gruppe O..... | 119 |
| 4.3.4 Diskrepanz phänotypischer und genotypischer Korezeptor-Gebrauch-Analysen bei HIV-1-Gruppe O-Primärisolaten | 122 |
| 5. REFERENZEN | 125 |
| 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 133 |

1. Einleitung

1.1 Retroviren

Die auffälligste Eigenschaft von Retroviren besteht in ihrer Fähigkeit, RNS mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNS umzuschreiben, womit der übliche genetische Informationsfluss von DNS über RNS in Protein umgekehrt wird. Gemeinsam ist den Retroviren außerdem das diploide einzelsträngige nicht-segmentierte RNS-Genom (7-12 kb) von positiver Polarität und die Integration der cDNS in das Wirtszellgenom.

Die Retroviren sind in sieben Genera eingeteilt, die α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren, sowie die Lenti- und Spumaviren. Die Unterteilung beruht nicht nur auf den morphologischen und genetischen Unterschieden der Viren, sondern auch auf den Infektionsbesonderheiten und verursachten Erkrankungsformen. Zusätzlich werden sie aufgrund der Organisation ihres Genoms in einfache und komplexe und je nach Art des Infektionszyklus in exogene und endogene Retroviren klassifiziert.

1.2 Das humane Immundefizienzvirus (HIV) und AIDS

In den achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurden die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2 als Retroviren und Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) identifiziert.

HIV gehört wie SIV (*simian immunodeficiency virus*) und FIV (*feline immunodeficiency virus*) zu den Lentiviren, die für ihre zytolytischen und immunsuppressiven Eigenschaften bekannt sind. Ein Unterschied zu anderen Retroviren ist die lange Latenzperiode (bis zu 20 Jahre) bevor es zur Manifestation klinischer Symptome kommt. Die komplexen Lentiviren, wie HIV, besitzen zudem die Fähigkeit, auch nicht teilungsaktive eukaryotische Zellen infizieren zu können (Modrow und Falke, 1998).

1.2.1 Ursprung und Klassifizierung von HIV

Phylogenetische Analysen zur Klärung des Ursprungs von HIV führen zu SI-Viren, die eine Vielzahl von nicht-humanen Primatenarten in Afrika infizieren.

Wie aus phylogenetischen Untersuchungen hervorgeht, haben SIV_{cpz}, das in einer Schimpansen-Unterart (*Pan troglodytes troglodytes*) gefunden wurde, und SIV_{smm} aus einer Mangabenspezies (*Cercocebus atys*) die Artbarriere übersprungen, was zur Entwicklung von HIV-1 bzw. HIV-2 führte. Nach mindestens zwei separaten Transmissionsereignissen vom Schimpansen auf den Menschen entwickelten sich die genetisch unterschiedlichen HIV-1-Gruppen M (*major*) und N (*non-M* oder *-O*) (Keele, Van Heuverswyn et al. 2006).

Van Heuverswyn und Kollegen identifizierten 2006 in Gorillas (*Gorilla gorilla*) außerdem SIV_{gor}, den wahrscheinlichen Vorläufer der dritten HIV-1-Gruppe O (*outlier*). Dabei ist noch unklar, ob dieses der HIV-1-Gruppe O ähnliche Virus von Schimpansen entweder unabhängig auf Gorillas und Menschen oder über den Gorilla auf den Menschen übertragen wurde. Zahlreiche zoonotische Virus-Übertragungen haben außerdem die fünf HIV-2-Gruppen (A bis E) hervorgebracht, unter denen A und B die prominentesten sind.

Im Gegensatz zu HIV-Infektionen beim Menschen bleibt eine Infektion mit SIV im natürlichen Wirt trotz hoher Virämie zumeist asymptomatisch und induziert gewöhnlich keinen signifikanten Verlust von CD4⁺-T-Zellen. Diskutierte Schlüsselfaktoren, die dem Schutz des natürlichen SIV-Wirts vor AIDS mechanistisch zugrunde liegen, sind die nur begrenzte Aktivierung des Immunsystems (Schindler, Munch et al. 2006) und die geringe CCR5-Rezeptor-Expression auf CD4⁺-T-Zellen.

Die außergewöhnliche genetische Variabilität von HIV, ursächlich sind die hohen Mutations-, Replikations- und auch Rekombinationsraten, hat zu der Entwicklung und geographischen Verteilung von zahlreichen unterschiedlichen Subtypen geführt. Die HIV-1-Gruppe M, durch die weltweit die meisten HIV-1-Infektionen verursacht werden, wird in neun Subtypen (A-D, F-H, J und K) unterteilt, daneben existieren fünf Sub-Subtypen und 18 rekombinante Formen. Unter den HIV-1 Gruppe M-Viren sind die Subtypen B in Europa, Amerika und Australien, und C im südlichen Afrika die vorherrschenden. Im Vergleich zu HIV-1 ist HIV-2 wesentlich weniger prävalent. HIV-2-Infektionen findet man vornehmlich in West-Afrika, Indien und zu einem geringeren Ausmaß in Portugal.

Die HIV-1-Gruppe O-Viren konnten aufgrund ihrer limitierten Anzahl noch nicht als Subtypen definiert werden, obwohl die Viren dieser Gruppe sich im gleichen Maße unterscheiden wie Viren aus verschiedenen Subtypen der Gruppe M (15 – 20% DNS-Sequenz-Unterschiede zwischen den Klassen). Infektionen mit HIV-1-Gruppe O-Viren sind fast ausschließlich auf Personen aus Zentralafrika beschränkt, jedoch wurde auch in den USA und Europa von sporadischen Infektionen berichtet (Zekeng, Gurtler et al. 1994; Kandathil, Ramalingam et al. 2005).

1.2.2 Die HIV-Epidemie und Transmissionswege

1983 wurde das humane Immundefizienzvirus als ätiologisches Agens für das *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) isoliert und der Kausalzusammenhang zwischen Virus und erworbener Immunschwäche hergestellt (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983; Popovic, Sarngadharan et al. 1984). In diesem Jahr wurden Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier für die Entdeckung von HIV mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Über 25 Jahre später besagen Hochrechnungen, dass weltweit 25 Millionen Menschen an den Folgen der HIV-Infektion gestorben sind, was besonders in den am schwersten betroffenen Ländern in Afrika zu nachhaltigen demografischen Veränderungen führt (UNAIDS, 2008). Durch HIV reduzierte sich die Lebenserwartung in diesen Ländern um 20 Jahre. Alleine in den südlich der Sahara gelegenen afrikanischen Ländern wurden aufgrund der HIV-Epidemie fast 12 Millionen Kinder zu Waisen (UNAIDS, 2008). 67% aller HIV-Infizierten leben in den südlichen Regionen Afrikas, davon sind 60% Frauen. Global gesehen liegt der Anteil der weiblichen Bevölkerung unter den HIV-Infizierten bei 50% und obwohl diese Rate seit etwa zehn Jahren relativ konstant ist, steigt die Zahl der HIV-infizierten Frauen in vielen Regionen an (UNAIDS, 2008). Etwa 45% der weltweiten HIV-Neuinfektionen betreffen die Altersgruppe der 15- bis 24-Jährigen.

Inzwischen sinkt die Rate der Neuinfektionen zwar in einigen Ländern, steigt dafür aber in anderen. In Deutschland beispielsweise steigt neben den Inzidenzen von Syphilis und anderen Geschlechtskrankheiten auch die Zahl der HIV-Neuinfektionen seit etwa sechs Jahren an (Gesamtzahl von 59000 HIV-Infizierten in Deutschland (RKI, Mai 2007)).

Die Zahlen verdeutlichen, dass die HIV-Pandemie ein Problem katastrophalen Ausmaßes darstellt, wobei die Problematik in afrikanischen südlich der Sahara gelegenen Ländern besonders gravierend ist.

In diesen Ländern ist die treibende Kraft der HIV-Epidemie ungeschützter heterosexueller Verkehr. Der Gebrauch von Kondomen ist unter anderem aufgrund fehlender kultureller Akzeptanz eine Seltenheit; zum Beispiel verzichten in Burkina Faso nahezu 90% der heterosexuellen Paare auf deren Verwendung. Ein wichtiger Kofaktor für die Verbreitung von HIV ist außerdem die hohe Prävalenz anderer sexuell übertragbarer Krankheiten in einigen afrikanischen Regionen, wobei unter diesen HSV-2 als Pathogen die größte Rolle spielt. Entzündungen und genitale Ulzerationen erhöhen die Wahrscheinlichkeit der HIV-Transmission. Die Effizienz der HIV-1-Transmission ist primär von der Konzentration des Virus im Blut und den Genitalsekreten des Infizierten abhängig, wobei die Viruslast je nach Krankheitsstadium stark variieren kann. In etwa 60% aller neuen HIV-1-Infektionen verlief die Transmission über kontaminiertes Sperma.

Münch und Kollegen berichteten 2007 über die Identifizierung von SEVI (*semen derived enhancer of virus infection*), einem amyloidogenen Peptid aus Samenflüssigkeit, das Fibrillen bildet, die effizient HIV-Partikel binden. Durch die Anlagerung an Zielzellen können die Viren in Gegenwart von SEVI die Zellen verstärkt infizieren (Munch, Rucker et al. 2007). Somit könnte SEVI einen wichtigen Faktor in der HIV-Transmission darstellen.

Ungeschützter Sexualkontakt unter homosexuellen Männern ist dagegen in den USA sowie in West- und Zentraleuropa die hauptsächliche Transmissionsroute (UNAIDS, 2008). Weitere Transmissionswege stellen der gemeinsame Gebrauch von kontaminierten Spritzen und Kanülen (bei Drogenkonsumenten) und, insbesondere in Ländern der Dritten Welt, die Infektion des Kindes durch die HIV-positive Mutter prä-, perinatal oder über die Muttermilch dar. Die Wahrscheinlichkeit einer HIV-Übertragung durch Blut oder Blutprodukte ist in Deutschland sehr gering (<1:1.000.000) (Lackritz, Satten et al. 1995).

1.2.3 Klinische Aspekte der HIV-Pathogenese

In den meisten Fällen dringt HIV wie viele andere Viren über die Mukosa in den Körper ein. Entsprechend des häufigsten Übertragungsweges über Sexualkontakt werden CD4⁺-Langerhans-Zellen und T-Zellen in der Genitalmukosa als erste Zielzellen diskutiert. Im weiteren Verlauf der Infektion können auch Monozyten, Makrophagen und Mikroglia infiziert werden. Über den Blutkreislauf gelangen freie Viruspartikel, infizierte Zellen oder auch Zell-gebundene Viren in die Lymphknoten (Shattock and Moore 2003). Damit beginnt die akute Phase der HIV-Infektion, die nur in 20 bis 30% der Fälle von Grippe- oder Mononukleose-ähnlichen Symptomen und einer Lymphadenopathie gekennzeichnet ist. Die sehr hohe Virämie (10^6 bis 10^8 Viruspartikel/ml Blut), verbunden mit dem deutlichen Absinken der CD4⁺-Lymphozyten, besteht im Allgemeinen einige Wochen, und wird wahrscheinlich unter anderem durch zytotoxische NK-Zellen, die in der akuten Phase expandieren (Alter, Martin et al. 2007), kontrolliert.

Auf die initiale Immunantwort folgt eine massive Expansion der CD8⁺-T-Zellantwort (Pantaleo, Demarest et al. 1994). Mit dem Ende der virämischen Phase und dem Erreichen eines viralen *setpoints*, der prädiktiv für die langfristige Krankheitsprogression ist (Mellors, Munoz et al. 1997; Mellors, Margolick et al. 2007), kann sich ein mehrere Jahre dauerndes symptomfreies Latenzstadium anschließen. Während dieser asymptomatischen Phase ist die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen leicht erhöht, die Virusreplikation findet weiterhin auf geringem Niveau aber kontinuierlich, vornehmlich in den Lymphknoten statt, und die Zahl der CD4⁺-T-Zellen nimmt mit einer relativ stabilen Rate weiter ab.

Der Übergang in die dritte Phase beginnt mit dem Auftreten der AIDS-Symptomatik, charakterisiert durch einen rapiden Abfall der CD4⁺-T-Zellen und einer Erhöhung der Viruskonzentration. Als kritische Grenze gilt ein Wert von 200 CD4⁺-T-Zellen/ μ l Blut. Vor der Ausprägung des Vollbildes steht das LAS-Stadium (Lymphadenopathisches Syndrom), das in die Phase des ARC (*AIDS-related complex*) übergehen, und wenige Wochen, Monate oder aber über Jahre stabil bleiben kann.

Charakteristika des Vollbildes AIDS sind vermehrte Defekte der zellulären Immunantwort, die der Grund für das Auftreten von opportunistischen Infektionen (Bsp.: *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie, chronische *Herpes simplex*-Infektionen,

Candida albicans-Infektionen, generalisierte Cytomegalovirus-Infektionen) und malignen Tumoren (Kaposi-Sarkom, Lymphome) sind. Auch neurologische Symptome sind in der späten Phase der Erkrankung häufig.

1.2.4 Die Morphologie der Viruspartikel

Die infektiösen Partikel, in deren Inneren sich das konische Capsid befindet, sind sphärisch und haben einen Durchmesser von ca. 125 bis 145 nm (Briggs, Wilk et al. 2003; Briggs, Grunewald et al. 2006).

Das aus Capsidproteinen (p24) bestehende Capsid enthält zwei identische mit Nucleocapsidproteinen (p7) komplexierte RNS-Genome und wird von einer Hüllmembran umgeben, die von der zellulären Plasmamembran abgeleitet ist. In der Membran ist das transmembrane Glykoprotein gp41 verankert, extern befindet sich nicht-kovalent gebunden das Hüll-Glykoprotein gp120.

Unter der Hüllmembran liegen Matrixproteine (p17), die als Trimere miteinander eine netzähnliche strukturgebende Proteinschicht bilden. Das Linkerprotein p6 verbindet das Capsid mit der Hüllmembran. Das Viruspartikel enthält außerdem die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease, die essentiell für die Virusproduktion sind, sowie die Proteine Vpr, Vif und Nef.

Zusätzlich zu den viralen Proteinen sind auch zelluläre Proteine in das Capsid inkorporiert, z. B. Cyclophilin A (Braaten and Luban 2001).

1.2.5 Die genomische Organisation von HIV

Retroviren enthalten zwei identische Kopien einzelsträngiger RNS (HIV: 9,2 kb) mit einer 5'-Cap-Struktur und einer 3'-Polyadenylierungssequenz, wodurch sie eukaryotischer mRNA gleichen.

Die kodierenden Sequenzen des viralen Genoms werden von regulatorischen Kontrollelementen flankiert; dazu gehört die R-Region (*redundant*), an die sich am 5'-Ende des Genoms die für die Integration des Provirus wichtige U5-Region anschließt (*unique*). Darauf folgt die Primer-Bindungsstelle (PB), die im Komplex mit einer zellulären tRNA vorliegt. Zwischen der Primer-Bindungsstelle und den Protein-

kodierenden Genen liegt eine als Leader-Region bezeichnete Basenfolge, worin sich eine Spleißdonorstelle befindet, die für alle gespleißten mRNA verwendet wird. Der kodierende Bereich geht in eine Folge von Adenosin- und Guanosinresten, den Polypurintrakt, über, der für die Initiierung der DNS-Doppelstrangsynthese bei der reversen Transkription wichtig ist.

Bei der reversen Transkription wird aus dem einzelsträngigen RNA-Genom eine doppelsträngige cDNA (*copy*) synthetisiert. Während dieses Prozesses werden an den Enden identische Sequenzfolgen generiert, die LTRs (*long terminal repeats* aus U3, R und U5), die Promotor- und Enhancer-Elemente beinhalten, die die virale Genexpression kontrollieren.

Auf den Polypurintrakt folgen analog zum 5'-Ende die U3-Region und der R-Bereich. Die Promotoren und die *cis*-aktive Elemente enthaltende U3-Region sind essentiell für die Genexpression des integrierten Provirus.

Das retrovirale Genom besteht aus mindestens drei Genen: *gag*, *pol* und *env*. *Gag* kodiert für die Strukturproteine Matrix (MA, p17), Capsid (CA, p24), Nukleocapsid (NC, p7) und p6, *env* für die Glykoproteine gp120 und gp41 und *pol* für die Enzyme Integrase, Protease und Reverse Transkriptase. Die Prozessierung der Vorläuferproteine geschieht dabei mithilfe von zellulären (bei gp160Env) bzw. viralen (bei Pr55Gag, Pol) Furinproteasen (Luciw 1996).

HIV enthält zusätzlich sechs weitere Gene, kodierend für die regulatorischen Proteine Tat (*transactivator of transcription*) und Rev (*regulator of viral proteins*) und die akzessorischen Proteine Nef (*negative factor*), Vif (*viral infectivity factor*), Vpr (*viral protein r*) und Vpu (*viral protein u*) (Freed 2001).

Das Protein Tat ist für eine effiziente Transkription des HIV-1 LTR wichtig, indem es die Prozessivität der RNA Polymerase II durch die Bindung an eine bestimmte virale regulatorische Sequenz (TAR, *transactivator region*) erhöht. Das regulatorische Protein Rev bindet ebenfalls an eine spezifische virale Sequenz (RRE, *Rev-responsive element*); diese ist in allen un- und partiell gespleißten HIV-mRNAs enthalten (Pollard and Malim 1998), und vermittelt deren Export ins Zytoplasma. Vif ist notwendig für die Generierung voll infektiöser Viruspartikel (Sodroski, Goh et al. 1986; Strebel, Daugherty et al. 1987; Strebel 2003), während von dem Protein Vpr angenommen wird, dass es den Eintritt des Prä-Integrationskomplexes in den Nukleus erleichtert (Bukrinsky 2004). Als nukleozytoplasmatischer Transportfaktor agierend erlaubt Vpr möglicherweise die Infektion von sich nicht-teilenden Zellen

(Sherman, de Noronha et al. 2001). Die Rolle von Vpu besteht in der Erhöhung der Virus-Freisetzung durch die Antagonisierung des zellulären Tetherins und der Degradation von CD4 (Neil, Zang et al. 2008). Für Nef sind viele Funktionen beschrieben, unter anderem die Herab-Regulation von MHC-I, CD4 und der Korezeptoren von der Zelloberfläche (Garcia and Miller 1991; Schwartz, Marechal et al. 1996; Michel, Allespach et al. 2005; Keppler, Tibroni et al. 2006).

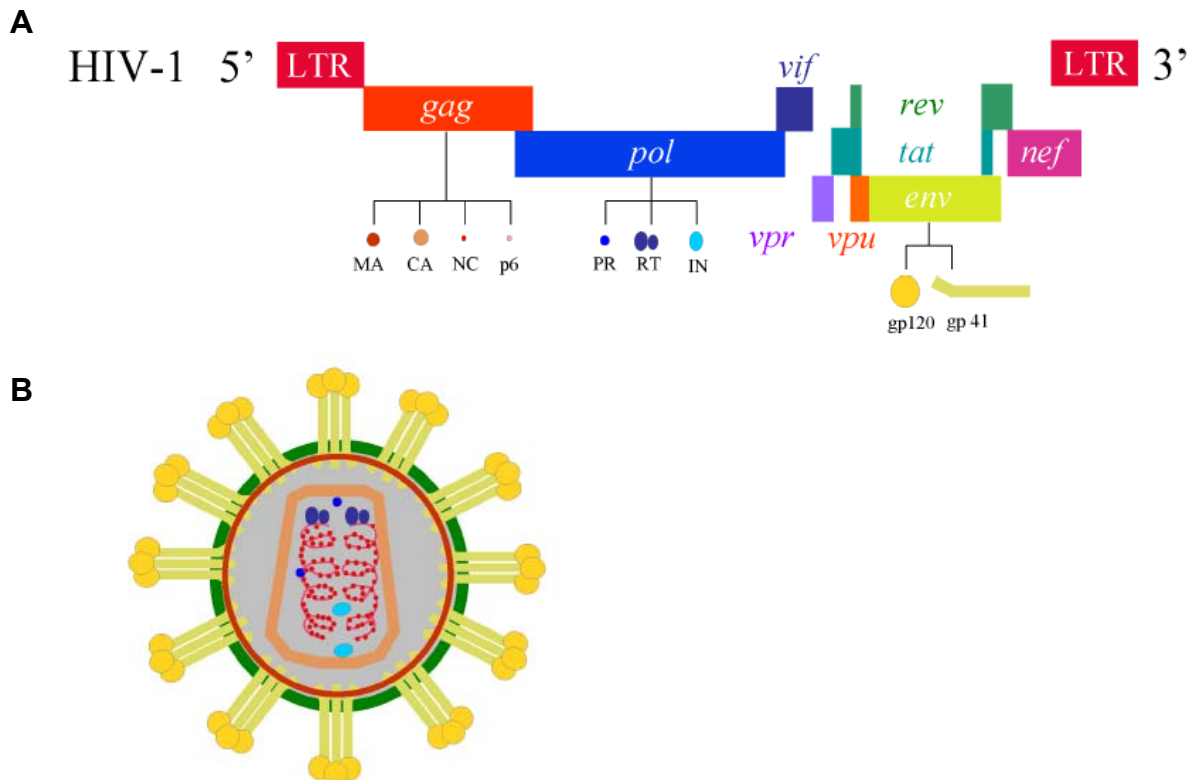


Abb. 1.1: Aufbau des HIV-1-Genoms und eines HIV-Partikels. (A) Darstellung der relativen Lokalisation der offenen Leseraster von HIV-1 und der 5' und 3' LTRs unter Angabe der kodierten Proteine. (B) Schematischer Aufbau eines HIV-Partikels (Fackler and Geyer 2002).

1.2.6 Der HIV-Replikationszyklus

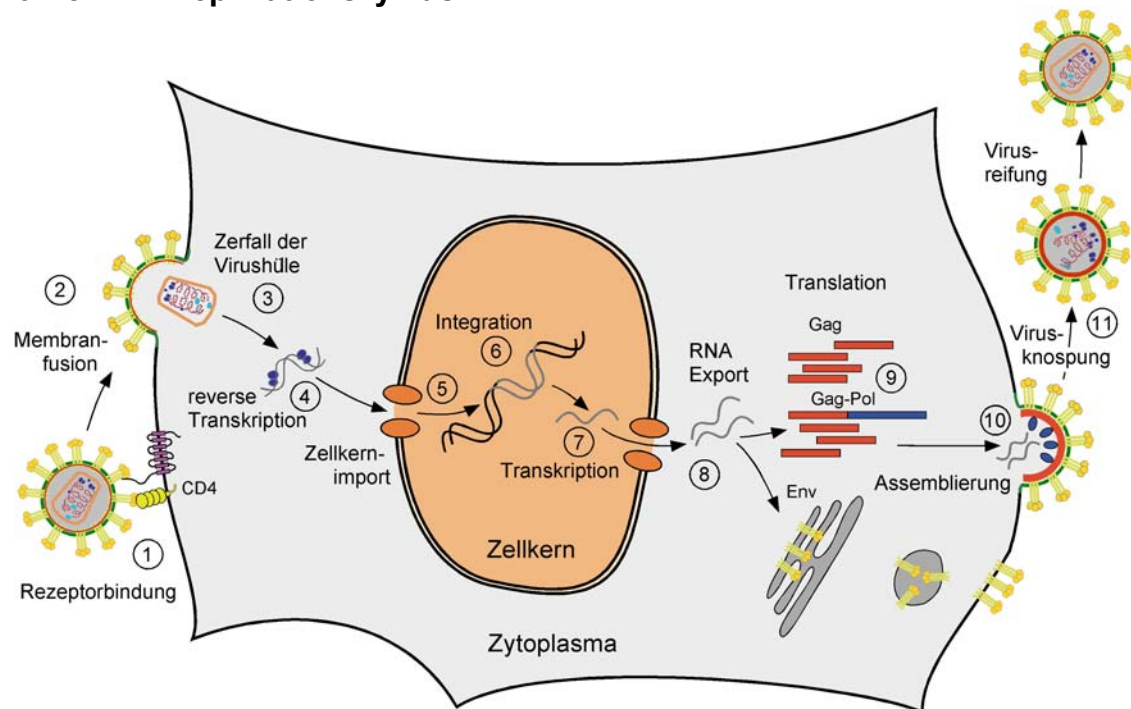


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des HIV-Replikationszyklus (Fackler and Geyer 2002). Im Text werden die mit Zahlen versehenen Ereignisse näher erläutert.

1.2.6.1 HIV-Eintritt in Zielzellen

Die Fusion des HIV-Partikels mit der Membran der Zielzellen stellt den vorherrschenden Mechanismus des Viruseintritts ins Zytoplasma dar (Freed 2001). Eine alternative Route des viralen Zelleintritts ist die Clathrin-vermittelte Endozytose (Daecke, Fackler et al. 2005), deren physiologische Relevanz bislang jedoch nicht geklärt wurde.

Das Fusionsereignis benötigt die spezifische Interaktion des Env-Proteins mit spezifischen Zelloberflächen-Rezeptoren. Der Rezeptor-Komplex besteht aus CD4 und einem Chemokinrezeptor, CCR5 oder CXCR4. Zell- und Virusstamm-spezifische Verwendung regulieren den HIV-Eintritt in Lymphozyten und Makrophagen und den Tropismus, mehr als die Korezeptor-Expression auf der Zelloberfläche. Der Verwendung des Korezeptors nach werden Viren als X4, R5 oder R5X4, R5+X4 oder R5/X4 bezeichnet. R5X4-Viren benutzen sowohl den CCR5- als auch den CXCR4-Rezeptor. Die Bezeichnung R5+X4 beschreibt Quasispezies mit einer Mischung von Virus-Varianten, die unabhängig voneinander CCR5- oder CXCR4-Rezeptoren verwenden. R5/X4 definiert Quasispezies, die aus R5X4- und R5+X4-Viren bestehen.

Auf der Grundlage des Zielzell-Tropismus werden HI-Viren als T-, M- oder D-trop klassifiziert. Korezeptor-Verwendung und Zielzell-Tropismus sind verwandte aber dennoch verschiedene Charakteristika des HIV-Envs. T-trope Viren (typischerweise X4) infizieren primär Lymphozyten und T-Zelllinien, M-trope (typischerweise R5) Makrophagen und Lymphozyten, und D-trope Viren (R5X4 oder X4) jeden dieser Zelltypen. Hinzu kommen L-trope und Mr-trope (beide typischerweise R5) Viren, deren Replikation auf Lymphozyten bzw. Makrophagen beschränkt ist. Aufgrund der Unterschiede zwischen Korezeptor-Verwendung und Zielzell-Tropismus sollte das phänotypische Profil des Virus mithilfe beider Charakteristika beschrieben werden (Goodenow and Collman 2006).

Die HIV-Env gp120-Untereinheit bindet an CD4-Rezeptoren, was zu einer Konformationsänderung in gp120 und diese wiederum zu einer Exposition der Korezeptor-Bindungsstelle führt. Die V3-Region des gp120 ist gemeinsam mit den variablen V1- und V2-Domänen an der Interaktion mit den Chemokinrezeptoren beteiligt. Die V3-Region besitzt eine hohe Sequenzvariabilität und ist eine Hauptdeterminante für den Korezeptor-Gebrauch und den Zelltropismus.

Envs, die CCR5 benutzen, haben gewöhnlich V3-Regionen mit wenigen positiv geladenen Aminosäuren, während diese bei CXCR4-verwendenden Viren gehäuft vorkommen. R5X4-trope Viren besitzen typischerweise ein V3-Ladungsmuster, das eher dem von X4-Envs ähnelt (Briggs, Tuttle et al. 2000; Resch, Hoffman et al. 2001; Jensen and van 't Wout 2003). Viren mit identischer V3-Schleife können sich in ihrem Tropismus dennoch unterscheiden, was nahe legt, dass der Tropismus durch weitere Faktoren beeinflusst wird (Huang, Eshleman et al. 2007; Low, Dong et al. 2007), z. B. durch die V1- und V2-Schleifen.

Durch die Bindung an den Korezeptor wird ein aminoterminal hydrophobes Fusionspeptid in der transmembranen HIV-Env gp41-Untereinheit exponiert, das mit der Membran der Zielzelle interagiert, sich in die Plasmamembran einlagert und deren Verschmelzung mit der Virushülle vermittelt. Es wird geschätzt, dass vier bis sechs Korezeptor-Moleküle (Kuhmann, Platt et al. 2000), mehrere CD4-Rezeptoren (Layne, Merges et al. 1990) und drei bis sechs Env-Trimere für die Ausbildung einer Fusionspore notwendig sind.

1.2.6.1.1 CD4- und Ko-Rezeptoren

Einer der zellulären Interaktionspartner von HIV ist der CD4-Rezeptor, der sich auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen befindet. Das 55 kD-große CD4-Protein gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und besteht aus vier extrazellulären, immunglobulinähnlichen Domänen.

HIV-gp120 bindet mit hoher Affinität an Bereiche in der aminoterminalen Domäne und ist auch für die Interaktion mit den Korezeptoren verantwortlich. Diese CD4 nachgeschalteten Interaktionspartner sind Chemokinrezeptoren, Mitglieder der Rhodopsin-Rezeptorfamilie und damit 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren. Neben CCR5 und CXCR4 wurden unter anderem CCR1 und CCR3 sowie die humanen Orphan-Rezeptoren BOB und Bonzo als Korezeptoren identifiziert, jedoch konnte nur für die beiden ersteren eine wichtige Funktion als Korezeptoren *in vivo* aufgezeigt werden (Clapham and McKnight 2001).

Der Chemokinrezeptor CCR5 ist für die bevorzugte Bindung der makrophagentropen Virusvarianten verantwortlich. CCR5-verwendende Viren sind die fast ausschließlich übertragenen Viren und prädominieren in der frühen Phase der Infektion. In Therapie-naiven Patienten liegt der Anteil der R5-Population bei 80 bis 90%, nach einer Behandlung sinkt dieser auf etwa 50% (Scarlati, Tresoldi et al. 1997).

CXCR4 dient primär den lymphotropen HIV-Varianten als Kofaktor für den Eintritt in primäre T-Zellen und humane T-Zelllinien. CXCR4-benutzende (X4-Viren) HIV-1-Isolate treten in etwa 30 bis 50% der infizierten Individuen auf, und sind typischer Weise mit einem progressiven Krankheitsverlauf durch raschen Verlust an CD4⁺-T-Zellen assoziiert (Philpott 2003).

Die Faktoren, die das erst spätere Auftreten der X4-Viren in der Infektion *in vivo* beeinflussen, sind nicht geklärt, wobei die Beteiligung von neutralisierenden Antikörpern vermutet wird. Der Übergang der Verwendung von CCR5 zu CXCR4 als Korezeptor verläuft gewöhnlich über ein dualtropes Stadium. In etwa 50% der HIV-Infizierten kommt es zu einem Korezeptor-*switch* (Scarlati, Tresoldi et al. 1997).

1.2.6.2 Vorgänge nach der Membranfusion

Bei einem *uncoating* genannten Prozess wird das virale RNS-Genom ins Zytoplasma freigesetzt und die reverse Transkription findet in einem Komplex (*reverse*

transcription complex, RTC) aus RNS-Genom, den viralen Proteinen Matrix, Integrase und Vpr und noch nicht identifizierten zellulären Proteinen statt. Der RTC reift zum PIC (*pre-integration complex*), der entlang von Aktinfilamenten zum Nukleus gelangt und durch Kernporen ins Kernplasma eindringt.

Mithilfe der viralen Integrase kommt es zur Integration der HIV-cDNS in das Wirtszellgenom, präferentiell in die Region aktiver Gene. Auch zelluläre Faktoren, wie LEDGF/p75, scheinen einen essentiellen Beitrag zu diesem Prozess zu leisten (Llano, Saenz et al. 2006). Tat agiert dann durch die Rekrutierung von zellulären Faktoren (z.B. für das Chromatin-remodelling) zum 5'-LTR als Transaktivator der viralen Genexpression. In der frühen Phase der Infektion werden vielfach-gespleißte Transkripte generiert, die in die Proteine Tat, Nef und Rev translatiert werden. Die Akkumulation von Rev im Nukleus liefert das Signal für den Export von nicht oder einfach gespleißten mRNAs, die für Gag, Pol, Env und die akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Vpu kodieren.

Nach der Translation werden die Proteine zur Plasmamembran transportiert, wo die Assemblierung viraler Proteine und RNS stattfindet, was zur Ausknospung unreifer Viruspartikel von der Zellmembran führt (Ganser-Pornillos, Yeager et al. 2008). Der letzte Schritt im HIV-Replikationszyklus wird durch die virale Protease vermittelt, die nach autokatalytischer Spaltung die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine prozessiert. Diese Modifikationen ziehen strukturelle Umlagerungen nach sich, die zur Formung des reifen infektiösen Viruspartikels führen.

1.3 Antiretrovirale Therapie

Das Ziel der antiretroviralen Therapie besteht darin, das Leben des Patienten bei möglichst guter Gesundheit und Lebensqualität zu verlängern. Die langfristige Kontrolle der HIV-Infektion durch HAART (*highly active antiretroviral therapy*) ist möglich, jedoch aufgrund der Persistenz viraler Reservoirs in Form von latent HIV-infizierten CD4⁺-T-Zellen und Makrophagen, keine Eradikation und daher keine Heilung.

Als virologischen Therapieerfolg bezeichnet man eine Reduktion der Viruslast unter die Nachweisgrenze von 50 viralen RNS-Kopien pro ml Blut, ein

immunologischer Therapieerfolg bedeutet, je nach Studie, einen Anstieg auf 200 bzw. 500 CD4⁺-T-Zellen pro µl Blut. Als klinischen Erfolg kann man das Ausbleiben von opportunistischen Infektionen und anderen AIDS-assoziierten Erkrankungen werten.

In Industrienationen sind die Morbiditäts- und Mortalitätsraten unter HAART rückläufig. Die hohen Kosten dieser Pharmako-Therapie, deren fehlende Verfügbarkeit und die ungenügende medizinische Infrastruktur machen aber in Entwicklungsländern eine flächendeckende Anwendung unmöglich.

1.3.1 HAART (highly active antiretroviral therapy)

HAART ist eine Therapieform, bei der zwei bis drei Wirkstoffe miteinander kombiniert werden, dazu zählen meist zwei Reverse Transkriptase-Inhibitoren und ein Proteasehemmer. In 2007 bzw. 2008 neu zugelassene Substanzklassen, wie der CCR5-Antagonist Maraviroc und der Integrasehemmer Raltegravir, bereichern das Medikamentenspektrum. Eine komplette antivirale Therapie in einer Tablette (Atripla[®] enthält Tenofovir, FTC und Efavirenz) ist 2007 Realität geworden. Aktuell sind 29 Einzel- und Kombinationspräparate für die Therapie der HIV-Infektion zugelassen. Diese stammen aus insgesamt 5 verschiedenen Wirkstoffklassen:

1. Nukleosidische und nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)
2. Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)
3. Protease-Inhibitoren (PIs)
4. Integrase-Inhibitoren
5. *Entry*-Inhibitoren (Korezeptor-Antagonisten und Fusionsinhibitoren)

Die Wirkungsweise der nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren besteht darin, dass sie als alternative Substrate mit physiologischen Nukleosiden konkurrieren, dazu müssen sie zunächst aktiviert werden. Der Nucleosid-Analogon-Einbau in die cDNS induziert aufgrund fehlender Phosphodiester-Bindungen eine Kettenabbruch-Reaktion. Nukleosid-Analoga sind zumeist initial gut verträglich, können aber Ursache eines breiten Spektrums von Langzeitnebenwirkungen wie Polyneuropathien und Lipoatrophie sein. Das 1987 zugelassene AZT (Retrovir[®]) war

das erste antiretrovirale Medikament (Fischl, Richman et al. 1987) aus dieser Wirkstoffklasse.

Die nicht-nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren wurden 1990 erstmals beschrieben. Im Gegensatz zu den nukleosidischen RT-Inhibitoren müssen sie nicht aktiviert werden und binden direkt und nicht-kompetitiv an einen Bereich nahe der Nukleosid-Bindestelle der Reversen Transkriptase. Der gebildete Komplex blockiert eine katalytisch aktive Bindungsstelle des Enzyms, was in einer Verlangsamung der Polymerisation und damit einer Hemmung der Virusreplikation resultiert.

Problematisch ist bei dieser Wirkstoffklasse die schnelle und hohe Resistenzentwicklung, wahrscheinlich begünstigt durch die lange Halbwertszeit (Muro, Droste et al. 2005). Schon die einmalige Nevirapin-Gabe im Rahmen einer Transmissionsprophylaxe kann zu einer Resistenz führen. Dennoch wird Nevirapin zur Prävention der Mutter-zu-Kind-Transmission erfolgreich eingesetzt (Luo, Akwara et al. 2007). Die NNRTIs haben sich in Kombination mit NRTIs als sehr effektiv erwiesen. Des Weiteren macht die gute allgemeine Verträglichkeit, wie etwa von Nevirapin und Efavirenz, sie zu einem wichtigen Bestandteil der antiretroviralen Therapie.

Durch Protease-Inhibitoren wie Ritonavir, Saquinavir und Indinavir, wird die proteolytische Spaltung des Gag-Pol-Polyproteins gehemmt, so dass nicht-infektiöse Viruspartikel entstehen. Proteasehemmer bilden einen essentiellen Teil der HIV-Therapie, trotz der gastrointestinalen Nebenwirkungen und den Problemen bei der Langzeitbehandlung, beispielsweise sind sie in das Lipodystrophie-Syndrom involviert.

Den drei beschriebenen klassischen Wirkstoffklassen stehen mit den Integrase- und den *Entry*-Inhibitoren zwei neue gegenüber. Raltegravir (Isentress[®]) wurde 2007 als erster Integrase-Hemmer zugelassen, seine Wirkung basiert auf dem Prinzip der Strangtransfer-Inhibition. Raltegravir hemmt die Integration von HIV-1- und HIV-2-Stämmen. Darüber hinaus führt der sehr potente Integrase-Inhibitor zu einem signifikant schnelleren Abfall der Viruslast als RT-Inhibitoren (Grinsztejn, Nguyen et al. 2007; Markowitz, Nguyen et al. 2007). Über Langzeittoxizitäten ist derzeit noch nichts bekannt, aber die Resistenzentwicklung stellt bereits ein Problem dar.

Die *Entry*-Inhibitoren werden in drei Wirkstoffklassen eingeteilt: *Attachment*-Inhibitoren, Korezeptor-Antagonisten und Fusionsinhibitoren. Die *Attachment*-

Inhibitoren befinden sich noch in klinischer Erprobung. Sie stellen aufgrund der verschiedenen Mechanismen, über die die Interaktion zwischen dem viralen gp120 und dem zellulären CD4-Rezeptor gestört werden kann, eine heterogene Substanzklasse dar. TNX-355 zum Beispiel, ist ein monoklonaler Antikörper, der direkt an den CD4-Rezeptor bindet, wodurch die Konformationsänderung von gp120 und damit die Bindung an den Korezeptor gehemmt werden. *Attachment*-Inhibitoren könnten eine Rolle bei der Entwicklung von Mikrobiziden (siehe 1.3.2) spielen.

Im September 2007 wurde der bislang einzige CCR5-Antagonist, Maraviroc (Celsentri®), für die HIV-Therapie zugelassen. Dieser Antagonist bindet allosterisch an das Rezeptormolekül, was die Bindung des viralen Proteins erschwert. Der CCR5-Antagonist Vicriviroc (SCH-D) befindet sich in Phase III-Studien und ist ebenso wie das Chemokin-Derivat Maraviroc bislang gut verträglich. Einen deutlichen Hinweis auf die medizinische Unbedenklichkeit der medikamentösen Antagonisierung der CCR5-Rezeptoren liefert der homozygote CCR5 $\Delta 32$ -Gendefekt des Menschen (Rana, Besson et al.) der eine fehlende Expression des CCR5-Rezeptors auf der Zelloberfläche ohne offensichtliche Symptomatik zur Folge hat.

Der *Knockout* und die Blockade von CXCR4-Rezeptoren in Tierexperimenten hatte in verschiedenen Studien (Nagasawa, Tachibana et al. 1998; Tachibana, Hirota et al. 1998; Zou, Kottmann et al. 1998) extreme Konsequenzen, eine Begründung für die im Vergleich zu CCR5- weniger weit fortgeschrittene Entwicklung von CXCR4-Antagonisten. Auch im Menschen wurden Studien durchgeführt, die zu Nebenwirkungen führten, aber auch Anlass zu Hoffnung gaben: AMD11070 ist ein CXCR4-Antagonist, dessen Wirksamkeit in zwei Pilotstudien gezeigt werden konnte. Aufgrund von Lebertoxizität wurde die Entwicklung jedoch vorläufig gestoppt. Die Vorläufersubstanz AMD3100 wird *in vitro* zur Inhibition des Eintritts von X4-Viren in Zielzellen verwendet.

Das subkutan applizierte Enfuvirtid (T20) ist der Prototyp und einzige zugelassene Fusionsinhibitor. Durch seine Bindung an die Intermediärstruktur des gp41, wobei die C-terminale Region im Virus verankert und die N-terminale in der Zellmembran ist, stört es die Fusion des HI-Viruspartikels mit der Zielzelle. T20 wird in Kombination mit anderen Präparaten verabreicht. Ein Nachteil ist das relativ schnelle Auftreten von Resistenzen. Ein neuer Fusionsinhibitor ist VIRIP (*virus-inhibitory peptide*). VIRIP wurde aus humanem Hämofiltrat isoliert und konnte durch leichte Modifikationen in seiner den HIV-Eintritt, durch Interaktion mit dem gp41-

Fusionspeptid, blockierenden Funktion noch gesteigert werden (Munch, Standker et al. 2007).

Eine weitere neue Substanzklasse bilden die Maturationsinhibitoren, die die HIV-Replikation ihrem Namen entsprechend erst spät im Replikationszyklus hemmen. Die Umwandlung des HIV-1-Capsid-Vorläuferproteins zum reifen Capsid-Protein p24 wird unterbrochen (Li, Goila-Gaur et al.).

Neue Ansätze in der HIV-Prävention zielen auf die Entwicklung von Mikrobiziden, die den Eintritt von HIV über die Genitalmukosa verhindern können.

1.3.2 Mikrobizide

Mikrobizide stellen eine neue Klasse von in Entwicklung befindlichen prophylaktischen Produkten dar, die die Transmission von HIV blockieren sollen. In der derzeitigen Situation, ohne ein effektives Vakzin, bietet sich diese Strategie als vielversprechendste Alternative gegen die HIV-Epidemie an.

Mikrobizide können topisch zum Beispiel als Gele, Cremes oder Zäpfchen vaginal und rektal appliziert werden. Um als Produkt erfolgreich zu sein, muss ein Mikrobizid verschiedene Kriterien erfüllen: zu den essentiellen Charakteristika gehören neben der Wirksamkeit gegen HIV die Sicherheit und die Akzeptanz des Produkts beim Konsumenten. Der Begriff Sicherheit wird hier im Sinne von nicht-toxisch verwendet. Das heißt, dass das Mikrobizid keine Läsionen im Epithelium oder Entzündungen der Mukosa hervorrufen sowie nicht mit natürlichen Abwehrmechanismen, wie beispielsweise dem geringen pH-Wert der Vagina, interferieren darf. Kritische Faktoren sind außerdem die Stabilität und die Kosten des Produkts unter den klimatischen bzw. sozialen Bedingungen, die in den meisten Entwicklungsländern vorherrschen. Zusätzlich wäre die Wirksamkeit gegen andere sexuell übertragbare Krankheiten von großem Vorteil, unter anderem aufgrund der potentiellen Reduzierung der erhöhten HIV-Inzidenz, die zum Beispiel im Zusammenhang mit HSV-Infektionen bekannt ist.

Basierend auf ihrem Wirkmechanismus werden die Mikrobizide in fünf Kategorien eingeteilt (Hendrix et al. 2008):

- unspezifische Agentien mit
 1. Substanzen, die die Immunabwehr in der Vagina verstärken

2. Membran-lyisierende Wirkstoffe
3. Membran-bindende Inhibitoren
- Spezifische Agentien
4. Inhibitoren des *Entry* und der Fusion
5. RT-Inhibitoren

Ein Weg zur unspezifischen Inhibition von HIV besteht in der Verstärkung der natürlichen antimikrobiellen Abwehr der Vaginalflora. Zwei Produkte in klinischer Entwicklung (Acidform[®] und Buffergel[®]) sorgen auch in der Anwesenheit von Samenflüssigkeit für den Erhalt des in der Vagina vorherrschenden niedrigen pH-Wertes. Produkte, die die Virushülle zerstören, fallen in die zweite Kategorie. Einen Rückschlag erhielt die Mikrobizid-Entwicklung durch eines dieser unspezifisch wirkenden Produkte, Nonoxynol-9 (N-9). Während einer klinischen Studie der Phase III, zur Anwendung des Spermizids N-9 als topisches Mikrobizid im Jahr 2000, war die Inzidenz der Serokonversion bei N-9 verwendenden Frauen höher als bei Frauen, die ein Placebo bekamen. Die lokale Toxizität von Nonoxynol-9 resultierte anscheinend in Schädigungen des Epithels und der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in den Genitaltrakt (Van Damme, Ramjee et al. 2002; Hillier, Moench et al. 2005). Die Entwicklung von Mikrobiziden, mit einem Schwerpunkt auf spezifisch wirkenden Stoffen, wurde dennoch weiter vorangetrieben.

Ein dritter Wirkmechanismus involviert die physikalische Blockierung der Anlagerung des Virus an die Zielzelle, indem negativ geladene Polyanionen elektrostatisch an die positiv geladene HIV-Hüllmembran binden. Pro2000[™] ist ein Produkt, dessen Wirkung auf diesem Prinzip beruht, und wird derzeit in einer klinischen Phase-III-Studie getestet. Es könnte vor der Infektion mit HIV, HSV und *Neisseria gonorrhoeae* schützen. Während die Polyanionen unspezifisch wirken, befinden sich zusätzlich mehrere HIV-spezifische Inhibitoren, die die gp41-induzierte Fusion oder die CCR5-Bindung verhindern, in der Entwicklung zum Mikrobizid und stellen die vierte Kategorie dar.

In der fünften Kategorie, den RT-Inhibitoren, ist besonders ein Medikament, Tenofovir, als Mikrobizid geeignet, da es im Gegensatz zu den meisten anderen Reverse Transkriptase-Inhibitoren ein Nukleotidanalogen ist, so dass für seine Aktivierung intrazellulär nur zwei, statt drei, Phosphorylierungsschritte notwendig sind. Klinische Studien werden derzeit mit einem 1%-igen Tenofovir-Gel

durchgeführt. Aktuell werden auch nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit als Mikrobizid getestet. Diese NNRTIs sind hochpotent und haben eine lange Halbwertszeit.

Generell ist zu erwähnen, dass trotz intensiver Forschung und Entwicklung aktuell noch kein Mikrobizid zugelassen wurde.

1.3.3 Phytotherapie

Die Phytotherapie gehört zu den ältesten medizinischen Therapien und basiert hauptsächlich auf der Phytopharmakognosie (Heilpflanzenkunde).

Diese Therapieform dient der Behandlung und Prävention von Krankheiten und Befindlichkeitsstörungen, dabei kommen als Phytopharmakon nur Pflanzen und Pflanzenteile zur Anwendung. Therapeutisch appliziert werden diese frisch oder in Form von Tee, Säften, Tinkturen, Pulvern, Auskochungen und Extrakten. Diese Phytopharmaka bilden als Mehr- und Vielstoffgemische eine wirksame Einheit, wobei eine chemische Isolierung eines einzelnen Arzneistoffes nicht vorgesehen ist.

Auf der langen Liste der Pflanzen, mit in vielen Fällen wissenschaftlich nachgewiesener Heilwirkung, befinden sich auch Melisse (*Melissa officinalis*), Pfefferminze (*Menthae x piperita*) und Salbei (*Salvia officinalis*), die zur weltweit verbreiteten Familie der Lamiaceae (Lippenblütler) und zu deren artenreichster Unterfamilie (3700 Arten), den Nepetoideae, gehören.

Von Melissenpräparaten, wie Flüssig- oder Trockenextrakten, ist bekannt, dass sie sedativ und spasmolytisch wirken, darüber hinaus haben Melissenblätter antimikrobielle und antivirale Wirkung. Ebenso wie die Melisse enthalten auch die Pfefferminze und der Echte Salbei viele Bitter- und Gerbstoffe, die wie auch die Flavonoide, die zu den Polyphenolen gehören, einen wichtigen Platz unter den therapeutisch wirksamen Bestandteilen von Heilpflanzen einnehmen.

Eine antivirale Wirkung von Melissen-Extrakten gegen HSV-1 und HSV-2 wurde schon früh beobachtet (Cohen et al. 1964; Dimitrova et al. 1993) (Mohrig 1996), und *in vitro*-Experimente haben gezeigt, dass die Inhaltsstoffe der Melisse offensichtlich durch Anlagerung an die Oberfläche der Zellen und/ oder Viren die Rezeptoren blockieren und somit das Anheften der Viren an die Zellen verhindern (Wöbling 1994).

Für die erwähnten drei Pflanzenspezies, wie auch einige weitere Exemplare aus der Familie der Lamiaceae, wurde der Mechanismus der antiviralen Eigenschaften gegen HSV-1 und HSV-2 durch die Beobachtung, dass sich der anti-HSV-Effekt der wässrigen Extrakte gegen freie Viruspartikel richtete (Nolkemper, Reichling et al. 2006), weiter eingegrenzt. Des Weiteren zeigte der wässrige Extrakt von Melisse *in vitro* anti-HIV-Aktivität durch die Inhibition der Reversen Transkriptase, dagegen hatte das ätherische Öl dieser Pflanzenspezies keinen offensichtlichen antiviralen Effekt (Yamasaki, Nakano et al. 1998). Außerdem fanden Watanabe und Kollegen auch eine die HIV-1-Reverse-Transkriptase hemmende Wirkung im methanolischen Extrakt von *Salvia officinalis* (Watanabe 2000).

1.4 Die humane lymphoide Histokultur (HLH) als *ex vivo*-Modellsystem der HIV-Infektion

Die kritischen Ereignisse in der Progression zu AIDS laufen im lymphatischen System ab. Innerhalb dieses Gewebes kommt es zunächst zur Verschlechterung und schließlich zum Kollabieren des gesamten Systems der Zellinteraktionen, die für die Immunfunktionen essentiell sind.

Primäre Kulturen und Kokulturen von isolierten Zellen können weder das komplette zelluläre Repertoire des Lymphgewebes, bestehend aus CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen (Margolis, Glushakova et al. 1998), noch die funktionelle Beziehung zur lymphoiden Gewebestruktur wiedergeben. Die *ex vivo* humane lymphoide Aggregationskultur (HLAC – *human lymphoid aggregate culture*) stellt ein heterogenes Zellsystem primärer Zellen dar, das ohne äußere Stimuli mit HIV infiziert werden kann (Eckstein, Penn et al. 2001).

Die exogene Stimulation mit pflanzlichen Lektinen und Interleukin-2, die beispielsweise bei der Kultivierung von PBMCs angewendet werden, führt zu Veränderungen des Expressionsmusters der Chemokin-Rezeptoren (Bleul, Wu et al. 1997), im HLAC-Modell verbleiben das Expressionsniveau von CCR5 und CXCR4 auf T-Lymphozyten während der Kultivierungsperiode dagegen stabil (Schramm, Penn et al. 2000). Eine Limitation dieses experimentellen Systems ist es, dass aufgrund der nur kurzen Beobachtungszeit keine adaptiven Immunantworten simuliert werden können.

In vivo können durch die Immunantwort jedoch die CCR5- und CXCR4-Expression moduliert und die Verteilung der Korezeptoren unter den CD4⁺-T-Zellen verändert werden (Malkevitch, McDermott et al. 2001).

Im peripheren Blut und Lymphgewebe von HIV-positiven Individuen sind auch ruhende und naive CD4⁺-T-Zellen produktiv infiziert (Ostrowski 1999);(Blaak, van't Wout et al. 2000), diese sind aber *in vitro* hoch-resistent gegenüber der Infektion mit HIV-1 (Stevenson 1990; Chou 1997). Dies verhält sich anders im endogenen Mikromilieu der lymphoiden Histokulturen, die die HIV-1-Replikation in allen CD4⁺-T-Zellen erlaubt (Eckstein, Penn et al. 2001).

Zusammenfassend reflektiert dieses Gewebesystem wichtige Ereignisse im Verlauf der viralen Infektion wie die CD4⁺-T-Zelldepletion und die Infektion von verschiedenen Zelltypen. HIV-infizierte Kulturen humanen lymphoiden Gewebes stellen außerdem eine Methode zur separaten Evaluierung des Beitrages von viralen und zellulären Faktoren während der HIV-Infektion dar. Das Modell erlaubt einen Vergleich, indem man die Infektion des Gewebes von verschiedenen Donoren mit einem Virus-Isolat der Infektion des Gewebes nur eines Donors durch mehrere Virus-Isolate gegenüberstellt.

1.5 HIV-1-Gruppe O-Viren in der Literatur

Die HIV-1-Gruppe O-Isolate verbreiten sich langsam aber kontinuierlich weltweit. Die im westlichen Zentralafrika endemischen Gruppe O-Infektionen wurden inzwischen auch in Europa und den USA identifiziert (Jaffe and Schochetman 1998)

Die HIV-1-Gruppe O weist signifikante Sequenzunterschiede gegenüber der HIV-1 Gruppe M auf (Sequenzdiversität von 24-49%) (Gurtler, Hauser et al. 1994; Vanden Haesevelde, Decourt et al. 1994; Loussert-Ajaka, Chaix et al. 1995).

Diese genotypischen Differenzen beeinflussen phänotypische Charakteristika der HIV-1-Replikation und -Struktur. Zum Beispiel besitzen die HIV-1-Gruppe O-Isolate intrinsisch Resistenzen gegenüber mehreren NNRTIs (Descamps, Collin et al.; Descamps, Collin et al.; Quinones-Mateu, Soriano et al.). *In vitro*-Daten nach sind Gruppe O-Viren weniger suszeptibel für Protease-Inhibitoren als Gruppe M-Isolate (Quinones-Mateu, Albright et al. 1998). Einen weiteren Unterschied betrifft Cyclophilin A, das die HIV-1 Gruppe M-Virusproduktion inhibiert, nicht aber die HIV-

1-Gruppe O-Replikation, obwohl die analysierten O-Typen ähnlich wie andere HIV-1-Isolate auch Cyclophilin A inkorporieren (Braaten, Franke et al.; Wiegers and Krausslich).

Trotz dieser Unterschiede ist bei HIV-1-Gruppen M- und O-infizierten Patienten eine vergleichbare Pathogenese beschrieben (Dittmar, Zekeng et al. 1999). Jedoch benutzen primäre HIV-1-Gruppe O-Isolate vorwiegend den Chemokinrezeptor CCR5, auch in späteren Stadien der HIV-Infektion und während sich das Vollbild AIDS bereits ausgeprägt hat (Vallejo, Heredia et al. 1998; Dittmar, Zekeng et al. 1999). Dementsprechend und anders als bei der HIV-1-Gruppe M, induzieren die meisten untersuchten HIV-1-Gruppe O-Isolate keine Synzytienbildung und sind makrophagen-trop, auch im fortgeschrittenen Verlauf der Krankheit (Dittmar, Zekeng et al. 1999). Dennoch gestaltet sich der Verlauf der Erkrankung anscheinend sehr ähnlich.

Es wurden substantielle Unterschiede in der Fitness zwischen primären HIV-1-Isolaten beschrieben: so zeigen Primärisolate vom HIV-1-Gruppe M Subtyp B typischerweise eine 100-fach höhere Fitness, die die Fähigkeit von Viren zur Replikation in PBMCs beschreibt, als primäre Subtyp C-Isolate (Ball, Abraha et al. 2003). Ariën und Kollegen berichten 2005 in ihrer Studie von großen Fitness-Unterschieden zwischen HIV-1-Gruppe M-, HIV-2- und HIV-1-Gruppe O-Isolaten. Die aus Konkurrenzexperimenten erhobenen Daten suggerieren, dass Gruppe O-Viren mindestens eine um das 100-fache geringere Fitness aufweisen als HIV-2- und HIV-1-Gruppe M-Isolate. Neben Experimenten in PBMCs, die die extrem unterschiedlichen Replikationsfähigkeiten aufdeckten, wurde im Vergleich mit den HIV-1 Subtyp M-Isolaten ein 10- bis 100-fach weniger effizienter Transfer der HIV-1-Gruppe O-Viren von dendritischen Zellen auf T-Zellen beobachtet (Arien, Troyer et al. 2005).

Zusammenfassend wird geschlossen, dass die reduzierte Fähigkeit zur Replikation der HIV-1-Gruppe O-Viren zu einer verminderten Transmission führt und damit zu einer geringen Prävalenz in der Population und limitierten geographischen Verbreitung beiträgt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Unterschiedliche pathologische Eigenschaften verschiedener HIV-Isolate, welche wahrscheinlich sowohl durch Wirts- als auch virale Faktoren beeinflusst werden, finden in den meisten Studien keine Berücksichtigung, besonders die HIV-1-Isolate vom O-Typ werden vernachlässigt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, das pathologische Potential primärer HIV-1-Isolate der Gruppe O im Vergleich mit Primärisolaten der Gruppe M und laboradaptierten Viren zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden die Viren in zwei Modellsystemen analysiert, der humanen *ex vivo* Tonsillen-Histokultur und Kulturen primärer T-Lymphozyten. Ein wichtiger Aspekt der HIV-Pathogenese, die Depletion von CD4⁺-T-Zellen, wurde in der Tonsillen-Histokultur bestimmt, während die Bestimmung des Ausmaßes und der Kinetik der HIV-1-Replikation in beiden Systemen erfolgte. Als ein weiteres wichtiges phänotypisches Charakteristikum wurde der Korezeptor-Gebrauch der verschiedenen HIV-Primärisolate untersucht.

Zur Entwicklung alternativer Therapie- bzw. Präventionsformen, wie beispielsweise von Mikrobiziden, ist die Erforschung neuer Wirkstoffe erforderlich. Die antivirale Wirkung bestimmter wässriger Extrakte der Lippenblütler (Lamiaceae) ist bekannt; unter anderem wurde bereits die inhibitorische Aktivität wässrigen Melissen-Extrakts gegen HIV-1 (Yamasaki, Nakano et al. 1998) und gegen HSV-1 und HSV-2 (Nolkemper, Reichling et al. 2006) beschrieben. Angesichts dessen wurde in dieser Arbeit die Wirkung wässriger Extrakte von *Melissa officinalis*, *Mentha x piperita* und *Salvia officinalis* gegen HIV-1, und deren antiviralen Mechanismus untersucht. Als weiterführender Aspekt zielt diese Studie ebenso auf die Identifizierung und Erforschung der antiviralen Wirkung aus Pflanzenextrakten gewonnener Einzelsubstanzen der Stoffgruppe der Flavonoide und der Aufklärung des Mechanismus des anti-HIV-1-Effekts ab.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Laborausstattung

| | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| Bakterienkultur-Schüttler HT | Infors, Bottmingen, Schweiz |
| Balance L610D | Sartorius, Göttingen |
| Balance R180D-D1 | Sartorius, Göttingen |
| Durchflusszytometer FACSCalibur | Beckton Dickinson, Heidelberg |
| Elisa Reader Multiskan EX | Thermo-Labsystems, Egelsbach |
| Flüssigstickstofftank Chronos Biosafe | Messer Griesheim |
| Gefrierschrank -80°C Hera freeze | Heraeus, Hanau |
| Gel Dokumentation Digit Store Duo | Intas, Göttingen |
| Inkubator C200 | Labotect, Göttingen |
| Inkubator Function Line | Heraeus, Hanau |
| Invers-Mikroskop LSM510 | Zeiss, Göttingen |
| Kühl-und Gefrierschrank | Liebherr, Ochsenhausen |
| Luminoskan Ascent | Thermo-Labsystems, Egelsbach |
| Multikanalpipetten | Thermo Labsystems, Egelsbach |
| pH Meter 761 Calimatic | Knick, Berlin |
| Pipetten | Gilson, Villies Le Bel, Frankreich |
| Pipettierhilfe "Accu-Jet pro" | Brand, Wertheim |
| Power supply EPS 600 | Pharmacia Biotech, Erlangen |
| Spektrophotometer DU 640 | Beckman-Coulter, München |
| Sterilbank SterilGard III Advance | The Baker Company, Sanford |
| Tischzentrifuge Biofuge fresco | Heraeus, Hanau |
| Tischzentrifuge Biofuge pico | Heraeus, Hanau |
| Tischzentrifuge Multifuge 3S-R | Heraeus, Hanau |
| Ultrazentrifuge L8-M | Beckman, München |
| Zentrifuge J2-HC/HS | Beckman, München |
| Luminometer für MTT | Tecan, Crailsheim |
| Western Blot | Eastman Kodak, Rochester, USA |

2.1.2 Chemikalien

| | |
|---|--------------------------------------|
| Agar | BD Falcon, Heidelberg |
| Agarose NEE0 Ultra-quality | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) | Merck, Darmstadt |
| Ampicillin | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Chroma, Münster |
| Concavalin A | Sigma-Aldrich, München |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄) | Roth, Karlsruhe |
| Di-methylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |
| Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | AppliChem, Darmstadt |
| DNS ladder 1kb SL | Eurogen, Seraing, Belgien |
| Ethanol 100% (v/v) | JT Baker, Deventer, Niederlande |
| Ethidiumbromid | Merck, Darmstadt |
| Ethylendiamintetra-Essigsäure (EDTA) | Acros Organics, Geel, Belgien |
| Ficoll | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Fötale Kälberserum | Bio Whittaker, Verviers, Belgien |
| Fungizone | Gibco BRL, Gaithersberg, USA |
| Gentamycin | Gibco BRL, Gaithersberg, USA |
| Glycerol | Zentralbereich INF, Zentrallager |
| Hefe-Extrakt | Roth, Karlsruhe |
| Hepes | Roth, Karlsruhe |
| Humanes AB-Serum | Pan Biotech, Aidenbach |
| Isopropanol | Zentralbereich INF, Zentrallager |
| Kaliumbicarbonat (KHCO ₃) | Ferak, Berlin |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Kalium-dihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Grüssing, Filsum |
| Kanamycin | Roth, Karlsruhe |
| L-Glutamin | Gibco BRL, Gaithersberg, USA |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, München |
| Natriumacetat (NaCH ₃ CO ₂) | Grüssing, Filsum |
| Natriumchlorid (NaCl) | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumcitrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇) | JT Baker, Deventer, Niederlande |
| Natrium-dihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Natrium-dodecylsulfat (SDS) | Serva, Heidelberg |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck, Darmstadt |
| Natriumpyruvat | Invitrogen, Karlsruhe |
| Nicht-essentielle Aminosäuren | Invitrogen, Karlsruhe |
| Paraformaldehyd | Roth, Karlsruhe |
| Penicillin/Streptomycin | Sigma-Aldrich, München |
| Phytohemagglutinin (PHA) | Sigma-Aldrich, München |
| Rainbow Marker | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Rekombinantes humanes Interleukin 2 | Biomol, Hamburg |
| Saccharose | Riedel-de Haën, Seelze |
| Salzsäure (HCl) | Merck, Darmstadt |
| Tris | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden |
| Trypsin – EDTA Lösung 0,25% | Biochrom, Berlin |
| Trypton / Pepton | Roth, Karlsruhe |
| Tween-20 | Roth, Karlsruhe |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | JT Baker, Deventer, Niederlande |

2.1.3 Plastikverbrauchsmaterial

| | |
|--|--------------------------------------|
| Kryoröhrchen 2 ml | Greiner bio-one, Nürtingen |
| Maxi sorb 96-well-Platten | Nunc, Wiesbaden |
| Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl | Nerbe Plus, Winsen |
| Plastikpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml | Greiner bio-one, Nürtingen |
| Polystyrenröhrchen mit Zellsiebkappe | BD Falcon, Heidelberg |
| Reaktionsgefäße 1.5 ml | Sardstedt, Nürnberg |
| Skalpell Nr.21 pfm | FEATHER, Osaka, Japan |
| Ultrazentrifugenröhrchen Polyclear | Seton Scientific, Los Gatos, CA, USA |
| Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ² | Neolab, Heidelberg |
| Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-, 96- well | Neolab, Heidelberg |
| Zellkulturschalen 10 cm ² , 15 cm ² | Neolab, Heidelberg |
| Zellsiebe 45 und 70 µm | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Zentrifugenröhrchen 14 ml | Greiner bio-one, Nürtingen |
| Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml | Neolab, Heidelberg |

2.1.4 Kits und andere Materialien

| | |
|--|--------------------|
| BCA Protein Assay Kit | PIERCE |
| β-Lactamase Loading Solutions (CCF2 Färbelösung) | Invitrogen |
| Galacto-Star Kit | Applied Biosystems |
| Lipofectamin 2000 | Invitrogen |
| NucleoBond AX 500 Kit | Macherey-Nagel |
| NucleoSpin Extract II | Macherey-Nagel |
| Amicons, 15 ml | Millipore |
| QIAamp Viral RNS Mini Kit | Qiagen |
| 3.5 or 12 kDa (Spectra/Por [®]) | Spectrum |
| Regenerated Cellulose (RC Dialyse- Membranen) | |

2.1.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen, New England Biolabs

Turbo DNase, Ambion

M-MuLV Reverse Transkriptase, New England Biolabs

Die Enzyme und zugehörige Puffer wurden dem Herstellerprotokoll entsprechend verwendet.

2.1.6 Antiseren

Primärantikörper:

Monoklonaler Maus-anti-huCD3-Antikörper (SK7), APC-konjugiert, BD Pharmingen

Monoklonaler Maus-anti-huCD8-Antikörper (SK1), PerCP-konjugiert, BD Pharmingen

Monoklonaler Maus-anti-HIV-1-p24 Capsid-Antikörper (mAK 183)

Polyklonaler Kaninchen-anti-HIV-1-p24 Capsid (CA1)-Antikörper

Polyklonaler Kaninchen-anti-HIV-1-gp120 Env-Antikörper

Sekundärantikörper:
Anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert, Dianova

2.1.7 Antivirale Substanzen

AMD3100 (Dr. José Esté, Badalona, Spanien): CXCR4-Inhibitor, in einer Konzentration von 1 – 10 μM eingesetzt

Enfuvirtid (Fuzeon[®], (T20) Roche, Indianapolis, USA): Fusionsinhibitor, der frisch in H_2O gelöst (9 mg/ml), und in einer Konzentration von 1-10 μM verwendet wurde

Efavirenz (Sustiva[®], Bristol-Myers Squibb, Jacksonville, USA): Reverse Transkriptase-Inhibitor, der als Trinklösung (30 mg/ml) geliefert und in Zellkultur-Medium verdünnt [5 μM] wurde

SCH-D (Dr. Matthias Dittmar, London, England): CCR5-Inhibitor, Anwendung in einer Konzentration von 1 μM

2.1.8 Wässrige Lamiaceen-Extrakte

Getrocknete Blätter von Melisse (*Melissa officinalis* L.), Pfefferminze (*Mentha x piperita* L.) und Salbei (*Salvia officinalis* L.) wurden von Caesar & Lorenz (Hilden) erworben.

Alle Pflanzen wurden mikroskopisch und chromatographisch anhand ihrer Monographien in Pharmakopoea Europoea identifiziert. Die wässrigen Pflanzenextrakte wurden hergestellt, indem 10 g getrocknete Pflanzenblätter mit 100 ml kochendem Wasser übergossen, und für 15 Minuten inkubiert wurde, wie in Nolkemper *et al.* (2006) beschrieben. Nach dem Filtern und Abkühlen wurden die resultierenden Extrakte steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

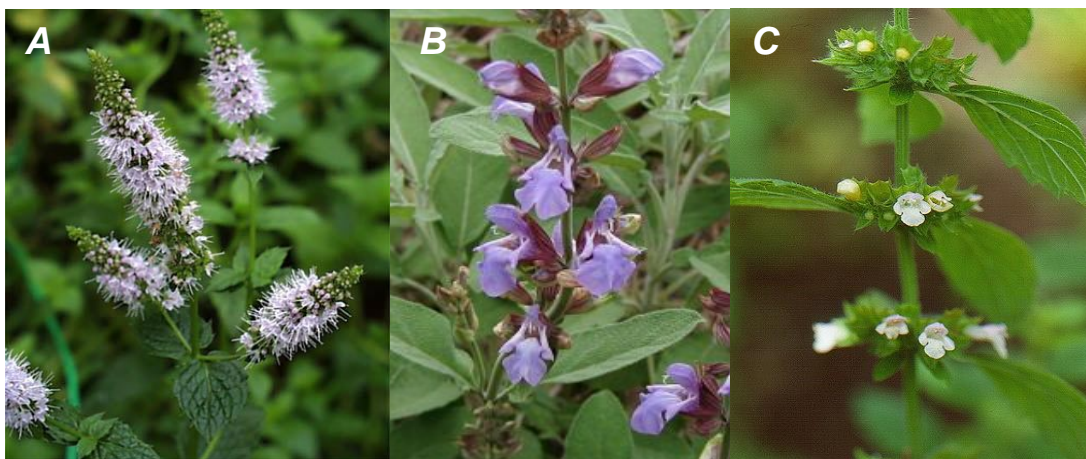


Abb. 2.1: Fotografien des Blütenstandes von (A) Pfefferminze (*Mentha x piperita*), (B) Salbei (*Salvia officinalis*), (C) Melisse (*Melissa officinalis*).

2.1.9 Flavonoide aus Lamiaceen und Verbenaceen

Die Flavonoide und phenolischen Derivate wurden aus Pflanzen der Familien der Lippenblütler (Lamiaceae) und der Eisenkrautgewächse (Verbenaceae) aufgereinigt (Prof. F. Bailleul an der Universität von Lille, Frankreich und Hennebelle 2007).

Nach dem Lösen in DMSO, zur Herstellung einer Stocklösung [10 mM] wurden die Flavonoid-Lösungen bei -20°C gelagert. Verdünnungen erfolgten in DMSO bzw. Zellkultur-Medium.

| Code | Molekulargewicht | Masse (mg) | DMSO-Zugabe (µl) für 10 mM-Lösung |
|---------|------------------|------------|--------------------------------------|
| LF-MP01 | 332 | 2,8 | 843,4 |
| LF-MP03 | 314 | 2,2 | 700,6 |
| LF-MP04 | 328 | 2,7 | 823,2 |
| LF-MP06 | 578 | 2,1 | 363,3 |
| LF-MP08 | 888 | 3,0 | 337,8 |
| LF-MP09 | 756 | 3,4 | 449,7 |
| LF-LA05 | 390 | 4,6 | 1179,5 |
| LF-LA06 | 390 | 2,8 | 717,9 |
| LF-LA07 | 388 | 1,8 | 463,9 |
| LF-LA08 | 624 | 4,2 | 673,1 |
| LF-LA09 | 666 | 7,0 | 1051,1 |
| LF-LA10 | 610 | 2,6 | 426,2 |
| LF-LA11 | 756 | 11,6 | 1534,4 |
| LF-LA12 | 624 | 5,3 | 849,4 |
| LF-LA13 | 488 | 2,0 | 409,8 |
| LF-LA14 | 446 | 1,7 | 381,2 |
| LF-LA15 | 462 | 1,6 | 346,3 |
| LF-LA16 | 638 | 3,6 | 564,3 |
| LF-LA17 | 622 | 3,1 | 498,4 |
| LF-LA18 | 664 | 3,5 | 527,1 |
| LF-LA19 | 506 | 4,3 | 849,8 |
| LF-MKKA | 613 | 1,5 | 244,7 |
| LF-MKKB | 643 | 1,7 | 264,4 |
| LF-MKKC | 673 | 1,7 | 252,6 |

2.1.10 Fraktionen aus *Marrubium peregrinum*

Die oberirdischen Pflanzenteile und Blüten von *M peregrinum* (Grau-Andorn) wurden, wie in Hennebelle 2007 beschrieben, getrocknet und in pulverisierter Form nacheinander mit CH₂Cl₂, MeOH und H₂O bei Raumtemperatur (RT) extrahiert. Nach der Evaporation und Lyophilisierung der Extrakte folgte die Fraktionierung durch Gelfiltration (Sephadex LH-20) und schließlich die Aufreinigung der Fraktionen über Silicagel 60H -Säulen. Die einzelnen Fraktionen wurden in DMSO gelöst [10 mg/ml] und bis zu ihrer Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

| Fraktion | MP-03-Anteil (%) | Masse (mg) |
|------------|------------------|------------|
| LF-MPS1F1 | 0,6 | 63,7 |
| LF-MPS1F2 | 0,4 | 60,1 |
| LF-MPS1F3 | 29,3 | 50,0 |
| LF-MPS1F3P | 90,8 | 9,8 |
| LF-MPS1F4 | 14,3 | 91,5 |
| LF-MPS1F5 | 8,0 | 55,7 |
| LF-MPS2F1 | 0,0 | 73,1 |
| LF-MPS2F2 | 77,2 | 72,3 |
| LF-MPS2F3 | 69,7 | 36,2 |
| LF-MPS3F1 | 10,8 | 69,8 |
| LF-MPS3F3 | 89,0 | 40,9 |
| LF-MPS3F4 | 83,1 | 21,2 |

2.1.11 Flavonoide von Extrasynthese

Weitere Flavonoide (siehe Abb. 2.2) wurden von der Firma Extrasynthese in Frankreich bezogen. Gelöst wurden die Stoffe in DMSO und die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -20°C.

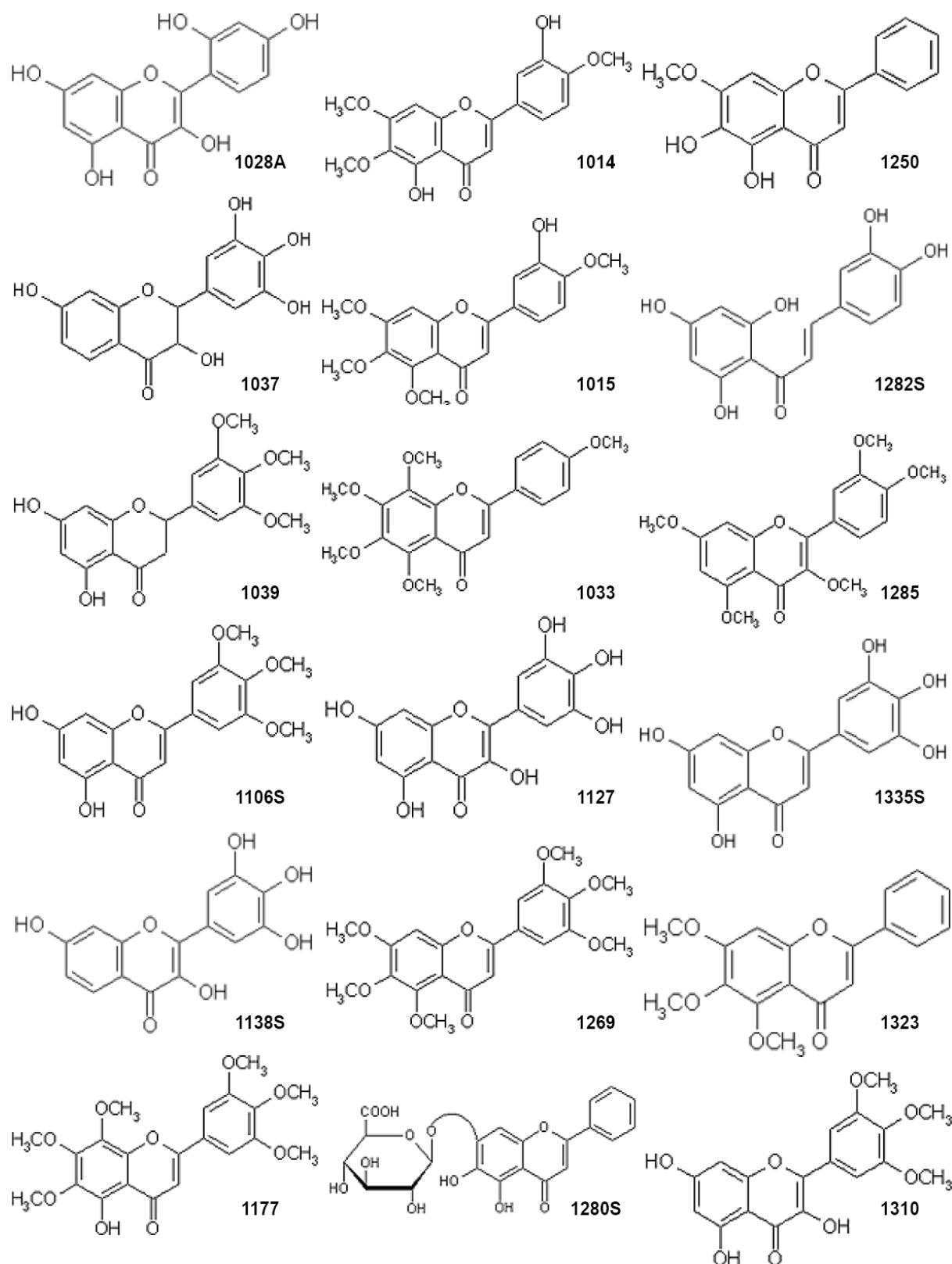


Abb. 2.2 Strukturformeln verschiedener Flavonoide.

2.1.12 Puffer und Lösungen**ACK-Lysepuffer**

Lösung A:

NH₄Cl 308 mMKHCO₃ 20 mM

Lösung B:

EDTA 1 mM

500 ml Lösung A zu 100 ml Lösung B; pH 7,6

Acrylamid/ Bisacrylamidlösung 29:1

30 % (v/v)

CCF2-Färbelösung für den Virionen-FusionstestCO₂-unabhängiges Medium 1 ml

CCF2 Lösung A 2 µl

CCF2 Lösung B 8 µl

Probenecid 10 µl

DNS-Ladepuffer für Agarosegele (5x)

Bromphenolblau 0,25 % (w/v)

Glycerin 50 % (v/v)

EDTA 50 mM

Tris-HCl, pH 7,5 50 mM

HBS-Puffer

NaCl 280 mM

Hepes 50 mM

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 1,5 mMin H₂O, pH 7,1**4 % Paraformaldehyd (PFA)**

Paraformaldehyd 4 % (w/v)

in 1 x PBS; pH 7,2; bei 60 - 80°C unter Rühren lösen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4

(phosphat- buffered saline, PBS)

NaCl 96 mM

Na₂HPO₄*2H₂O 10 mMNa₂H₂PO₄*H₂O 2,30 mM**PBS-T**

Tween-20 0,10 % (v/v)

in PBS

Protein-Probenpuffer (6 x)

SDS 10 % (w/v)

Tris-HCl, pH 6,8 390 mM

β-Mercaptoethanol 30 % (v/v)

Glycerin 30 % (v/v)

Bromphenolblau Spatelspitze

| | |
|---|--------------|
| Tris gepufferte Kochsalzlösung , pH 7,5 (Tris-buffered saline, TBS) | |
| Tris | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |
| TBS-T | |
| Tween-20 in TBS | 0,10 % (v/v) |
| Sammelgel-Stocklösung , pH 6,8 | |
| Tris | 600 mM |
| SDS | 0,40 % (w/v) |
| SDS-Laufpuffer | |
| Tris-HCl | 250 mM |
| SDS | 0,10 % (w/v) |
| Glycin | 200 mM |
| TAE-Puffer (50 x), pH 7,8 | |
| Tris | 2 M |
| NaAc | 25 mM |
| EDTA | 500 mM |
| TE-Puffer , pH 8,0 | |
| Tris | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |
| Transferpuffer | |
| Tris-HCl, pH 8,8 | 25 mM |
| Glycin | 192 mM |
| Methanol | 20 % (v/v) |
| SDS | 0,05 % (w/v) |
| Trenngel-Stocklösung , pH 8,8 | |
| Tris | 1,50 M |
| SDS | 0,40 % (v/v) |
| X-Gal-Färbelösung in PBS | |
| Ferrocyanid | 3 mM |
| MgCl ₂ | 1 mM |

2.2 Zellen

2.2.1 Bakterienstämme

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNS, meist viruskodierende Plasmide, wurde der kompetente *E.coli*-Stamm Stable II (Invitrogen, Karlsruhe: F⁻ *mcrA* Δ(*mcrBChsdRMSmrr*) *recA1 endA1 lon gyrA96 thi supE44 relA1 λ⁻* Δ(*lac-proAB*))

eingesetzt, dieser weist eine hohe Transformationseffizienz gepaart mit einer relativ geringen Rekombinationsrate auf.

2.2.2 Medien für die Bakterienkultivierung

Luria Bertani (LB)-Medium, pH 7,5

| | |
|---------------|--------------|
| Bacto-Trypton | 1 % (w/v) |
| Hefeextrakt | 0,50 % (w/v) |
| NaCl | 170 mM |

LB-Agar-Platten

| | |
|-----------------------------|----------|
| LB-Medium wurde mit Agar | 12,5 g/l |
|-----------------------------|----------|

versetzt, autoklaviert und nach dem Abkühlen in 10 cm-Petrischalen gegossen.

Terrific broth (TB)-Medium

| | |
|------------------|-----------|
| Bacto-Trypton | 12 g |
| Hefeextrakt | 24 g |
| Glycerol | 4 ml |
| H ₂ O | ad 900 ml |

nach Autoklavieren und Abkühlen auf 60°C wurde das Medium versetzt mit sterilem:

| | |
|---------------------------------|-----------|
| KH ₂ PO ₄ | 2,31 g |
| K ₂ HPO ₄ | 12,50 g |
| H ₂ O | ad 100 ml |

Zur Selektion wurde dem Medium Ampicillin (0,1 mg/ml) oder Kanamycin (0,05 mg/ml) (beides von Roth) zugesetzt.

2.2.3 Zelllinien

CHO tat

Ovariakarzinom-Zelllinie aus dem chinesischen Streifenhamster, exprimiert stabil das HIV-1 Tat Protein (Michel, Allespach et al. 2005), adhärenzte Zelllinie,
Medium: RPMI 1640+GlutaMAX™

C8166

T-lymphoide Zelllinie, etabliert aus dem Blut eines Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL), exprimiert das SV40 T-Antigen (Northrop, Ullman et al. 1993), Suspensionszelllinie,
Medium: RPMI 1640+GlutaMAX™

Jurkat TAg

T-lymphoide Zelllinie,
 etabliert aus dem Blut eines Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL),
 exprimiert das SV40 T-Antigen (Northrop, Ullman et al. 1993),
 Suspensionszelllinie,
 Medium: RPMI 1640+GlutaMAX™

SupT1

T-lymphoide Zelllinie etabliert aus dem Blut eines Patienten mit Non-Hodgkin's
 T-Zell-Lymphom,
 exprimiert hohe Level von CD4 (Smith, Shatsky et al. 1984),
 Suspensionszelllinie,
 Medium: RPMI 1640+GlutaMAX™

293T

humane embryonale mit Adenovirus Typ 5 transformierte Nierenepithelzellen,
 exprimieren das Simian-Virus 40 (SV40) T-Antigen (Wu 2001),
 adhärenzte Zelllinie,
 Medium: DMEM high

TZM-bL

abgeleitet von HeLa-Zellen,
 exprimieren große Mengen der HIV-Rezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5 und, unter
 Kontrolle des HIV-1 LTR, die Enzyme β -Galaktosidase und Luziferase; (Wei, Decker
 et al. 2002),
 adhärenzte Zelllinie,
 Medium: DMEM high

2.2.4 Medien und Lösungen für die Zellkultivierung

DMEM high (4500 mg/l Glucose) GIBCO

RPMI 1640+GlutaMAX™ GIBCO

OptiMeM GIBCO

Komplementierung der Medien mit:

| | |
|---------------------------------------|------------|
| Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert | 10 % (w/v) |
| L-Glutamin | 1 % (w/v) |
| Penicillin | 1 % (w/v) |
| Streptomycin | 1 % (w/v) |

Medium für die Primärzellkultur: RPMI 1640+GlutaMAX™ komplementiert mit

| | |
|---------------------------------------|------------|
| Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert | 15 % (w/v) |
| L-Glutamin | 1 % (w/v) |
| Penicillin | 1 % (w/v) |
| Streptomycin | 1 % (w/v) |
| Nicht-essentielle Aminosäuren | 1 % (w/v) |
| Natriumpyruvat | 1 % (w/v) |

Medium für die Tonsillen-Histokultur: RPMI 1640+GlutaMAX™ versetzt mit

| | |
|---------------------------------------|------------|
| Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert | 15 % (w/v) |
| L-Glutamin | 1 % (w/v) |
| Fungizone | 1 % (w/v) |
| Gentamycin | 1 % (w/v) |
| Ampicillin | 1 % (w/v) |
| Nicht-essentielle Aminosäuren | 1 % (w/v) |
| Natriumpyruvat | 1 % (w/v) |

Einfriermedium: DMEM high (4500 mg/l Glucose) plus Zugabe von:

| | |
|---------------------------------------|------------|
| Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert | 30 % (w/v) |
| DMSO | 10 % (w/v) |

Trypsin-EDTA-Lösung: Zum Ablösen adhärenter Zellen vom Zellkulturmaterial

2.3 Plasmide

| | |
|--------------------------|--|
| pNL4-3 | Prototypisches X4-HIV-1 provirales Konstrukt (Adachi, Gendelman et al. 1986) |
| pYU-2 | Prototypisches R5-HIV-1 provirales Konstrukt (Li, Kappes et al. 1991) |
| p49.5 | R5-HIV-1 provirales Konstrukt, abgeleitet von pNL4-3 (Chesebro, Nishio et al. 1991) |
| pNL4-3E ⁻ GFP | X4-HIV-1 provirales Konstrukt, abgeleitet von pNL4-3, <i>frameshift</i> in <i>env</i> , <i>gfp</i> -Insertion in den <i>nef</i> -Lokus (He, Chen et al. 1997) |
| pNL4-3E ⁻ Luc | X4-HIV-1 provirales Konstrukt, abgeleitet von pNL4-3, <i>frameshift</i> in <i>env</i> , Δ <i>nef</i> , Leuchtkäfer-Luziferase-Gen im <i>nef</i> -Lokus (He, Choe et al. 1995) |
| pBlaM-Vpr | abgeleitet von pMM31, Plasmid, das eine Protein-Chimäre exprimiert, bestehend aus β -Laktamase N-terminal verbunden mit HIV-1 Vpr (Cavrois, De Noronha et al. 2002) |
| pVSV.G | pMD.G-abgeleitetes Plasmid, das das VSV-Glykoprotein von einem CMV-Promoter aus exprimiert (Stove, Van de Walle et al. 2005) |
| pADVANTAGE | kodiert für die Basenpaare 9.831–11.555 des Adenovirus Typ2-Genoms auf einem 1.724 bp Sal I–Hind III-Fragment, das für die virus-assoziierten RNS-Gene, VAI und VAII kodiert (Promega, Mannheim) |
| pJR-FL Env | abgeleitet vom proviralen Konstrukt pJR-FL, exprimiert HIV-1 Env (He, Chen et al. 1997) |

| | |
|------------|---|
| pYU-2 Env | abgeleitet vom proviralen Konstrukt pYU-2, exprimiert HIV-1 Env (Li, Kappes et al. 1991) |
| pAda Env | abgeleitet vom CCR5-proviralen Konstrukt pAda, exprimiert HIV-1 Env (Choe, Farzan et al. 1996) |
| pBa-L Env | abgeleitet vom CCR5-proviralen Konstrukt pBa-L, exprimiert HIV-1 Env (Hwang, Boyle et al. 1991) |
| pV38A | HIV-1 _{NL4-3} Env (V38A) von Dr. Matthias Dittmar, London, England (Neumann, Hagmann et al. 2005) |
| pX23 | HIV-1 _{NL4-3} Env (X23) von Dr. Matthias Dittmar, London, England, das X23 Env-Gen stammt aus einem T20-naiven HIV-positiven Patienten (Heil, Decker et al. 2004); Neumann, Hagmann et al. 2005) |
| pMoMLV GFP | provirales Konstrukt abgeleitet von pMoMLV, <i>egfp</i> -Insertion in die untranslatierte Region zwischen <i>env</i> und 3'-LTR (Goffinet, Allespach et al. 2007) |

2.4 HIV-1-Primärisolate

| Virus | Gruppe (Subtyp) | Korezeptor | Synzytien | Symptome |
|---------------------|-----------------|------------|-----------|-----------|
| MVP 1639-96 | O | CCR5 | - | ASYM + Tb |
| MVP 2549-95 | O | CCR5 | | |
| MVP 8161-94 | O | CXCR4 | + | AIDS |
| MVP 2901-94 | O | CXCR4 | - | AIDS + Tb |
| MVP 8913-95 | O | CCR5 | - | ASYM |
| MVP 6778-94 | O | CCR5 | - | AIDS |
| MVP 13127-96 | O | CCR5 | - | ARC |
| MVP 13740-96 | O | CCR5 | - | ARC |
| MVP 9435-96 | O | CCR5 | - | AIDS + Tb |
| MVP 2274-97 | O | CCR5 | - | AIDS |
| MVP 2171-94 | O | CXCR4 | + | AIDS + Tb |
| RW9 | M (A) | CCR5 | | |
| 2044 | M (B) | CXCR4 | | |
| D117 | M (B) | CCR5 | | |
| 2005 | M (B) | CXCR4 | | |
| IN22 | M (C) | CCR5 | | |
| ELI | M (D) | CXCR4 | | |
| RU570 | M (G) | CCR5 | | |

Die Aussagen bezüglich des Korezeptor-Tropismus` basieren auf phänotypischen Infektionstests, in denen Korezeptor-Anatagonisten eingesetzt wurden (siehe 2.10.4.1.1). Die Abkürzungen ASYM, ARC und Tb stehen für asymptomatisch, *AIDS-related complex* bzw. Tuberkulose.

2.5 Primer-Sequenzen

| Name | Sequenz 5' → 3' | Kommentare |
|-----------|------------------------------|--|
| OutEnvO_F | GCCTGTCCAAAGGTATCTTTTGAGCC | Äußerer PCR-Primer (<i>forward</i>) zur Amplifizierung der V3-Region des HIV-1 Env |
| OutEnvO_R | AGTGCTGCTGGGCCTGTATTGCTCTCAG | Äußerer PCR-Primer (<i>reverse</i>) zur Amplifizierung der V3-Region des HIV-1 Env |
| InEnvO_F | ATGCAACAACATTTTCAGTGGTTACATG | Innerer PCR-Primer (<i>forward</i>) zur Amplifizierung der V3-Region des HIV-1 Env |
| InEnvO_R | CCCATAGTGCTACCTGCTGCACTTAGA | Innerer PCR-Primer (<i>reverse</i>) zur Amplifizierung der V3-Region des HIV-1 Env |

2.6 Software

Adobe Acrobat 7.0 Professional
 Adobe Illustrator CS2
 Adobe Photoshop CS2
 Ascent Software 2.6
 CellquestPro
 Endnote 9.0
 GraphPad Prism
 Medline / PubMed
 Microsoft Office XP
 Microsoft Windows 2002
 SigmaPlot 2004 for Windows Version 9.0
 geno2pheno_[coreceptor]

Adobe
 Adobe
 Adobe
 Thermo Labsystems
 Becton Dickinson
 ISI Research Software
 GraphPad Software
 NIH Software
 Microsoft Corp.
 Microsoft Corp.
 Systat Software, Inc
 GENAFOR

2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Bakterientransformation

Fremd-DNS wurde über die Hitzeschock-Methode in Bakterien eingebracht. 25 µl einer Suspension chemisch kompetenter Bakterien wurden mit 1 µg DNS für 30 Minuten auf Eis inkubiert bevor der Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden durchgeführt wurde. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis wurden die Bakterien in 600 µl LB-Medium für etwa eine Stunde geschüttelt, nach dieser Zeit sollten die Resistenzgene exprimiert werden. Es folgte zur Zucht von Einzelkolonien das Ausstreichen der Bakterien auf Antibiotikum enthaltenden LB-Agarplatten mit anschließender Über-Nacht-Inkubation bei 37°C.

Am folgenden Tag wurden 10 ml LB-Medium mit einem Einzelklon angeimpft. Die Inkubation erfolgt unter selektiven Bedingungen für etwa 10 Stunden bis die 10 ml-Kultur für Maxipräparationen von DNS in eine Über-Nacht-Kultur von 200 ml Volumen überführt wurde.

2.7.2 Präparative DNS-Aufreinigung

Zur Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien wurden die Übernachtskulturen mit dem Nucleobond AX 500-Kit laut Herstellerprotokoll, basierend auf den Prinzipien der alkalischen Lyse und der Ionenaustausch-Chromatographie, aufgearbeitet.

2.7.3 Analyse der DNS-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentration der DNS wurde mit Hilfe eines UV-Absorptionsspektrometers bestimmt. Hierzu wurden die Proben in einem Volumen von 100 µl verdünnt und die OD_{260nm} gemessen. 50 µg/ml dsDNS haben eine Absorption (OD_{260nm}) von 1,0 Einheiten, die Konzentration der DNS-Proben wurde entsprechend errechnet, und auf 1 µg/µl eingestellt.

Die Qualität der DNS wird über das Verhältnis von OD_{260nm} zu OD_{280nm} (Absorptionsmaximum von Proteinen) ermittelt und sollte bei 1,8 -2,0 liegen.

2.7.4 Restriktionsverdau von DNS

Zur Analyse wurde die präparierte DNS mit ausgewählten bakteriellen Restriktionsendonukleasen verdaut. Für diesen Zweck wurde 1 µg DNS in einem Gesamtvolumen von 20 µl, bestehend aus Restriktionsenzym, spezifischem Puffer und H₂O, für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Das Ergebnis des Restriktionsverdaus konnte über die Auftrennung der spezifisch gespaltenen DNS mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert werden.

2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode ermöglicht die Auftrennung von DNS-Molekülen gemäß ihrer Molekülgröße (Fisher und Dingman 1971). In der Regel wurden 1 %-ige Gele verwendet. Der entsprechende Anteil an Agarose wurde in 1x TAE Puffer aufgekocht, mit 4 µl/100 ml Ethidiumbromid-Stammlösung [10 mg/ml] versetzt und in die Gelkammer gegossen, wobei mittels eines Kunststoffkammes die Probentaschen ausgespart blieben. Nach dem Auftragen der mit DNS-Ladepuffer versetzten Proben (1:5) wurden diese in TAE-Puffer bei einer Spannung von etwa 90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die erhaltenen DNS-Banden mittels eines UV-Transilluminators (254 nm) detektiert und dokumentiert.

2.8 Methoden der Zellkultur

2.8.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die meisten funktionellen Untersuchungen wurden T-Zell-Suspensionskulturen und TZM-bl-Zellen verwendet, hingegen für die Generierung von Virusstocks 293T-Zellen.

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank unter konstanten Bedingungen bei 37°C, etwa 95% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5%. Die Suspensionskulturen wurden alle 2-3 Tage durch Zugabe von frischem Medium verdünnt.

Zur Passagierung von adhärennten Zellen wurden diese mit Hilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst.

2.8.2 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen

Zur Konservierung von Zellen wurden diese nach Pelletierung bei 1200 rpm für 5 Minuten in Einfriermedium entsprechend einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert und in 1ml-Aliquots aufgeteilt. Die Zellen wurden möglichst schnell, um die Aufnahme des zytotoxischen Gefrierschutzmittels DMSO zu reduzieren, bei -80°C eingefroren. Schließlich wurden die Zellen nach mindestens zwei Tagen in flüssigen Stickstoff transferiert.

Das Auftauen erfolgte zügig bei 37°C mit einem anschließenden Waschschrift in Medium und der Kultivierung in zunächst kleinem Volumen.

2.8.3 Zell-Viabilitätstest (MTT-Assay)

Zur Überprüfung der Viabilität von Zellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen wurde der MTT-Test (Mosmann, 1983) verwendet. Dieser Test stellt eine Labormethode zur Bestimmung von Viabilität und Zellproliferation dar und kann ebenso zur Quantifizierung zytotoxischer Aktivität Anwendung finden.

Der MTT-Test wurde parallel zu allen Infektionsexperimenten, in denen der antivirale Effekt wässriger Pflanzenextrakte untersucht wurde, durchgeführt.

MTT (3-(4,5-di-Methyl-Thiazol-2-yl)-2,5-di-Phenyl-Terazoliumbromid) wird von vitalen Zellen durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem violetten Formazan-Reaktionsprodukt modifiziert. In vitalen Zellen kommt es zu einer Präzipitation des Reaktionsprodukts und zur Ausbildung von Kristallen, die sich in organischen Reagenzien lösen. Die Menge des Stoffwechselprodukts steht in direktem Bezug zu Quantität und Viabilität der Zellen, und kann kalimetrisch bestimmt werden.

Zellen wurden zu diesem Zweck in einem dem Infektionsexperiment entsprechenden Format ausgesät, meistens in 96-well-Platten mit einer Zelldichte von 4×10^4 pro well, und über Nacht mit mehreren Konzentrationen der zu testenden Substanz oder eines Stoffgemisches inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und schließlich weiter kultiviert, wobei sich die Kultivierungszeit nach der Dauer des parallel verlaufenden Infektionsexperiments richtete.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde das Zellkulturmedium durch eine das MTT-Reagenz enthaltende Lösung (0,5 mg/ml) ersetzt (100 µl/well). Nach 3 bis 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Lösung abgesaugt. Es folgte die Zugabe von 100 µl DMSO und Ethanol (1:1) pro well, worin sich die gebildeten Kristalle bei

leichtem Schütteln lösen. Die Absorptionsmessung der Proben bei einer Wellenlänge von 550 - 570 nm wurde an einem Luminometer vorgenommen.

2.9 Präparierung und Kultivierung von Zell- und Gewebekulturen

2.9.1 Isolierung von humanen Lymphozyten aus Vollblut und deren Kultivierung

Das Vollblut wurde über die Blutbank des Universitätsklinikums Heidelberg bezogen und stammte von HIV-, HBV- und HCV-negativen Spendern.

Die Lymphozyten wurden mit Hilfe von Zentrifugation über eine Trennlösung (Ficoll-Paque Plus) aufgrund ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit und ihrer spezifischen Dichte von den anderen Blutzellen getrennt.

Dazu wurde das Vollblut in 150 cm²-Zellkulturflaschen überführt und 1:1 mit PBS aufgefüllt. 30 ml des verdünnten Blutes wurden vorsichtig auf in 50 ml-Falkons vorgelegte 20 ml Ficoll geschichtet. Es erfolgte eine Zentrifugation von 30 Minuten bei 1400 rpm und Raumtemperatur (RT), wobei auf die Bremsfunktion verzichtet wurde, so dass vier Phasen unterschieden werden konnten: im Überstand befinden sich Plasma und Thrombozyten, am Boden die durch Ficoll gebildeten Erythrozyten-Aggregate. In der darüber liegenden Ficoll-Schicht findet man Granulozyten, die darauf platzierte weiße PBMC-reiche Schicht in der Interphase zwischen Ficoll und Plasma wurde mit einer Plastikpipette abgesaugt und mit PBS gewaschen um Ficoll-Paque Plus und Plasma zu entfernen. Eventuell mit den PBMCs (Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen) überführte Erythrozyten wurden durch fünfminütige Inkubation mit 5 ml ACK-Lyse-Puffer bei RT lysiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die PBMCs für einen Tag in Medium, versetzt mit PHA-P [2 µg/ml] und IL-2 [20 U/ml], aktiviert. Die weitere Kultivierung erfolgte in Primärzell-Medium mit IL-2 [20 U/ml] (siehe auch: 2.2.4).

2.9.2 Isolierung von humanen Monozyten-abgeleiteten Makrophagen

Humane PBMCs wurden wie oben beschrieben isoliert und nach Aufnahme in PBS gezählt. Die Zellen wurden in 24-well-Platten (Zelldichte: 2×10^6 Zellen/ well) in DMEM-Medium substituiert mit 10 % hitzeinaktiviertem humanem AB-Serum ausgesät. Die Differenzierung zu MDMs (*monocyte-derived macrophages*) dauert etwa eine Woche. Die Zellen werden danach extensiv mit DMEM-Medium gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Die Weiterkultivierung erfolgt ohne humanes AB-Serum.

2.9.3 Präparierung und Kultivierung primärer Ratten-T-Zellen

Für die Präparation von primären T-Zellen (beschrieben in Keppler *et al.*, 2001; Keppler *et al.*, 2002) wurden Sprague-Dawley-Ratten durch CO₂-Begasung getötet. Die Milz wurde von Lena Oberbremer entnommen und in 5 ml Primärzell-Medium transferiert.

Die Milz wurde durch ein Zellsieb (70 µm) gedrückt und einmal mit PBS (1100 rpm, 5 Minuten) gewaschen. Die Zellen wurden dann in 2 bis 3 ml ACK-Lysepuffer resus-

pendiert und für 3 Minuten darin inkubiert, um eine Lyse der Erythrozyten zu erreichen. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift an. Das Pellet wurde in 10 ml Primärzell-Medium resuspendiert.

Zur Kultivierung wurden die Ratten-T-Zellen auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Zur Aktivierung der T-Zellen wurden 20 U/ml humanes IL-2 und 4,8 µg/ml Concavalin A zugesetzt.

2.9.4 Präparierung und Kultivierung von humanen lymphoiden Aggregationskulturen

Humanes Tonsillengewebe wurde während Routine-Tonsillektomien von HIV-, HBV- und HCV-negativen Patienten entnommen. Die chirurgischen Eingriffe erfolgten in der Kopfambulanz des Universitätsklinikums Heidelberg (Abteilung Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Direktor: Prof. Dr. Plinkert, Ethikkomitee-Antrag 077/2005).

Zur Präparation der Aggregationskultur wurde das Tonsillengewebe zunächst mit einem Skalpell in 2-3 mm große Stückchen zerteilt, um diese durch ein Zellsieb (Porengröße: 40 µm) zu passagieren. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, dann in 96-well-Platten mit V-Boden (2×10^6 Zellen/200µl/well) in RPMI 1640 mit verschiedenen Zusätzen (siehe: 2.2.4) kultiviert. Ein Mediumwechsel folgte am Tag nach der Präparation, dann alle drei Tage.

2.10 Virologische Methoden

2.10.1 Calcium-Phosphat-Transfektion von 293T-Zellen

Zur Herstellung größerer infektiöser HI-Virus-Chargen wurden 293T-Zellen in einer Dichte von 4×10^6 Zellen/ Schale in zwanzig 15 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurden diese transfiziert mit:

1400 µg provirale DNS
2 ml CaCl_2 (2,5 M)
18 ml *Aqua dest.*
20 ml HBS-Puffer.

Im Falle der Produktion von pseudotypisierten Viren betrug das Verhältnis von Hüllprotein zu Provirus 2:3.

HIV-1-Viruspartikel, die die BlaM-Vpr-Chimäre enthalten sollten, wurden durch Dreifach-Transfektion generiert: pNL4-3 provirale DNS (60 µg/15 cm-Schale), pBlaM-Vpr (20 µg/Schale) und den pAdVantage-Vektor (10 µg/Schale).

Für den Transfektionsansatz wurde zunächst die DNS mit Wasser, dann mit CaCl_2 gemischt, und schließlich langsam unter zur Hilfenahme des Vortexers mit HBS. Der Ansatz wurde für mindestens 20 Minuten bei RT inkubiert, bevor vorsichtig 2 ml in jede Zellkulturschale pipettiert wurden.

Etwa 18-24 Stunden später wurde das Medium durch neues DMEM-Medium mit einem Zusatz von nur 0,5% FKS ersetzt.

2.10.2 Ernte und Konzentrierung von Virusstocks

Virusstocks wurden zwei Tage nach dem Mediumwechsel geerntet, und häufig auch konzentriert. Zur Entfernung von Zellen wurden die Zellkulturüberstände in 50 ml-Falkons bei 4000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und steril filtriert.

Die gereinigten virushaltigen Zellkulturüberstände wurden entweder nach diesem Schritt in 2 ml-Aliquots bei -80°C aufbewahrt oder mit Amicon-Filtereinheiten (*cut-off*: 100.000 MW) laut Herstellerprotokoll 40-fach konzentriert. Die so konzentrierten Überstände wurden zu je 50 µl -200 µl aliquotiert ebenfalls bei -80°C gelagert.

Sollten Virusstocks für bestimmte Methoden verwendet werden, wie zum Beispiel Virion-Fusionsassays oder Saccharose-Gradienten-Zentrifugation, schloss sich an die Konzentrierung eine Aufreinigung der Viruspartikel über 20 bzw. 30%-ige Saccharose-Kissen an (44000 rpm, 4°C, 1 Stunde, SW60-Rotor).

2.10.3 Expansion von HI-Viren in primären T-Zellkulturen

HIV-1-Primärisolate verschiedenen Typs wurden in gepoolten Primärzellkulturen expandiert. Die Anfangskultur setzte sich dabei aus PHA- und IL-2-aktivierten humanen Lymphozyten von zwei Donoren und unstimulierten (d. h. nicht mit Zytokinen aktivierten) Lymphozyten derselben Donoren zusammen. 1 ml dieser Kultur wurde mit einer meist unbekannt Menge des zu expandierenden HI-Virus inokuliert. Zur Kontrolle wurden auch laboradaptierte Viren, wie NL4-3 bei der Expansion mitgeführt. Am Tag nach der Infektion wurden die Zellen in einem großen Volumen des Primärzell-Mediums gewaschen, sowie danach Proben zur Bestimmung der p24CA-Konzentration genommen. Nachdem die infizierten Zellen in 2 ml frischer Zellkultur resuspendiert wurden, folgte vor weiteren p24CA-Proben-Entnahmen die Kultivierung für etwa sieben Tage. Ab diesem Zeitpunkt wurde die p24CA-Konzentration im Zellkulturüberstand alle drei Tage kontrolliert und entsprechend deren kinetischen Verlaufs das Volumen der Expansionskultur durch Zugabe uninfizierter primärer T-Zellen in frischem Medium angepasst.

Die infizierten Kulturen wurden auf ein Volumen von mindestens 50 ml expandiert, bevor der virushaltige Zellkulturüberstand mit Amicon-Filtereinheiten (*cut-off*: 100.000 MW) konzentriert wurde. Nach der Aliquotierung in Einheiten von 50 – 300 µl wurden die expandierten und konzentrierten Primärisolate bei -80°C eingefroren.

2.10.4 Nachweise der Infektiosität

Die Infektiosität der generierten Viruspartikel wurde mit Hilfe der Reporterzelllinie TZM-bl bestimmt. Diese Zellen tragen nicht nur ein LTR-getriebenes Leuchtkäfer-Luziferase-Gen, sondern auch ein β -Galaktosidase-Gen, ebenfalls unter der Kontrolle des HIV-1 LTR. Ist die Infektion erfolgreich, werden die Enzyme exprimiert. Die enzymale Aktivität wird anhand der Umsetzung eines Substrats nachgewiesen.

2.10.4.1 Luziferase-Reporter-Virus-Test

TZM-bl-Zellen (2×10^4 pro well) wurden in 96-well-Platten ausgesät und am folgenden Tag mit der zu testenden Virussuspension in verschiedenen Verdünnungen infiziert.

Nach einem Mediumwechsel am folgenden Tag, wurde ca. 72 Stunden nach der Infektion ein Luziferase-Reporter-Assay-System den Herstellerinformationen entsprechend verwendet, um die Enzymaktivität nachzuweisen.

2.10. 4.1.1 Bestimmung der Korezeptor-Benutzung von HIV-1

Um zu analysieren, von welchem Chemokin-Korezeptor ein bestimmtes Virus für die Interaktion mit dem Rezeptorkomplex der Zelle Gebrauch macht, wurden Korezeptoren-Antagonisten appliziert.

TZM-bl-Zellen (4×10^4 Zellen/well einer 96-well-Platte) wurden vor der Infektion für 30 Minuten mit dem CXCR4-Inhibitor AMD3100 oder dem CCR5-Antagonisten SCH-D (beide in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$) inkubiert. Jedes zu testende HIV-1-Primärisolat (0,1 bis 10 ng p24CA/well) wurde parallel für die Infektion von unbehandelten und vorbehandelten Zellen verwendet, dabei musste die p24CA-Konzentration jeweils an die zytotoxischen Charakteristika des Virus adaptiert werden. Als Referenz wurden Standardviren wie HIV-1_{NL4-3} (CXCR4-Verwendung) und HIV-1_{YU-2} (CCR5-Verwendung) in den Experimenten mitgeführt.

Am Tag nach der Infektion wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 36 oder 48 Stunden, ebenfalls an die Zytotoxizität des Virus angepasst, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, lysiert und ein Luziferase-Reporter-Assay-System zur Analyse verwendet.

2.10.4.2 HIV-Infektiösitätstest

In eine 96-well-Platte wurden TZM-bl-Zellen in einer Dichte von 1×10^4 /well ausgesät. Am Tag danach wurden die Zellen mit dem zu testenden Virus in mehreren Titrationsstufen infiziert. 4 Stunden nach der Inokulation wurde das Medium ausgetauscht. Weitere 48 Stunden später wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Fixierung mit 2%iger PFA-Lösung für 10 Minuten, die dann durch eine X-Gal-Färbelösung, die das β -Galaktosidase-Substrat enthält, ersetzt wurde. Die Inkubation erfolgt über Nacht oder für mindestens 4 Stunden bei 37°C . Am nächsten Tag wurden die blauen und somit als infiziert erkennbaren Zellen zur Titerbestimmung ausgezählt.

2.11 Infektionen zur Untersuchung antiviraler Effekte

Zum Zweck der Erforschung der anti-HIV-Wirkung wässriger Lamiaceen-Extrakte, komplexer Stoffgemische und mehreren Einzelsubstanzen wurden Infektionen in unterschiedlichen Zellsystemen und mit verschiedenen Quantifizierungsmethoden durchgeführt. Für alle Versuchsansätze und verwendete HI-Viren war die Vorbehandlung der Viruspartikel identisch.

2.11.1 Behandlung von Virus und Zellen

Die Virusstocks wurden mit mehreren Konzentrationen der zu testenden Substanz oder der verwendeten Maximalkonzentration (1%) des entsprechenden Lösungsmittels (H_2O , Ethanol, DMSO) als Kontrolle für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Diese Suspensionen wurden dann mit einem äquivalenten Volumen Zellkulturmedium gemischt und auf die Zielzellen appliziert.

2.11.2 Vorbehandlung von Zellen

In diesem Fall wurden die Zellen in Abwesenheit von Viren für eine Stunde bei 37°C mit den in Zellkulturmedium titrierten Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und über Nacht mit HIV-1 inokuliert. Ein erneuter Mediumwechsel folgte am nächsten Tag.

2.11.3 Infektion von T-Zelllinien und humanen Tonsillenhistokulturen

Die T-Zellen (SupT1, Jurkat, C8166) wurden in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/*well* in 96-*well*-Platten ausgesät, die HLA-Kulturen dagegen in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/*well*. Einen Tag später wurde bei den HLA-Kulturen zunächst das Medium gewechselt, und dann die T-Zellen und Tonsillenkulturen mit Viruspartikel im Triplikat infiziert (5 ng p24CA/ *well*). Nach der Über-Nacht-Exposition wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach der Zugabe von frischem Medium Proben zur ersten Analyse im p24CA-ELISA (90 µl Zellkulturüberstand + 10 µl 5% Triton X-100 in PBS) entnommen. Die Kulturen wurden für vier bzw. im Falle der HLA-Kulturen für 10 – 12 weitere Tage kultiviert. Eine produktive HIV-1-Infektion konnte über die p24CA-Konzentration im Zellkulturüberstand, von dem etwa alle drei Tage Proben genommen wurde, per ELISA nachgewiesen werden.

2.11.4 Infektion von humanen Makrophagen unter kontinuierlicher Extraktbehandlung

Kulturen von humanen MDMs (*monocyte-derived macrophages*) wurden ausgesät (siehe: 2.9.2) und 6 bis 8 Tage später mit vorbehandelten Viren (50 ng p24CA HIV-1_{YU-2}/ *well*) infiziert. Ein Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag, außerdem wurden Zellkulturüberstände an den Tagen 1, 7, 12 und 16 nach der Infektion für die p24CA-Analyse über ELISA abgenommen. Zu diesen Zeitpunkten wurde jeweils frisches Medium mit der entsprechenden Extraktkonzentration zur Kultur gegeben, um eine kontinuierliche Präsenz der Extrakte zu gewährleisten.

2.11.5 Infektion von primären Ratten-T-Zellen

Primäre Ratten-T-Zellen mehrerer Donoren wurden in einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro *well* einer 96-*well*-Rundboden-Platte ausgesät und mit replikationskompetenten ekotropen MoMLV-GFP-Reporterviren (50 µl eines konzentrierten Virusstocks/*well*), die ebenfalls vorbehandelt wurden, infiziert. Vier Tage später wurde der Grad der Infektion anhand des Prozentanteils GFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen, wieder in 100 µl PBS resuspendiert und bis zur Proben-Messung auf Eis gehalten.

2.11.6 HIV-1 *single-round*-Infektionen

TZM-bl-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro *well* (12-*well*-Platten) ausgesät und mit *single-round* HIV-1_{NL4-3} Env- GFP-Reporterviren, die mit JR-FL

Env, YU-2 Env oder VSV-G Env pseudotypisiert wurden, inokuliert (20 ng p24CA/well).

Zuvor wurden die Viruspartikel einer einstündigen Vorbehandlung mit wässrigen Lamiaceen-Extrakten oder Einzelsubstanzen in mehreren Konzentrationen bei 37°C unterzogen. Nach einem Mediumwechsel am Folgetag wurden die Zellen für weitere 48 Stunden kultiviert, dann wurden sie mit PBS gewaschen, mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, nochmals gewaschen und schließlich mit 2%-iger PFA-Lösung für 90 Minuten fixiert. Der Prozentanteil GFP-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch an einem FACSCalibur bestimmt.

2.11.6.1 Bindung von Viruspartikeln an Zelloberflächen

Um den Effekt von wässrigen Lamiaceen-Extrakten auf an Zelloberflächen gebundene Viren zu untersuchen, wurden TZM-bl-Zellen mit HIV-1 GFP-Reporterviren inokuliert (200 ng p24CA pro well). Zuvor wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 4°C, die gewährleisten sollte, dass die Viruspartikel lediglich an die Zelloberfläche bzw. den Rezeptorkomplex binden, aber nicht fusionieren, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Mit dem frischen Medium wurden dann auch Lamiaceen-Extrakt in verschiedenen Konzentrationen oder H₂O als Lösungsmittelkontrolle zugefügt. Nach einem Mediumwechsel am nächsten Tag wurden die Zellen bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 37°C kultiviert.

2.11.7 Infektionen mit Adenovirus Typ 5 GFP-Reporterviren

TZM-bl-Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/well von 12-well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit einem bestimmten, sich aus der Titration des jeweiligen Virusstocks ergebenden Volumen infiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen mit Trypsin von den Zellkulturplatten abgelöst, einmal mit PBS gewaschen und für die durchflusszytometrische Analyse in 200 µl PBS resuspendiert. Der Prozentanteil GFP-positiver Zellen wurde bestimmt.

2.12 Immunologische Methoden

2.12.1 Nachweis von HI-Viren durch p24CA-ELISA

Ein Antigen-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays*) funktioniert auf der Basis spezifischer Antikörper, die an das nachzuweisende Antigen, hier das HIV-1 Capsidprotein p24CA, binden.

Der erste Schritt ist eine Beschichtung einer 96-well-Platte mit 100 µl des monoklonalen Maus- α -Capsid-Antikörpers 183 (1:1000 in PBS) pro well über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween folgte zum Blocken von unspezifischen Bindungen eine Inkubation mit 200 µl 10% FKS in PBS pro well bei 37°C für mindestens 2 Stunden.

Die mit 0,5 % Triton X-100 inaktivierten Virus-Proben wurden ebenso wie der p24CA-Capsid-Standard (Verdünnungsreihe: 6,25-0,095 ng/ml) in PBS-T verdünnt und auf die erneut gewaschene Platte aufgetragen.

Nach der ÜN-Inkubation bei RT in einer feuchten Kammer wurde nach einem Waschschrift der Zweitantikörper (polyklonales Kaninchen- α -Capsid-Serum; 1:1000 in PBS + 10% FKS + 1% Tween 20 (20%-ig)) für eine etwa einstündige Inkubationszeit bei 37°C zugegeben. Auf erneutes Waschen folgte die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper (α -Kaninchen-Peroxidase 1:2000 in PBS + 10% FCS + 1% Tween 20). Nach einer Stunde bei 37°C wurde die Platte dreimal mit PBS-Tween und anschließend dreimal mit H₂O gewaschen. Es wurden 100 μ l Peroxidase-Substrat/well zugegeben. Über die Umsetzung des Substrats durch die Peroxidase konnte die gebundene Menge an p24CA nachgewiesen werden, die in einem Multiskan EX-Gerät photometrisch quantifiziert wurde. Zuvor wurde die Reaktion etwa nach 5 Minuten durch 0,5 M H₂SO₄ gestoppt (50 μ l/well).

2.12.2 HIV-1-Virionen-Fusionstest

Diese Methode ermöglicht die direkte Analyse der Fusion von Viruspartikeln mit Zellen. Grundlage dieses Assays (Abb. 2.3) ist die Inkorporation von chimären BlaM (β -Laktamase)-Vpr-Proteinen in HIV-1 Viruspartikeln und deren Freisetzung in das Cytoplasma von Zielzellen nach der Fusion mit Virionen (Cavrois *et al.*, 2002). Fusionsereignisse können auf dem Niveau einzelner Zellen mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen nachgewiesen werden. Nach der Inokulation werden die Zellen mit dem Farbstoff CCF2 inkubiert, der auf erfolgreiche Fusion hin durch die β -Laktamase-Aktivität gespalten wird und somit sein Emissionsspektrum ändert.

Bei der Durchführung des Assays in 96-well-Platten wurden C8166-T-Zellen als Kontrolle mit dem Fusionsinhibitor Enfuvirtid [2 μ M], dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 [10 μ M] oder dem Transkriptionsinhibitor Efavirenz [10 μ M] für 15 Minuten vorbehandelt. Andererseits wurden HIV-1_{NL4-3} BlaM-Vpr-Partikel der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen wässrigen Melissen-Extrakts oder H₂O (1% als verwendete Maximalkonzentration) unterzogen. Anschließend wurden die C8166-T-Zellen für sechs Stunden mit den Viruspartikeln inkubiert (40 ng p24CA pro 2 x 10⁶ Zellen). Nach einem Waschschrift mit CO₂-unabhängigem Medium folgte die Beladung der Zellen mit der CCF2-Färbelösung in einer feuchten Kammer bei RT über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen in PBS gewaschen und schließlich für mindestens 90 Minuten in einer 2%-igen PFA-Lösung fixiert.

Die Effizienz der Fusion wurde bei der Messung der Proben mit einem BD FACSAria (3-Laser-Durchflusszytometer) ermittelt. Gespaltener CCF2-Farbstoff (blau) mit höherer Emissionswellenlänge steht dabei für ein erfolgtes Fusionsereignis, ungespaltener grüner Farbstoff dagegen für keine Fusion zwischen Viruspartikel und Zielzelle.

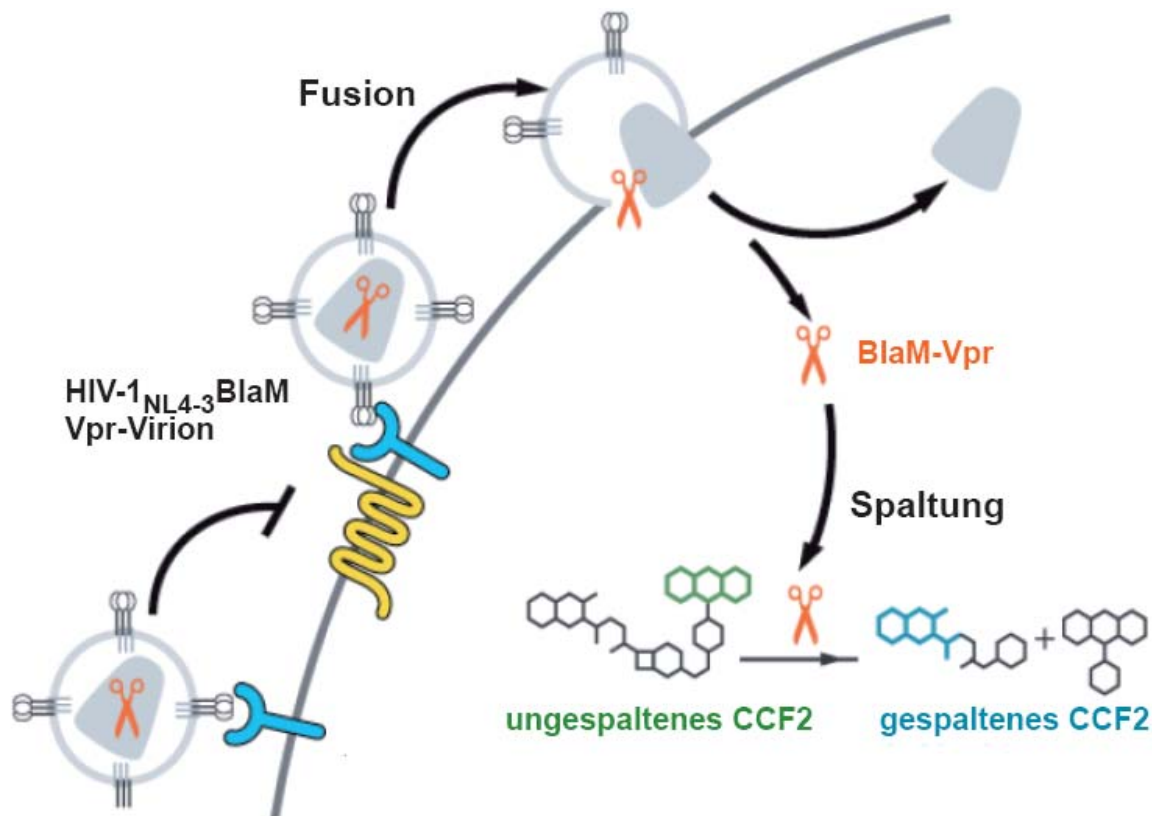


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Virionen-Fusionstest.

2.12.3 Durchflusszytometrie

Diese Technik (auch FACS (*fluorescence activated cell sorting* oder *scan*) genannt) ermöglicht die quantitative Analyse von markierten Oberflächen- oder intrazellulären Proteinen in Einzelzell-Suspensionen. Gleichzeitig werden Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) der einzelnen Zellen erfasst.

Die Bestimmung dieser Eigenschaften wird durch ein gekoppeltes optisch-elektronisches System ermöglicht: Die Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit, durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht und an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge (488 nm) vorbeigeleitet. Sobald eine Zelle den gebündelten Laserstrahl passiert, wird das auftreffende Laserlicht gestreut und angeregte Fluoreszenzmoleküle emittieren Licht. Die Fluoreszenzsignale werden vom Gerät an dichromatischen Filtern registriert und die Information an Photodioden weitergeleitet. Die Lichtsignale finden sich in drei Fluoreszenzkanälen wieder, deren Filter unterschiedliche Wellenlängen detektieren können und somit auch in der Lage sind, Zellen mit drei unterschiedlich markierten Antigenen gleichzeitig zu erfassen.

2.12.3.1 Messung der CD4⁺-T-Zell-Depletion

Die Depletion von CD4⁺-T-Zellen in infizierten Tonsillen-Histokulturen wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt, am Tag 7 und zwischen Tag 10 bis 12 nach der Infektion. Die Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen, dann für 30 Minuten bei 4°C mit den monoklonalen Antikörpern α -CD3-APC und α -CD8-FITC (1:20 in PBS, 50 μ l pro *well*) gefärbt und danach erneut gewaschen. Es folgte der Fixierungsschritt in 2%-igem PFA in PBS (100 μ l/*well*), wobei die resuspendierten

Zellen in spezielle FACS-Röhrchen transferiert wurden. Nach 90 Minuten wurden pro Röhrchen 100 µl PBS zupipettiert und die Zellen im Durchflusszytometer (FACSCalibur (BD) mit CellQuest Pro 4.0.2-Programm (BD)) analysiert. Dabei stellen sich die CD4⁺-T-Zellen als CD3-positiv und CD8-negativ dar, während die CD8⁺-T-Zellen für beide Marker positiv sind.

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 DNS-Extraktion

Die Extraktion zellulärer und viraler DNS im Kontext einer Infektion wurde unter Verwendung des Qiagen DNeasy Tissue Kits[®] entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Zuvor wurden $1,5 \times 10^5$ TZM-bl-Zellen im 12-well-Format ausgesät und am nächsten Tag infiziert (0,3 bis 75 ng p24CA/well, je nach Primärisolat). Nach einem Mediumwechsel am folgenden Tag wurden die Zellen zwei weitere Tage später abgelöst und pelletiert. Das Pellet wurde bei -20°C aufbewahrt, kann aber auch direkt für die DNS-Extraktion verwendet werden.

Die Zellpellets wurden in 200 µl PBS resuspendiert, bevor 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer zugegeben wurden. Nach dem Vortexen der Proben folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 56°C. Anschließend wurden 200 µl Ethanol (99%) hinzupipettiert und die Proben erneut gevortext. Die Suspension wurde auf die DNeasy Mini-Spin-Säule transferiert und bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die Säulen wurden in neue Sammelröhrchen überführt und mit 500 µl AW1-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 Minute). Für den zweiten Waschschritt mit AW2-Puffer wurden die Säulen erneut in saubere 2 ml-Röhrchen gesetzt und bei 14000 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Die Minisäulen wurden dann in 1,5 ml-Gefäße transferiert und 200 µl AE-Puffer direkt auf die getrockneten DNeasy-Membranen pipettiert. Nach einem einminütigen Inkubationsschritt bei RT folgte unter Zentrifugation (8000 rpm, 1 Minute) die Eluierung. Die DNS wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.13.2 PCR (*polymerase chain reaction*)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Vervielfältigung von viralen DNS-Sequenzen eingesetzt, die nach ihrer Sequenzierung Aussagen über den Korezeptor-Gebrauch der analysierten Viren erlauben sollten.

Während der ersten PCR-Runde sollte mit Hilfe der äußeren Primer eine etwa 1000 Nukleotide-umfassende Sequenz, die die V3-Schleife des *env*-Gens abdeckt, amplifiziert werden. Ausgehend von diesen PCR-Produkten wurden in einer zweiten PCR-Runde unter Verwendung der inneren Primern ein kleineres DNS-Fragment von 900 Nukleotiden amplifiziert. Für die Amplifikationen wurden jeweils

5 µl DNS,
 1 µl *Forward*-Primer [10 µM]
 1 µl *Reverse*-Primer [10 µM]
 0,5 µl dNTPs
 1 µl Taq-Polymerase und
 36,5 µl HPLC-H₂O

verwendet.

PCR-Protokoll:

| | | | |
|---------------|------|-------------|--------|
| | 94°C | 2 Minuten | } x 35 |
| Denaturierung | 94°C | 30 Sekunden | |
| Annealing | 57°C | 30 Sekunden | |
| Extension | 72°C | 4 Minuten | |
| Elongation | 72°C | 10 Minuten | |

Die PCR-Produkte wurden auf das Vorhandensein der spezifischen Nukleotid-Sequenz mit Hilfe der Auftragung auf ein Agarosegel und anschließende Gelelektrophorese (2.7.5) hin kontrolliert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

2.13.3 DNS-Aufreinigung

Vor der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte bezüglich ihrer DNS-Konzentration vermessen (2.7.3) und gereinigt. Für die Aufreinigung wurde das NucleoSpin® Extract II-Kit (Macherey-Nagel) unter Beachtung der Empfehlungen des Herstellers verwendet. 200 µl NT-Puffer wurden mit 3000 ng/µl DNS (entsprachen typischerweise einem Volumen von 5 bis 6 µl) auf die NucleoSpin®-Säule geladen. Während eines Zentrifugationsschritts (13000 rpm, 1 Minute) sollte die DNS an die Membran gebunden werden. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Säulen jeweils in saubere Sammelgefäße transferiert. Es folgte ein Waschschriff mit 600 µl NT3-Puffer pro Probe und Zentrifugieren bei 13000 rpm für eine Minute. Durch anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für zwei Minuten sollten die Puffer-Rückstände entfernt werden. Die Säulen wurden dann in 1,5 ml-Gefäße gesetzt, 30 µl HPLC-H₂O auf die Membran pipettiert und für eine Minute bei RT inkubiert, um die Ausbeute an eluierter DNS zu erhöhen. Abschließend wurden die DNS-Proben nochmals zentrifugiert (13000 rpm, 1 Minute).

2.13.4 Sequenzierung und Auswertung

Die aufgereinigten PCR-Proben wurden sequenziert (GATC) und der Korezeptor-Tropismus unter Anwendung des Programms geno2pheno_[coreceptor] ausgewertet. Das Programm von GENAFOR (Sing et al., 2007) vergleicht die zu analysierende Nukleotid-Sequenz mit der des Referenzvirus HXB2.

2.13.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

2.13.5.1 SDS-PAGE zur Darstellung von Proteinen

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Laemmli (1970) kann ein Proteingemisch unter denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit vom Molekulargewicht aufgetrennt werden. Bei der beschriebenen SDS-PAGE handelt es sich um ein diskontinuierliches System aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Die beiden Gele unterscheiden sich im Hinblick auf den pH-Wert, die Ionenstärke und die Porengröße.

Für die Auftrennung im Gel wurden die Proben mit SDS-haltigem Probenpuffer für fünf Minuten bei 96°C gekocht. Dies führt zum einen zur Auflösung der Wasserstoffbindungen und zum anderen zur Reduzierung der Disulfidbrücken. Nach dem Auftragen der Proben bindet SDS an die denaturierten Proteine. Die Ladung des SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine, wobei die Ladung eines SDS-Proteinkomplexes in direkter Beziehung zu der jeweiligen Proteingröße steht. Sowohl die Fokussierung der Proteine im Sammelgel als auch die Auftrennung im 10 %-igen Trenngel erfolgte bei einer konstanten Spannung von 30 mA.

Pipettierschema für zwei Gele:

| | 10-%iges Trenngel | 5-%iges Sammelgel |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| Acrylamid/ Bisacrylamidlösung | 4,0 ml | 0,6 ml |
| Tris/ HCL (1,88 M bzw. 0,625 M) | 2,4 ml | 0,8 ml |
| SDS (0,5 %) | 2,4 ml | 0,8 ml |
| Milli-Q-H ₂ O | 3,2 ml | 1,74 ml |
| TEMED | 10,0 µl | 4,0 µl |
| APS (10 % w/v) | 60,0 µl | 20,0 µl |

2.13.5.2 Semi Dry Western Blot und Detektion von Proteinen

Aufgetrennte Proteine werden beim Western Blotting elektrophoretisch auf eine Trägermatrix, im Allgemeinen eine Nitrozellulose-Membran, übertragen. Nach Abschluss des Transfers kann die Nitrozellulose-Membran für weitere analytische Zwecke verwendet werden, da die zu transferierenden Proteine durch den Vorgang vom SDS befreit werden und so eine Faltung in Sekundär- und Tertiärstrukturen möglich ist.

Die Proteine wurden in einer Halbtrocken-Kammer bei 15 V für 60 Minuten auf eine Transferpuffer gesättigte Nitrozellulose-Membran übertragen, dazu wurden über und unter SDS-Gel und Membran je drei puffergetränkte Whatmann-Filterpapiere geschichtet.

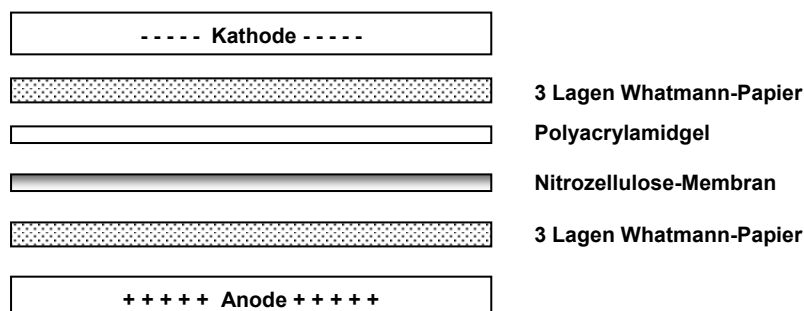


Abb. 2.4: Schichtung der Transfereinheit.

Nach der Übertragung der Proteine auf die Membran wurde zunächst ein Blockschritt für mindestens 30 Minuten mit einer 5 %-igen Milchpulver/ PBS-T-Lösung eingefügt, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern. Es schloss sich ein dreimaliger Waschschrift mit PBS-T an. Die Inkubation mit einem Primärantikörper (Kaninchen-anti-gp120 Env, 1:5000 (Prof. V. Bosch, DKFZ, Heidelberg); Kaninchen-

anti-24 Gag, 1:4000 (Prof. H-G. Kräusslich)) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach weiteren Waschschritten, einer einstündigen Inkubation bei RT mit Sekundärantikörpern (Ziege-anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase, 1:10.000; Dianova, Hamburg) und erneutem Waschen folgte der Nachweis der Proteine mit einer ECL-Färbelösung.

2.13.5.2.1 Western blot-Analyse viraler Strukturproteine nach Extraktbehandlung

Viruspartikel (500 ng p24CA HIV-1_{NL4-3}) wurden für eine Stunde bei 37°C der Exposition von 1-%igem Melissenextrakt, H₂O (1%) oder Triton X-100 (0,5%) ausgesetzt. Darauf folgte eine Ultrazentrifugation der Partikel durch ein 20 %-iges Saccharose-Kissen (1 ml Virussuspension auf 200 µl Saccharose-Lösung) für eine Stunde bei 44.000 g und 4°C. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt, das Pellet wurde in PBS resuspendiert (4°C, 30 Minuten). Vom gelösten Pellet wurden Proben für einen Nachweis von p24CA durch ELISA als auch für die Detektion von viralen Proteinen durch Western Blotting (wie unter 2.13.5.2 beschrieben) genommen.

2.13.6 Lipofektion von Zellen

In adhärenzte Zellen wurde DNS mit Hilfe von Lipofektion eingebracht. Diese Methode basiert darauf, dass es zur Komplexierung der negativ geladenen DNS-Moleküle mit kationischen Liposomen des verwendeten Reagenzes kommt. Die Komplexe können endozytotisch aufgenommen und die DNS im Zellinneren freigesetzt werden.

CHO tat-Zellen wurden einen Tag vor der Lipofektion in 12-*well*-Platten ausgesät (1,5 x 10⁵ Zellen/ *well*). Pro Ansatz wurde 1 µg DNS mit 2 µl Lipofectamin 2000 in 100 µl OptiMEM gemischt und für zwanzig Minuten bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das RPMI-Medium der Zellen gegen OptiMEM ausgetauscht, und schließlich das DNS-Lipid-Gemisch hinzu gegeben. Nach vier Stunden Inkubation erfolgte ein erneuter Mediumwechsel.

2.13.6.1 HIV-Env vermittelter Zell-zu-Zell-Fusionstest

Dieser Test erlaubt es, die Interaktion von HIV-Hüllproteinen auf der Oberfläche der Donorzelle mit dem Rezeptorkomplex auf der Zielzelle, und die anschließende Membranfusion beider Zelltypen zu untersuchen (Michel et al. 2005; Venzke et al., 2006).

Es wurden zwei verschiedene Zelltypen verwendet, darunter CHO tat-Zellen, die zum einen HIV-1 Tat (*viral transcriptional transactivator*) stabil und zum anderen transient HIV-Hüllproteine exprimieren. TZM-bl-Zellen stellen mit ihrer stabilen Expression von CD4, den Korezeptoren CXCR4 und CCR5, sowie von LTR-getriebenen β-Galaktosidase-Genen die Zielzellen dar. Nach der Fusion dieser unterschiedlich ausgestatteten Zellen kann das Tat-Protein die Expression des β-Galaktosidase-Gens aktivieren, was zur Spaltung des Galaktosidase-Substrats (Galakto-Star Kit) führt. Die Quantifizierung erfolgte im Luminometer.

Die CHO tat-Zellen wurden in einer Dichte von 1,5 x 10⁵ Zellen pro *well* in 12-*well*-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden kodierend für HIV-1_{JR-FL}Env oder HIV-1_{YU-2} Env zusammen mit pCMV-Rev transfiziert. Die Transfektion erfolgte im Triplikat durch Lipofektion (Lipofektamin 2000). Am folgenden Tag wurden die transfizierten CHO tat-Zellen mit 0,7 mM EDTA abgelöst und die Triplikate vereinigt.

Um die Wirkung von wässrigem Melissenextrakt auf die Zell-Zell-Fusion zu untersuchen, wurden die transfizierten CHO tat-Zellen vor der Kokultivierung für eine Stunde bei 37°C mit Melissenextrakt oder H₂O vorbehandelt. Zur Kokultivierung mit den Zielzellen wurden die CHO tat-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 zu TZM-bl-Zellen in 96-well-Platten (2 x 10⁴ Zellen pro well in einem Volumen von 200 µl Kulturmedium, 1:1 aus RPMI und DMEM) ausgesät. Etwa 5 bis 6 Stunden später wurde die Fusion der transfizierten CHO tat-Zellen mit den TZM-bl-Zellen durch einen pH-Shift induziert, indem die Zellen für 2 Minuten DMEM-Medium mit einem pH von 5,5 ausgesetzt wurden, bevor sie erneut das 1:1-Gemisch aus RPMI und DMEM erhielten. Einen Tag später wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit Galakto-Star Lyse-Puffer lysiert. Die Zellysate wurden mit dem BCA Protein Assay Kit auf ihre Proteinkonzentration hin und mit dem Galakto-Star Kit bezüglich ihrer β-Galaktosidase-Aktivität analysiert. Die enzymatische Aktivität wurde mit einem Luminometer gemessen.

2.14 Physikalische Methoden

2.14.1 Saccharose-Dichte-Gradienten-Analyse

Mit Hilfe dieser Methode können Veränderungen die Dichte der Viruspartikel betreffend direkt beobachtet werden.

Über Saccharose-Kissen gereinigte HIV-1_{NL4-3} Viruspartikel wurden entweder mit 1%-igem wässrigem Melissenextrakt, H₂O (1%) oder Triton X-100 (0,5%) vorbehandelt, oder für eine Stunde bei 37°C unbehandelt belassen. Anschließend wurde die Virus-suspension in einem Volumen von 100 µl auf einen linearen Saccharose-Gradienten (3,5 ml) geladen, bestehend aus fünf unterschiedlich konzentrierten Saccharose-Lösungen (20, 30, 40, 50 und 60%), die langsam übereinander geschichtet wurden. Nach Ultrazentrifugation bei 44000 rpm und 4°C für 16 Stunden in einem SW60-Rotor wurden von oben nach unten vorsichtig 24 Fraktionen (je 150 µl) abgetragen, deren p24CA-Konzentration mittels ELISA analysiert wurde.

Zusätzlich wurde die Saccharose-Dichte der Fraktionen eines weiteren parallel gefahrenen Gradienten im Refraktometer bestimmt.

2.14.2 Dialyse

Dieses physikalische Verfahren wird zur Trennung von verschiedenen gelösten Stoffen angewendet, wobei das Lösungsgemisch in einer semipermeablen Hülle (z. B.: Zellulose-Membran) in ein großes Volumen des Lösungsmittels gebracht wird.

Wässriger Melissenextrakt wurde für 24 Stunden bei RT gegen H₂O dialysiert, wobei die *cut-offs* für das Molekulargewicht 3,5 bzw. 12 kDa betragen. Die durch die Dialyse induzierte Volumenveränderung des Extrakts wurde in die Berechnung weiterer Verdünnungsstufen, die für die folgende Viruspartikel-Behandlung benötigt wurden, einbezogen. Die Wirkung der dialysierten Extrakte wurde parallel zu einem ebenfalls für 24 Stunden bei RT gehaltenen Extrakt in HIV-1 *single-round*-Infektionen (siehe 2.11.6) untersucht.

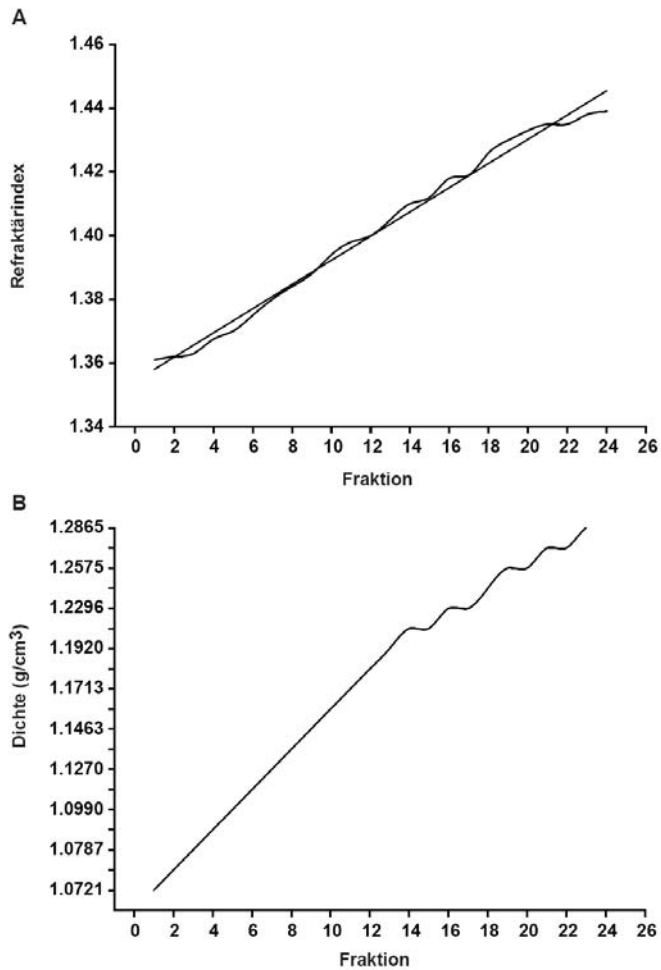


Abb. 2.5: Beispiel für die Linearität der Saccharose-Dichte-Gradienten nach der Ultrazentrifugation bei 44000 rpm und 4°C für 16 Stunden: (A) Vermessung der Fraktionen im Refraktometer. (B) Aus den Refraktärindizes ermittelte Dichte der Fraktionen.

3. Ergebnisse

3.1 Anti-HIV-Aktivität wässriger Extrakte von *Melissa officinalis*, *Mentha x piperita* und *Salvia officinalis*

3.1.1 Wässrige Lamiaceen-Extrakte zeigen eine konzentrationsabhängige anti-HIV-1-Aktivität auf humanen T-Zellen

Die wässrigen Extrakte von Melisse, Pfefferminze und Salbei wurden hinsichtlich ihrer Potenz zur Inhibierung von HIV-1-Infektionen systematisch untersucht. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein experimenteller Ansatz gewählt, der es erlaubte, sowohl mögliche Effekte der Lamiaceen-Extrakte auf die HI-Viruspartikel als auch auf intrazelluläre Schritte des viralen Replikationszyklus zu beobachten.

Das prototypische X4-Virus NL4-3 wurde mit verschiedenen Konzentrationen (0,006 bis 6%) der wässrigen Extrakte für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Fünf Tage nach der Infektion von humanen SupT1-T-Zellen mit den vorbehandelten Viren wurde eine produktive HIV-1-Infektion anhand der p24CA-Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen. Es wurde eine starke und konzentrationsabhängige Inhibierung der HIV-1-Infektion durch die wässrigen Pflanzen-Extrakte beobachtet (oberer Teil der Abb. 3.1). Die IC₅₀-Werte unterschieden sich nicht mehr als dreifach (Salbei: 0,014%; Melisse: 0,045%). Im Mittel mehrerer Experimente betragen die IC₅₀-Werte der drei wässrigen Extrakte zwischen 0,02% (Melisse) und 0,19% (Pfefferminze).

Parallel wurde eine potentielle Extrakt-induzierte Zytotoxizität bzw. die Viabilität der Zellen mittels eines Standard-MTT-Test kontrolliert (Abb. 3.1, unterer Teil). Bei Konzentrationen von $\geq 1\%$ Pfefferminz- und Salbei- sowie $\geq 0,3\%$ Melissen-Extrakt sank die Viabilität der SupT1-Zellen unter 100%.

Durch Bildung eines Quotienten aus CC₅₀-Wert und IC₅₀-Wert lässt sich ein Selektivitätsindex berechnen; aus den Experimenten resultierten Selektivitätsindices (SI) von 71, 73 und 103 für Pfefferminz-, Salbei- und Melissen-Extrakt. Die in SupT-1-Experimenten ermittelten Selektivitätsindices für Pfefferminze, Melisse und

Salbei konnten für eine zweite humane T-Zelllinie, C8166, bestätigt werden (Abb. 3.2 A).

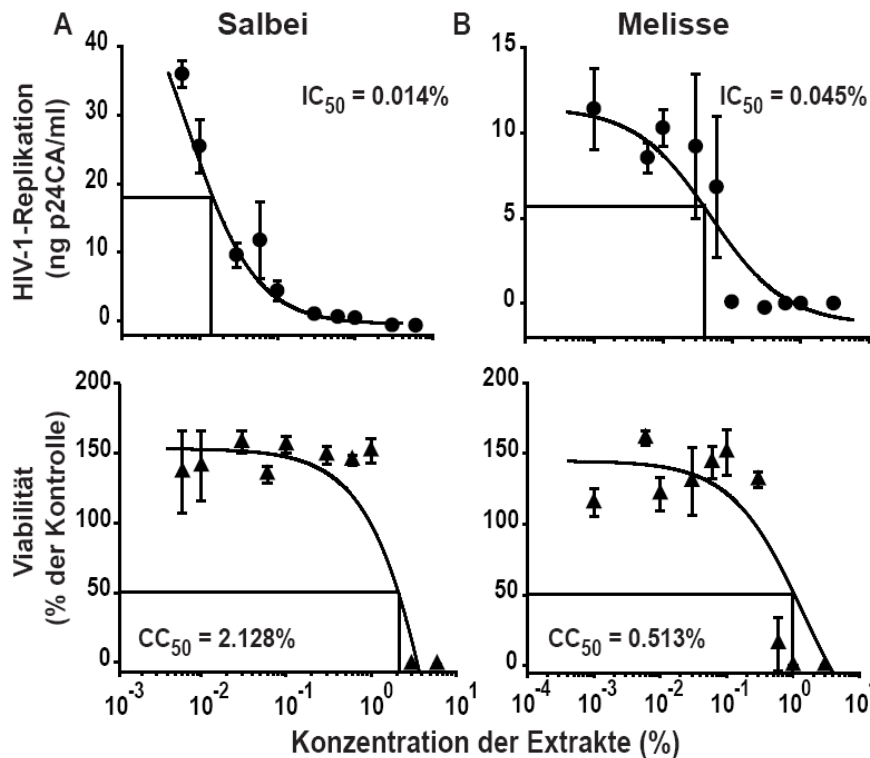


Abb. 3.1 Wässrige Lamiaceen-Extrakte zeigen eine konzentrationsabhängige anti-HIV-1-Aktivität auf SupT1-T-Zellen. Oberer Teil (HIV-1-Replikation): HIV-1_{NL4-3} (5 ng p24CA/ 2×10^4 Zellen) wurden mit den dargestellten Konzentrationen der wässrigen Extrakte von (A) Salbei, (B) Melisse, oder H₂O für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend folgten die Inokulation von SupT1-Zellen mit der Virus-Extrakt-Suspension über Nacht und ein Waschschrift am nächsten Tag. Die HIV-1-Replikation wurde 5 Tage p.i. über p24CA-Antigen-ELISA gemessen. Unterer Teil (Viabilität): Zeitgleich wurden SupT1-Zellen mit den identischen Extrakt-Konzentration über Nacht behandelt, am Folgetag gewaschen und vier Tage später in einem Standard-MTT-Viabilitätstest analysiert. Jedes Experiment ($n = 4 - 6$) wurde in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen eines repräsentativen Experiments.

3.1.2 Potente Inhibition der HIV-1-Infektion *ex vivo* in der humanen Tonsillen-Histokultur und in primären Makrophagen durch wässrige Lamiaceen-Extrakte

Die Untersuchung der anti-HIV-Aktivität der Lamiaceen-Extrakte wurde auch auf ein *ex vivo* Modellsystem mit großer biologischer Relevanz, die humane lymphoide Aggregationskultur (HLAC), ausgedehnt. Die wässrigen Extrakte wurden, wie oben beschrieben (3.1.1) in unterschiedlichen Konzentrationen mit Viruspartikeln inkubiert, und inhibierten die Infektion des Tonsillengewebes deutlich (oberer Teil der Abb. 3.2 B). Erwähnenswert ist, dass sich in den meisten Experimenten Konzentrationen der Extrakte von bis zu 10% als nicht-toxisch erwiesen (Abb. 3.2 B).

Des Weiteren zeigte sich in Experimenten mit primären humanen Makrophagen, dass eine kontinuierliche Behandlung mit Melissenextrakt in Konzentrationen bis zu 3% über eine Zeitspanne von 16 Tagen nicht toxisch war (Abb. 3.2 E). Von Bedeutung ist, dass die Infektion dieser Primärzellen mit vorbehandeltem Makrophagen-tropen R5-Virus YU-2 in der fortlaufenden Anwesenheit des Melissenextrakts drastisch reduziert werden konnte (Abb. 3.2 C, D). Je nach Höhe der Extrakt-Konzentration (1 und 0,3%) konnte die HIV-1-Infektion der Makrophagen über 16 Tage hinweg nahezu komplett inhibiert werden (Abb. 3.2 C). Die Endpunkt-Analyse ergab einen IC_{50} von 0,018% (Abb. 3.2 D).

Zusammenfassend konnte eine potente anti-HIV-Aktivität gegen X4- und R5-Viren von drei wässrigen Lamiaceen-Extrakten in nicht-zytotoxischen Konzentrationen *ex vivo* identifiziert werden.

3.1.3 Wässrige Lamiaceen-Extrakte wirken auf die HIV-1-Partikel

Charakteristisch für den HIV-1-Replikationszyklus ist eine geordnete Abfolge von Ereignissen, die antiviral wirksamen Agentien mehrere theoretische Möglichkeiten offeriert, mit der Replikation zu interferieren. Um einen ersten Einblick in die Wirkungsweise der Lamiaceen-Extrakte zu gewinnen, wurde ein paralleler Vergleich des Effekts der Extrakte auf Virionen und Zielzellen einerseits und der Wirkung auf die Zellen in Abwesenheit von Viruspartikeln andererseits durchgeführt. Experimentell wurde für diesen Zweck zum einen so verfahren, wie bereits beschrieben (Abb. 3.1), und zum anderen wurde ein zweiter experimenteller Aufbau untersucht, bei dem die Zielzellen für eine Stunde mit den wässrigen Extrakten inkubiert und vor der Zugabe von Virus weitestgehend durch Waschen von den Extrakten befreit wurden.

Wie in vorherigen Experimenten resultierte die gemeinsame Exposition von Viruspartikeln und Zielzellen mit Lamiaceen-Extrakten in einer starken konzentrationsabhängigen Inhibition der HIV-1-Replikation (Abb. 3.3 A). Der Grad der Inhibition ähnelte dem, der in mit dem Reverse Transkriptase-Inhibitor Efavirenz in hoher Konzentration [10 μ M] vorbehandelten Kontroll-Kulturen beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu hatte die reine Vorbehandlung der Zielzellen mit den wässrigen Extrakten entweder keinen (Melissen-Extrakt; Abb. 3.3 B) oder einen drastisch reduzierten antiviralen Effekt (56-fach für Pfefferminz, > 250-fach für Salbei-Extrakt;

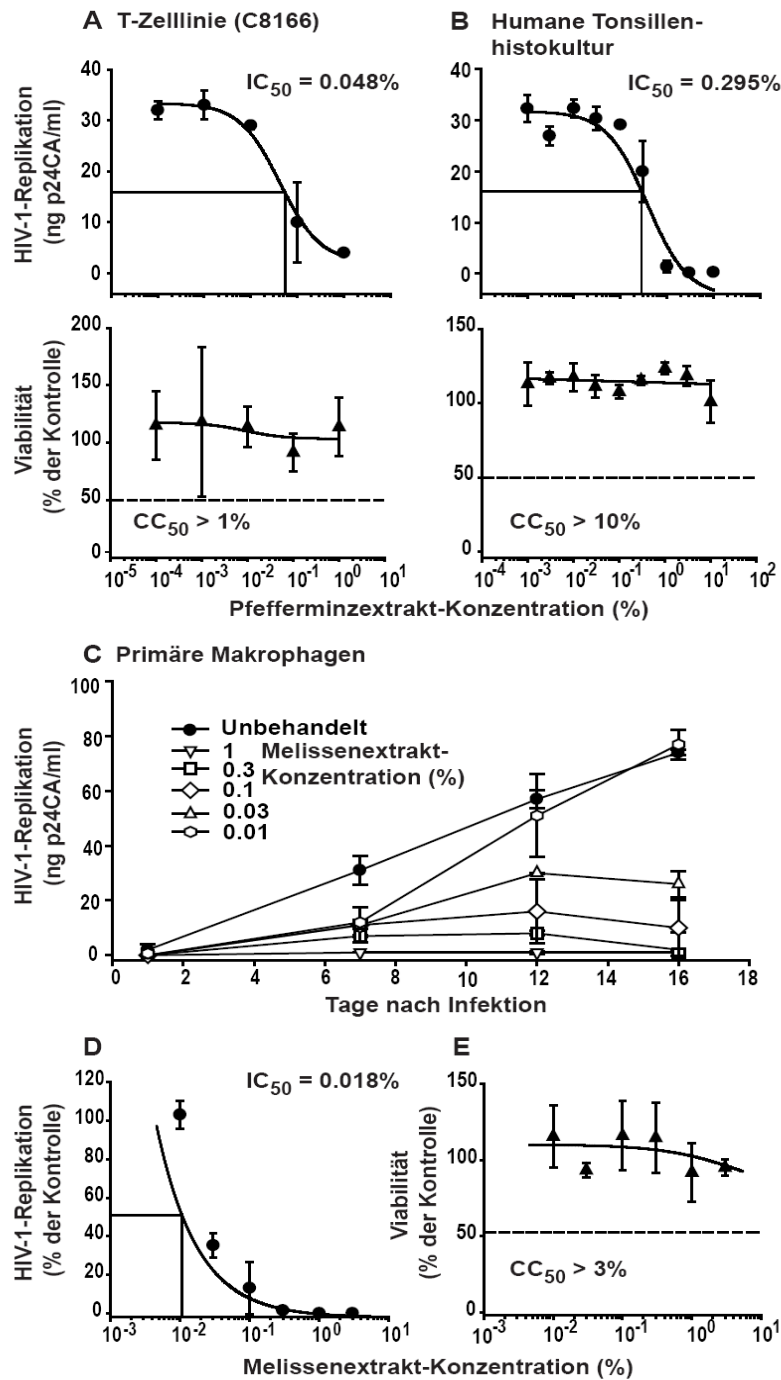


Abb. 3.2: Potente Inhibition der HIV-1-Infektion in C8166-T-Zellen, *ex vivo* in der humanen Tonsillen-Histokultur und in primären Monozyten-abgeleiteten Makrophagen durch wässrige Lamiaceen-Extrakte. Die anti-HIV-1_{NL4-3}-Aktivität und die Zytotoxizität wässrigen Pfefferminz-Extrakts wurde in C8166 T-Zellen (A) und in der HLAC (B), im Prinzip wie in der Legende zu Abb. 3.1 beschrieben, analysiert. 2 bis 4 unabhängige Experimente (jeweils Triplikate) wurden durchgeführt, gezeigt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung von einem Experiment. (C) HIV-1_{YU-2}-Replikationskinetik in Makrophagen bei kontinuierlicher Extrakt-Exposition. Virusstocks wurden mit Melissen-Extrakt (Konzentrationen wie abgebildet) für eine Stunde bei 37°C inkubiert bevor die Virus-Extrakt-Suspension zu primären Makrophagen gegeben wurde. Die Zellen wurden am nächsten Tag gewaschen und dann kontinuierlich in Medium mit den verschiedenen Melissenextrakt-Konzentrationen kultiviert. Die HIV-1-Replikation wurde an den Tagen 1, 7, 12 und 16 nach Infektion durch p24CA-Antigen-ELISA nachvollzogen. (D) Werte der HIV-1-Replikation am Tag 16 nach Infektion relativ zur unbehandelten Kontrolle. (E) Parallel zum Infektionsexperiment wurden humane Makrophagen über 16 Tage mit den identischen Melissenextrakt-Konzentrationen in Abwesenheit von Virus kultiviert und in einem Standard-MTT-Test analysiert. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung relativ zur unbehandelten Kontrolle eines Donors.

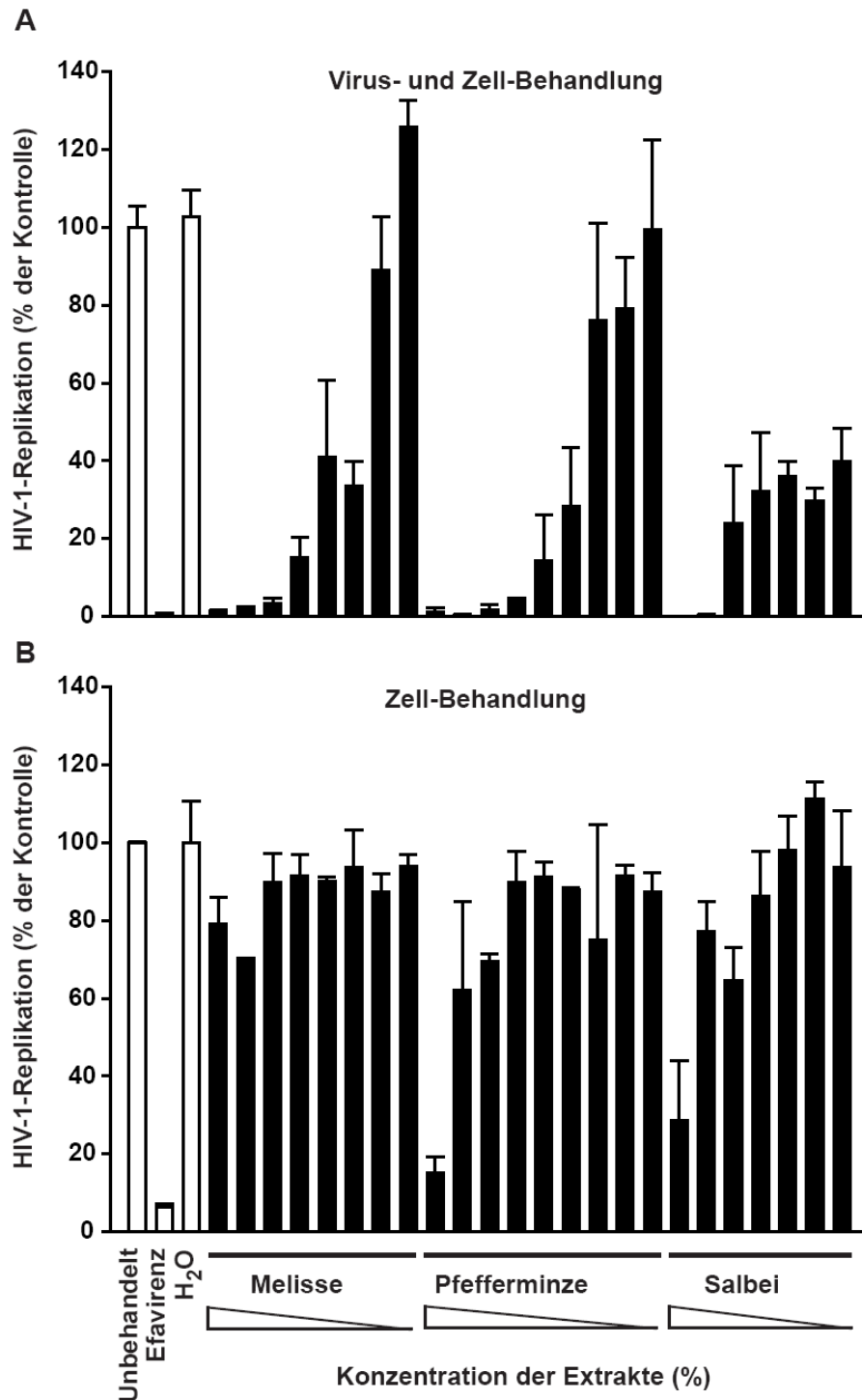


Abb. 3.3: Extrakt-Behandlung von Viruspartikel und den Zielzellen, aber nicht der Zielzellen allein, hemmt die HIV-1-Replikation. (A) Partikel- und Zellbehandlung. HIV-1_{NL4-3} wurde mit wässrigen Extrakten in einer Konzentration von 0,001 bis 0,3% (Melisse), 0,006 bis 3% (Pfefferminze) oder 0,006 bis 1% (Salbei), H₂O als Lösungsmittel-Kontrolle oder Efavirenz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und zu SupT1-T-Zellen gegeben. (B) Zellbehandlung. Die Zellen wurden direkt mit den wässrigen Extrakten, H₂O oder Efavirenz behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und über Nacht mit HIV-1_{NL4-3} inokuliert. Die Analyse der HIV-1-Replikation wurde wie in der Legende zu Abb. 3.1 ausgeführt. Gezeigt werden die Mittelwerte ± Standardabweichung relativ zur unbehandelten Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, von einem repräsentativen Experiment aus dreien.

Abb. 3.3 B), was nahe legt, dass es keine oder nur eine transiente anti-HIV-Aktivität auf der Ebene der intrazellulären Replikationsschritte gibt. Ein standardmäßig parallel durchgeführter MTT-Test gab keinen Hinweis auf Zytotoxizität durch die verwendeten Extrakt-Konzentrationen.

3.1.4 Wässrige Lamiaceen-Extrakte inhibieren die Fusion von HI-Viren mit der Zelle

Möglicherweise werden also die ersten Ereignisse im Infektionsprozess, die Interaktion des Viruspartikels mit dem HIV-Rezeptor-Komplex und die darauf folgende Membranfusion, durch die Extrakt-Exposition beeinflusst oder beeinträchtigt. Zur Erforschung dieser Hypothese wurde der HIV-Virionen-Fusionstest angewendet. Dieses Test-System basiert auf der Inkorporation des chimären β -Laktamase-Vpr-Fusionsproteins während der Virusproduktion in replikationskompetente HIV-1-Virionen, und dessen als Konsequenz der Virus-Fusion folgende Freisetzung in das Zytoplasma der Zielzelle. Die BlaM-Vpr-vermittelte Spaltung des fluoreszierenden CCF2-Substrats, mit dem die Zielzellen beladen werden, erlaubt eine sensitive und quantitative Detektion des Virus-Eintritts mittels Durchflusszytometrie.

Die Spezifität des Tests wurde unter Einbeziehung verschiedener Kontrollen, einschließlich des CXCR4-Korezeptor-Antagonisten AMD3100, des Fusionsinhibitors Enfuvirtid und von Efavirenz (oberer Teil der Abb. 3.4 A), bestätigt. Dem entsprechend blockierten AMD3100 und Enfuvirtid die Virionen-Fusion mit den Zielzellen, während Efavirenz in seiner Funktion als Inhibitor der Reversen Transkriptase nicht mit dem Fusionsprozess interferierte. Hingegen induzierte die Behandlung von Viruspartikeln mit wässrigen Extrakten von Melisse (Abb. 3.4 A, B), Salbei und Pfefferminze (nicht dargestellt) eine sehr potente Inhibition der HIV-1-Fusion mit C8166-T-Zellen ohne Zytotoxizität (Abb. 3.4 C und nicht abgebildet). Die Selektivitätsindices betragen > 198 für Salbei und bis zu > 1834 für Melisse.

Um die Frage zu klären, ob der Effekt auf den HIV-1-Eintritt vollständig die antivirale Wirkung auf die HIV-1-Replikation widerspiegelt, wurde HIV-1_{NL4-3}BlaM-Vpr mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Melissen-Extraktes inkubiert, und der Grad der antiviralen Aktivität parallel in einem Virionen-Fusionstest und im Kontext einer C8166-Infektion analysiert. Die Dosis-Wirkungskurven beider Analysen weisen

einen auffallend ähnlichen Verlauf auf (Abb. 3.4 B), was nahe legt, dass die Inhibition des HIV-1-Eintritts der Hauptmechanismus ist, durch den die antivirale Aktivität erzielt wird.

Anzumerken ist, dass die antivirale Wirkung der Lamiaceen-Extrakte unabhängig von der Anwesenheit fötalen Kälberserums im Zellkultur-Medium ist. Die Abwesenheit von FCS während der Virus-Extrakt-Inkubation und der Infektionsperiode der Zellen hatte keinen negativen Einfluss auf die Fähigkeit der Extrakte die HIV-1-Fusion zu hemmen (Abb. 3.5).

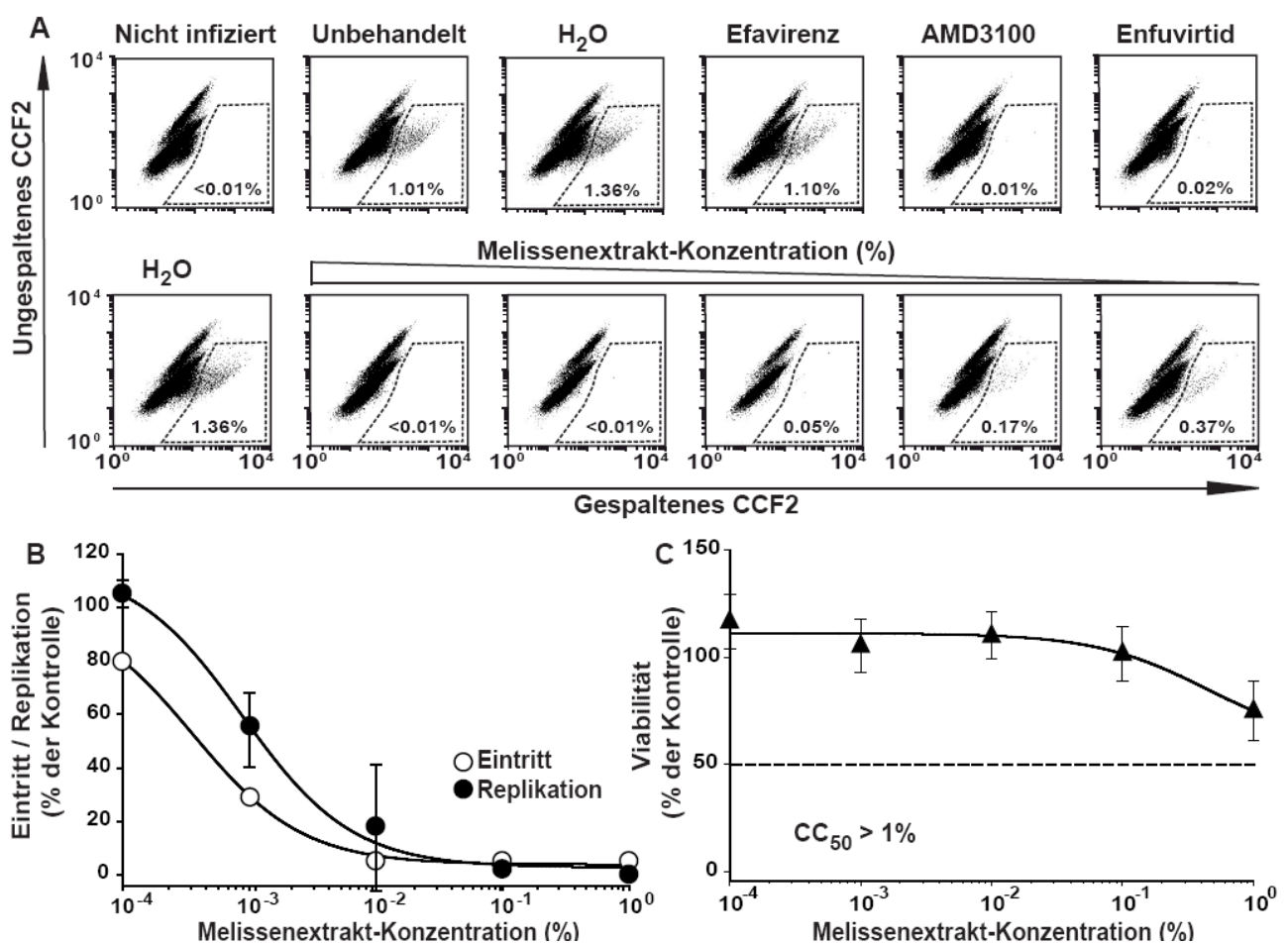


Abb. 3.4: Wässriger Melissen-Extrakt inhibiert effizient die Virus-Fusion, resultierend in einer konkordanten Inhibition der HIV-1-Replikation. (A) HIV-1_{NL4-3}-Virionen, die das BlaM-Vpr-Konstrukt tragen, wurden mit 0,001 bis 1%-igem Melissen-Extrakt für eine Stunde bei 37°C inkubiert, und anschließend zu C8166-T-Zellen gegeben. Alternativ wurden die T-Zellen mit AMD3100, Enfuvirtid oder Efavirenz für 15 Minuten vorbehandelt und dann mit Virus inokuliert. Die Virionen-Fusion wurde, wie bei Venzke et al. 2006 und Goffinet et al. 2007 beschrieben, durchflusszytometrisch analysiert. Abgebildet sind repräsentative FACS-Punktwolkendarstellungen zur Detektion der CCF2-Substrat-Spaltung. (B) Ein Replikationstest wurde analog zum in der Legende zu Abb. 3.1 beschriebenen experimentellen Ablauf mit dem identischen Virus-Stock des Virionen-Fusionstest durchgeführt. (C) MTT-Viabilitätstest. Jedes der vier unabhängigen Experimente bestand aus Triplikaten. Mittelwert ± Standardabweichung eines Experiments sind gegeben.

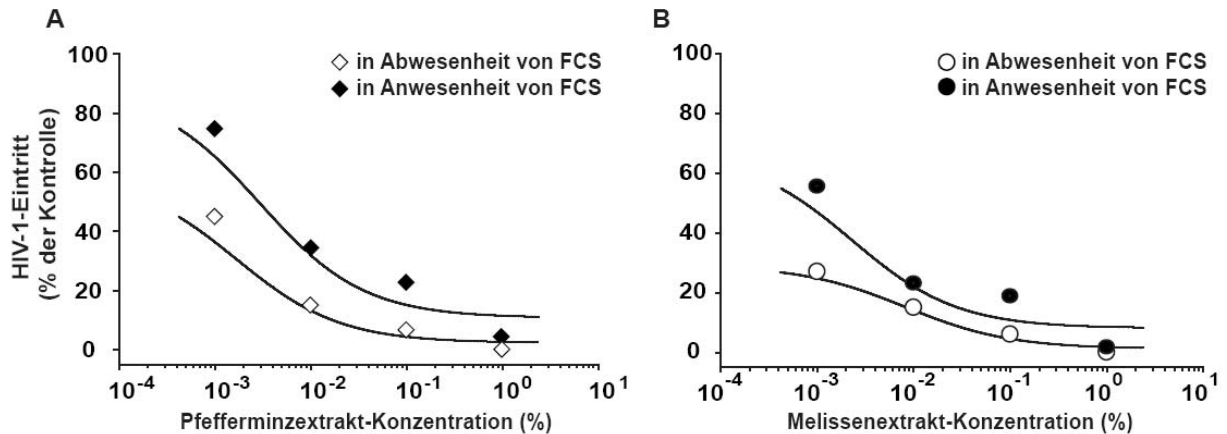


Abb. 3.5: Die Inhibition der Virionen-Fusion ist unabhängig von der Anwesenheit von FCS. HIV-1_{NL4-3}-Virionen, die das BlaM-Vpr-Konstrukt tragen, wurden mit 0,001 bis 1%-igem (A) Pfefferminz-Extrakt oder (B) Melissen-Extrakt für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend für die Infektion von C8166-T-Zellen verwendet. Die Virionen-Fusion wurde durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt werden die Messwerte eines Experiments relativ zur unbehandelten Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde.

3.1.5 Melissen-Extrakt inhibiert Enfuvirtid-insensitive HIV-1-Mutanten

Basierend auf dem Ergebnis, dass Lamiaceen-Extrakte die virale Infektiosität durch die Inhibition der HIV-1-Fusion beeinträchtigen, wurden die Extrakte hinsichtlich ihrer Aktivität gegen Enfuvirtid-resistente HIV-1-Stämme getestet. Dabei handelt es sich um HIV-1-Stämme, welche in *env* Mutationen tragen, die eine partielle Resistenz gegenüber dem Fusionsinhibitor Enfuvirtid verleihen (Heil, Decker et al. 2004; Neumann, Hagmann et al. 2005). Ziel des Experimentes war es zu untersuchen, ob sich die Suszeptibilität der Viren für Melissen-Extrakt mit der Determinante für die Enfuvirtid-Resistenz überschneidet.

In Luziferase-Reporter-Tests auf TZM-bl-Zellen erwiesen sich die beiden HIV-1_{NL4-3} *env*-Mutanten (V38A, X23) dem antiviralen Effekt des Melissen-Extrakts gegenüber als ebenso suszeptibel wie Wildtyp-NL4-3 (Abb. 3.6 A). Im Gegensatz dazu benötigten die Mutanten verglichen mit dem Wildtyp-Virus höhere Enfuvirtid-Konzentrationen zur Inhibition der Infektion (Abb. 3.6 A), wie bereits gezeigt (Heil et al. 2004; Neumann et al. 2005).

3.1.6 Die anti-HIV-1-Aktivität des Melissen-Extrakts wirkt schnell, aber ist reduziert gegen Oberflächen-gebundene Virionen

Um die Kinetik der Extrakt-vermittelten antiviralen Aktivität näher zu charakterisieren, wurden die HIV-1-Partikel vor der Zugabe zu den Zellen entweder für eine Stunde bei 37°C mit Melissen-Extrakt vorbehandelt, was dem standardmäßig verwendeten experimentellen Aufbau entspricht, oder simultan mit dem Extrakt zu den Zellen gegeben. Beide Bedingungen führten zu einer antiviralen Wirkung von äquivalenter Potenz (Abb. 3.6 B), was für eine sofortige Entfaltung der antiviralen Aktivität spricht.

Kontrastierend dazu verhält sich die Wirkung auf Oberflächen-gebundene Viruspartikel, welche für zwei Stunden bei 4°C an TZM-bl-Zellen adsorbieren konnten. Man geht davon aus, dass es bei diesem experimentellen Ablauf zur Bindung aber nicht zur Internalisierung der Viruspartikel kommt. Die an die Zelloberfläche gebundenen Virionen ($IC_{50} > 0,1\%$) waren mindestens 100-fach weniger suszeptibel gegenüber der Extrakt-induzierten Inaktivierung als freie Viruspartikel ($IC_{50} = 0,002\%$) (Abb. 3.6 C). Die freien Virionen stehen damit im Fokus der rasch wirkenden antiviralen Aktivität der Lamiaceen-Extrakte.

3.1.7 Melissen-Extrakt führt nicht zur Inhibition einer HIV-1-Env-vermittelten Zell-Zell-Fusion

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der antivirale Effekt auf die Virionen-Fusion in einem klassischen Zell-Zell-Fusionstest nachgestellt werden kann. Hierbei exprimieren CHO-Donor-Zellen sowohl das HIV-1-JR-FL-Hüllprotein als auch den viralen Transaktivator Tat. Die Fusion mit CD4/CCR5-exprimierenden TZM-bl-Zielzellen resultiert in einer Tat-vermittelten Expression des β -Galaktosidase-Reporter-Gens; die relative enzymatische Aktivität kann quantifiziert werden (Abb. 3.7 A) (Michel, Ganter et al. 2006; Venzke, Michel et al. 2006).

Die Donorzellen wurden vor der Zugabe der Zielzellen mit verschiedenen Melissen-Extrakt-Konzentrationen vorbehandelt. Die Kokultivierung der Zellen erfolgte für 24 Stunden, bis zur Analyse, unter kontinuierlicher Extrakt-Behandlung. Das als Positivkontrolle eingesetzte Enfuvirtid verhinderte effektiv die Env-vermittelte Fusion von Donor- und Zielzellen (Abb. 3.7 B), wohingegen das wässrige Melissen-

Extrakt selbst in der höchsten nicht-toxischen Konzentration nicht mit dem Fusionsprozess interferieren konnte. Dem zu folge scheint die Extrakt-induzierte antivirale Aktivität ihre Wirkung nicht auf Donor-Zellmembranen im Allgemeinen zu entfalten, sondern eher eine Spezifität für freie Viruspartikel zu besitzen.

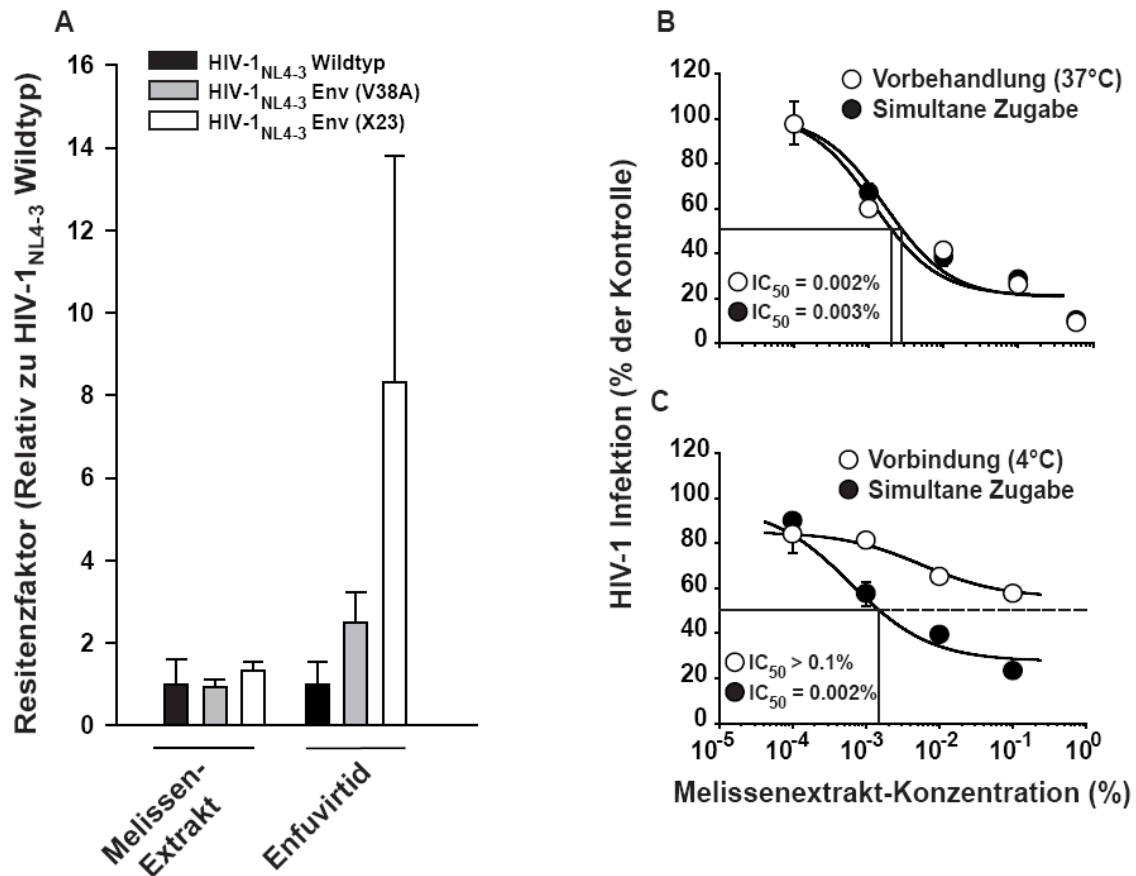


Abb. 3.6: Der wässrige Melissen-Extrakt vermittelt seine volle antivirale Aktivität gegen HIV-1-Mutanten mit reduzierter T20-Sensitivität, aber eine abgeschwächte gegen Oberflächen-gebundene Virionen. (A) HIV-1_{NL4-3}-Wildtyp, HIV-1_{NL4-3}Env (V38A)- und HIV-1_{NL4-3}Env (X23)-Virionen wurden mit Melissen-Extrakt der Konzentrationen 0,00001 bis 1% für eine Stunde bei 37°C behandelt und zu TZM-bl-Zellen gegeben. Alternativ wurden die TZM-bl-Zellen mit Enfuvirtid in ansteigender Konzentration von 0,0032 bis 10 µM für 15 Minuten vorbehandelt und dann mit HIV-1_{NL4-3}-Wildtyp und den HIV-1-Mutanten inokuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen. 72 Stunden nach der Infektion folgte auf die Zellyse eine Quantifizierung der Luziferase-Aktivität. Die Experimente wurden in Triplikaten und jeweils viermal unabhängig durchgeführt. Die IC₅₀-Werte für die HIV-1_{NL4-3}-Wildtyp-Infektionen wurden arbiträr auf 1 gesetzt und der Grad der Resistenz für die Mutanten wurde für jedes Experiment berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler der Resistenzfaktoren von vier Experimenten. (B) HIV-1_{NL4-3}GFP-Reporterviren, pseudotypisiert mit JR-FL Env, wurden entweder für eine Stunde bei 37°C mit Melissen-Extrakt vorbehandelt oder sofort mit dem wässrigen Extrakt zu TZM-bl-Zellen gegeben. Der Grad der Hemmung wurde über die durchflusszytometrische Messung des Prozentsatzes der GFP-positiven Zellen ermittelt (C) Alternativ wurden die Reporter-Viren entweder für 2 Stunden bei 4°C mit Zellen inkubiert, dann mit Extrakt behandelt und bei 37°C weiter kultiviert, oder simultan mit dem Extrakt zur Inokulation von Zellen bei 37°C verwendet. Die als Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3) gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 bis 4 unabhängige Experimente.

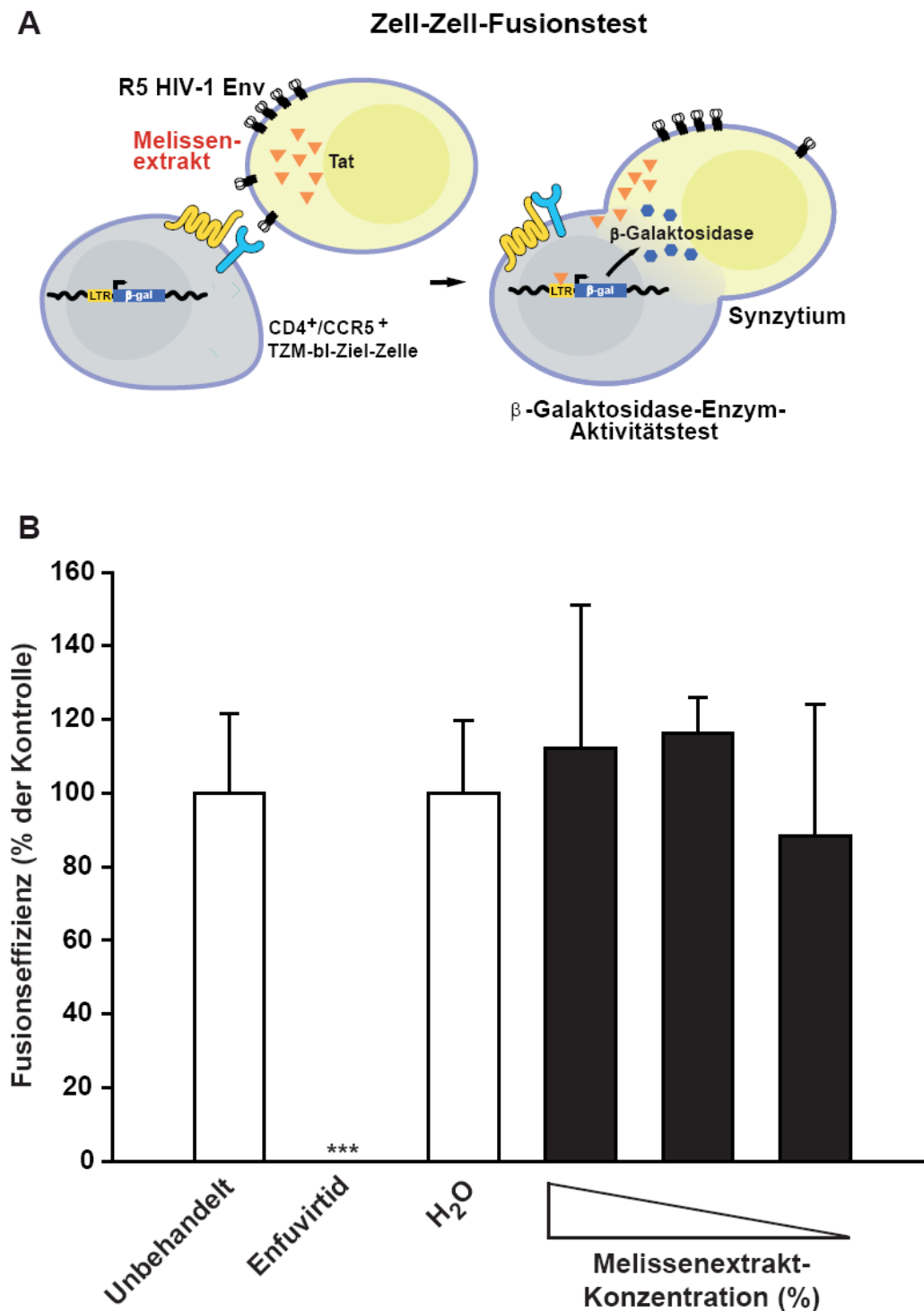


Abb. 3.7: HIV-1-Env-vermittelte Zell-Zell-Fusion wird nicht durch Melissen-Extrakt gehemmt. (A) Schematische Darstellung zur Quantifizierung der Env-vermittelten Zell-Zell-Fusion (freundlicherweise von Dr. Nico Michel zur Verfügung gestellt). Die Fusionseffizienz der TZM-bl-Zielzellen, die den HIV-Rezeptor-Komplex tragen und mit CHO Tat-Zellen kokultiviert wurden, die transient JR-FL-Env-Proteine exprimieren, wurde über die β -Galaktosidase-Aktivität in Relation zur Protein-Konzentration bestimmt. (B) Nach Transfektion über Nacht wurden die JR-FL-Env exprimierenden CHO Tat-Zellen vor der Zugabe zu den TZM-bl-Zellen für eine Stunde bei 37°C entweder mit verschiedenen Konzentrationen des Melissen-Extrakts (0,6 über 0,1 bis 0,06%), mit H₂O oder Enfuvirtid als Positivkontrolle inkubiert. Die Behandlung dauerte während des gesamten Zeitraums der Kokultivierung an. Die relative Fusionseffizienz un behandelter Zellen wurde auf 100% gesetzt, und die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 4) sind dargestellt. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. *** Student's t-test: p < 0,001.

3.1.8 Wässrige Lamiaceen-Extrakte inhibieren sowohl Viruspartikel, die R5-HIV-1-Envs oder das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus tragen, als auch das Moloney-Maus-Leukämie-Virus

Die antivirale Aktivität der wässrigen Extrakte richtet sich hauptsächlich gegen ungebundene Virionen, dieses Ergebnis entstammte vornehmlich Experimenten mit dem X4-Prototypen NL4-3. Im nächsten Schritt wurde in *single-round*-Infektionstests untersucht, ob die Infektion mit HIV-1_{NL4-3}-Virionen, die mit Envs von CCR5-tropen Viren oder mit heterologem VSV-G pseudotypisierten wurden, auch durch die Extrakt-Behandlung beeinflusst werden kann.

Pfefferminz-Extrakt inhibierte konzentrationsabhängig die Infektion von TZM-bl-Zellen mit HIV-1-GFP-Reporterviren, die entweder das R5-Env von JR-FL (Abb. 3.8 A; $IC_{50} = 0,184 \pm 0,0037\%$ ($n = 3$)) oder von YU-2 (Abb. 3.8 B; $IC_{50} = 0,028 \pm 0,003\%$ ($n = 3$)) trugen. Im Hinblick auf den Mechanismus ist interessant, dass die Infektion mit VSV-G-Pseudotypen ebenfalls potent gehemmt wurde (Abb. 3.8 C; $IC_{50} = 0,079 \pm 0,028\%$ ($n = 3$)).

Des Weiteren wurde auch die Infektion mit einem umhüllten γ -Retrovirus, dem ekotropen Moloney-Maus-Leukämie-Virus, das zusätzlich für GFP kodiert (MoMLV-GFP), durch die Anwendung von wässrigem Lamiaceen-Extrakt inhibiert (Abb. 3.8 E).

Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Wirkung der Lamiaceen-Extrakte auf ein Spektrum verschiedener Virus-Hüllproteine steht auch die Analyse der Aktivität gegen nicht-umhüllte Viruspartikel. Im Gegensatz zu der antiviralen Aktivität gegen umhüllte Viren (HSV (Nolkemper, Reichling et al. 2006), HIV, VSV-G, MoMLV) wurde die Infektion von TZM-bl-Zellen mit einem nicht-umhüllten Adenovirus vom Typ 5 durch die Lamiaceen-Extrakt-Behandlung gar nicht oder nur leicht beeinträchtigt (Abb. 3.8 F), und eine Bestimmung von IC_{50} -Werten war in drei von vier unabhängigen Experimenten nicht möglich. Die Extrakte sind demnach gegen unbehüllte Adeno-Viren beträchtlich weniger aktiv, was insgesamt nahe legt, dass die Virusmembran den primären Angriffspunkt der Pflanzenextrakte darstellt.

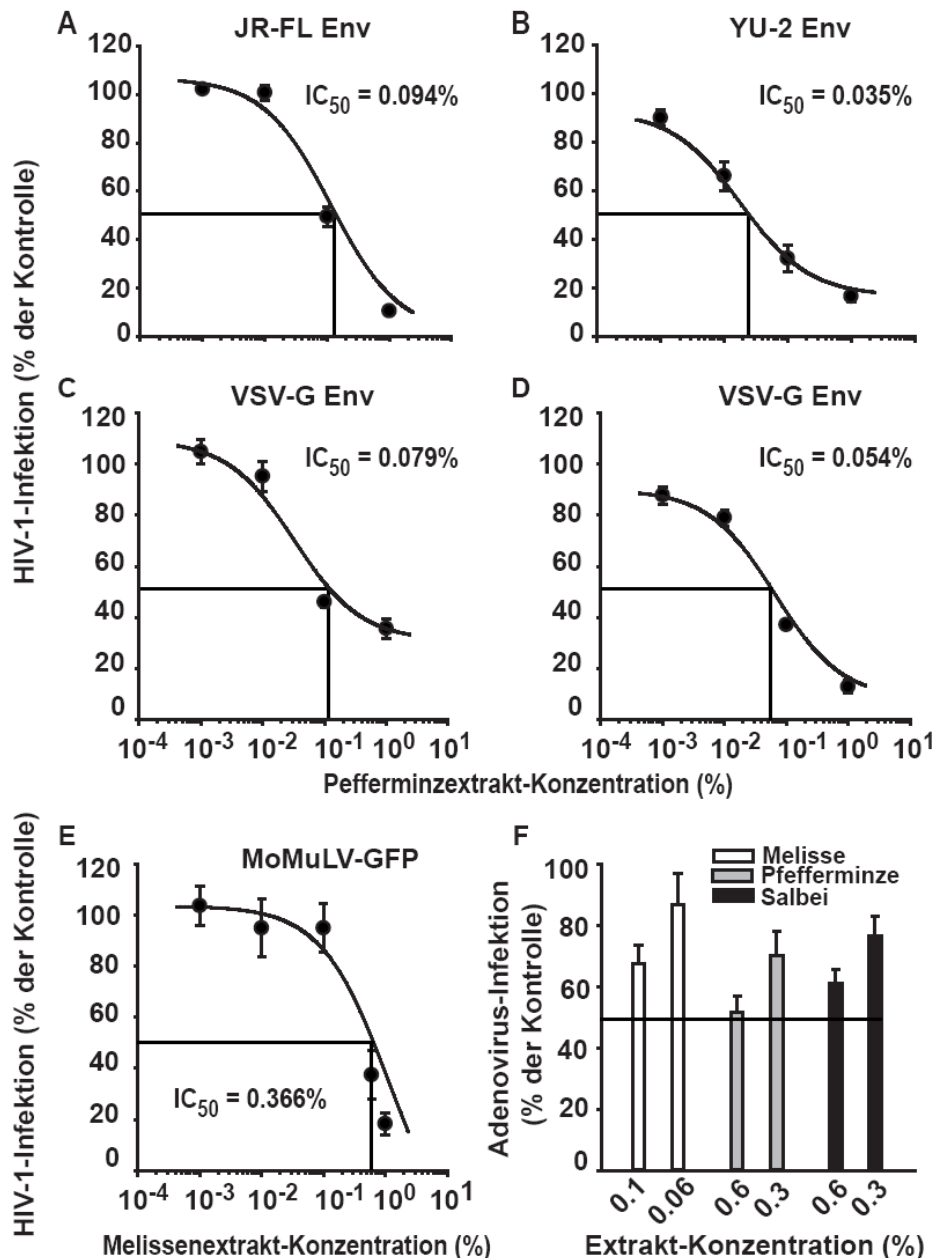


Abb. 3.8: Die Lamiaceen-Extrakte zeigen eine übergreifende antivirale Aktivität gegen verschiedene R5 HIV-1-Envs, VSV-G-Pseudotypen und MoMLV, aber nicht gegen Adenovirus Typ 5

HIV-1-GFP-Reporterviren, entweder pseudotypisiert mit R5 HIV-1-Envs von (A) JR-FL, (B) YU-2 oder (C, D) VSV-G wurden mit Pfefferminz-Extrakt in mehreren Konzentrationen für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend zu TZM-bl-Zellen gegeben, Die Zellen wurden am nächsten Tag gewaschen und am dritten Tag nach der Infektion hinsichtlich ihrer GFP-Expression durchflusszytometrisch analysiert. (E) Replikationskompetentes ekotropes MoMLV-GFP wurde vor der Zugabe zu primären IL-2/ConA-stimulierten Ratten-T-Zellen mit Melissen-Extrakt inkubiert. Der Grad der Infektion wurde am Tag 4 nach Infektion gemessen, wobei der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen der H₂O-behandelten Kontrollkultur auf 100% gesetzt wurde. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt, wobei jedes Experiment 2- bis 3-mal durchgeführt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von jeweils einem repräsentativen Experiment, bzw. zweien für VSV-G. (F) Adenovirus Typ5-GFP-Reporterviren wurden mit Lamiaceen-Extrakten in zwei hohen nicht-toxischen Konzentrationen für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend zu TZM-bl-Zellen gegeben, Die Zellen wurden am nächsten Tag gewaschen und am darauf folgenden Tag auf GFP-positive Ereignisse im Durchflusszytometer analysiert. Vier unabhängige Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt. Darstellung der Mittelwerte ± Standardfehler (n = 4).

3.1.9 Bestimmte Hauptinhaltsstoffe der wässrigen Lamiaceen-Extrakte sind nicht gegen HIV-1 aktiv

Vorteilhaft wäre in den komplexen wässrigen Extrakten solche Einzelsubstanz(en) zu identifizieren, die die antivirale Aktivität vermitteln. In der Arbeitsgruppe von Prof. Reichling durchgeführte HPLC-UV- und LC-MS-Analysen (Nolkemper, Reichling et al. 2006) ergaben, dass Rosmarinsäure die phenolische Hauptkomponente in allen drei untersuchten wässrigen Lamiaceen-Extrakten ist (Konzentrationen: 143 - 2962 mg/L) und dass Kaffeesäure in hohen Konzentrationen (35 - 40 mg/L) in Melissen- und Pfefferminz-Extrakt vorkommt.

Rosmarin- und Kaffeesäure wurden in nicht-zytotoxischen Konzentrationen von 10 mM bis 1 μ M einzeln oder in Kombination zur Vorbehandlung von HIV-1_{NL4-3'}-Virusstocks verwendet. Parallel dazu wurden humane SupT1-T-Zellen mit Melissen-Extrakt-exponierten Viruspartikeln infiziert. Nach einem Waschschrift am Folgetag wurde die produktive HIV-1-Replikation mittels p24CA-Antigen-ELISA am Tag 5 nach Infektion nachgewiesen. Die Melissen-Extrakt-Behandlung resultierte erwartungsgemäß in einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Infektion charakterisiert durch einen IC₅₀-Wert unter 0,01% (Abb. 3.9 A), während die Kaffee- und Rosmarinsäure-Behandlungen unter jeder Bedingung jeglichen antiviralen Effekts entbehrten (Abb. 3.9 B).

Eine Melissen-Extrakt-Konzentration von 0,01% entspricht einer Rosmarinsäure-Konzentration von 0,8 μ M und einer Kaffeesäure-Konzentration von 0,02 μ M. Folglich wurde für die Phenolsäuren selbst in 10⁵-fach höheren Konzentrationen als im Lamiaceen-Extrakt vorkommend keine anti-HIV-1-Aktivität beobachtet.

Da dementsprechend weder diese Hauptinhaltsstoffe für die antivirale Wirkung verantwortlich sind noch bekannt ist, welche Komponente(n) darüber hinaus die anti-HIV-Aktivität induzieren, sollte geklärt werden, ob die drei Lamiaceen-Extrakte synergistisch wirken können. Zwecks dessen wurden HIV-1-GFP-Reporterviren entweder mit jedem einzelnen Extrakt in einer Konzentration von 0,1 oder 0,6% oder einer Mischung aus Melissen-, Pfefferminz- und Salbei-Extrakt in den identischen Endkonzentrationen für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Damit wurden TZM-bl-Zellen infiziert, die 72 Stunden später durchflusszytometrisch untersucht wurden. Innerhalb dieser zwei Konzentrationsgruppen war der Inhibitionsgrad unter allen vier Extrakt-

Bedingungen nicht zu unterscheiden (Abb. 3.9 C), was gegen Synergismus in der antiviralen Wirkung der Extrakte spricht.

Als zusätzliche Charakterisierung wurde eine Extrakt-Dialyse durchgeführt. Die Dialyse stellt ein physikalisches Verfahren zur Trennung chemischer Stoffe dar, dazu wurden Zellulose-Membranen mit unterschiedlicher Porengröße (3,5 kDa und 12 -14 kDa) verwendet. Die Extrakt-Dialyse legte nahe, dass die antiviralen Komponenten im Melissen-Extrakt eine Größe von mehr als 12 kDa aufweisen (Abb. 3.9 D).

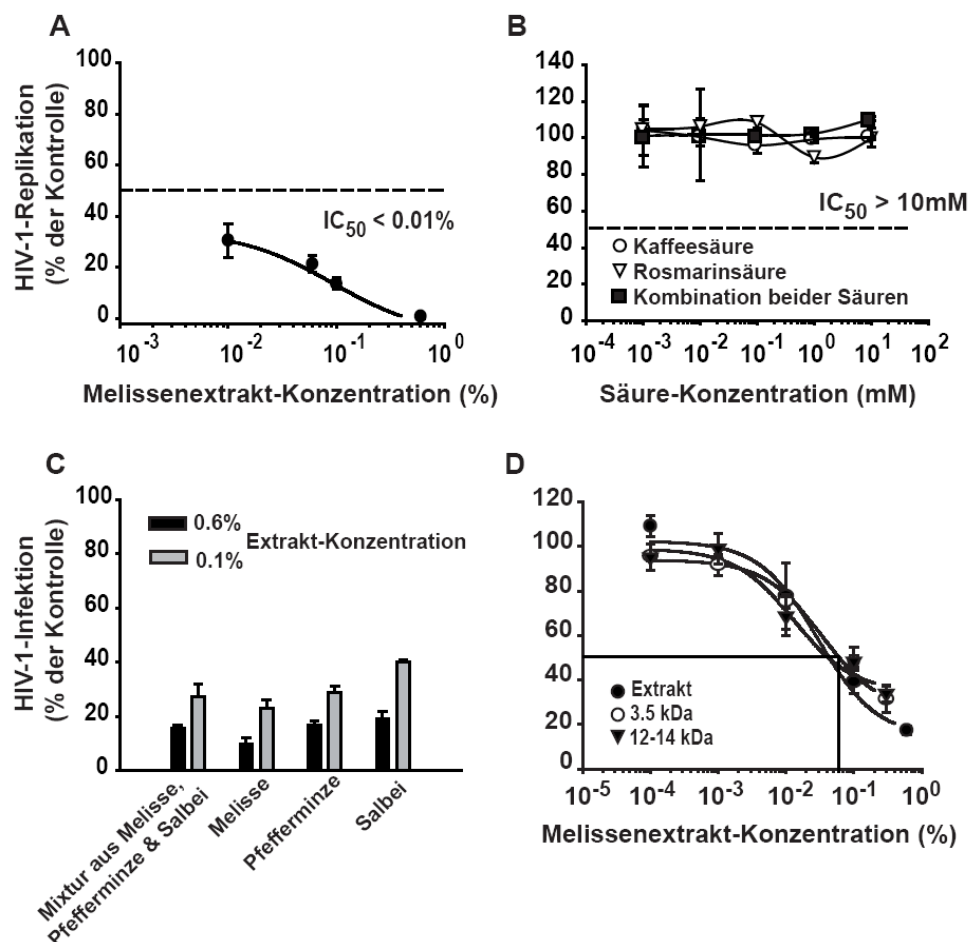


Abb. 3.9: Die Hauptinhaltsstoffe der Lippenblütler-Extrakte, Rosmarin- und Kaffeesäure, wirken weder einzeln noch in Kombination antiviral. HIV-1_{NL4-3}-Virusstocks wurden vor der Zugabe zu SupT1-T-Zellen entweder mit Melissen-Extrakt (A) oder alternativ mit Rosmarin- und/ oder Kaffeesäure (B) in den angegebenen Konzentrationen für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift am nächsten Tag wurde drei weitere Tage später die p24CA-Konzentration im Zellkulturüberstand via p24CA-Antigen-ELISA gemessen. Die p24CA-Werte der H₂O-behandelten Kontrollkultur wurden auf 100% gesetzt. (C) HIV-1_{NL4-3}GFP-Reporterviren wurden mit 0,6 oder 0,1% des jeweiligen Extrakts oder alternativ einer Mixtur der Extrakte in den gleichen Endkonzentrationen vorbehandelt. Die damit inokulierten Zellen wurden am nächsten Tag gewaschen und der Grad der Infektion am Tag 3 nach Infektion gemessen, wobei der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen der H₂O-behandelten Kontrolle auf 100% gesetzt wurde. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt, wobei jedes Experiment 2- bis 3-mal durchgeführt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von jeweils einem repräsentativen Experiment. (D) Dialyse von Melissen-Extrakt gegen H₂O über Nacht (*cut-offs*: 3,5 und 12 kDa) und darauf folgende Untersuchung der antiviralen Aktivität, wie oben beschrieben.

3.1.10 Die Stabilität der Virionen und die Virus-assoziierten Mengen von Env und prozessiertem Gag werden durch Melissen-Extrakt nicht negativ beeinflusst

Zur weiteren Klärung des Wirkungsmodus der Lamiaceen-Extrakte wurde überprüft, ob sie zu einer Veränderung der Integrität der HIV-1-Partikel führen, die sich beispielsweise in einer erhöhten Fragilität der Virionen äußern würde.

Zunächst erfolgte die einstündige Exposition von HIV-1_{NL4-3}-Viruspartikel mit Melissen-Extrakt, H₂O oder als informative Kontrolle mit dem Detergenz Triton X-100 bei 37°C. Anschließend wurden die Virus-Suspensionen zur Aufreinigung durch 20-%ige Saccharose-Kissen ultrazentrifugiert. Weder die Melissen-Extrakt-Behandlung noch die Inkubation mit dem Lösungsmittel veränderten im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle die Menge der Virionen, die im Pellet zurück gewonnen werden konnten (Abb. 3.10 A). Erwartungsgemäß war dagegen die Konzentration des Pellet-assoziierten p24CA-Antigens nach der Inkubation mit Triton X-100 stark vermindert (Abb. 3.10 A). Darüber hinaus lieferten Western-Blot-Analysen der Pellet-Fractionen mit anti-Env- und anti-Gag-Antikörpern keinen Hinweis auf Extrakt-induzierte Veränderungen der relativen Virus-assoziierten gp160-, gp120- und p24CA-Mengen (Abb. 3.10 B).

3.1.11 Die Dichte der Viruspartikel wird durch wässrige Lamiaceen-Extrakte erhöht

Kontinuierliche Saccharose-Dichte-Gradienten-Analysen erlauben die Detektion von subtilen Veränderungen in der Dichte von HIV-1-Partikeln. Als Referenz wurden unbehandelte HIV-1-Virionen analysiert, die sich bei einer Saccharose-Dichte von etwa 1,16 g/cm³ (Abb. 3.11) anreicherten und sich damit konsistent zu den Beobachtungen für intakte Viruspartikel (1,15 bis 1,18 g/cm³) in vergleichbaren früheren Studien (Ottmann, Gabus et al. 1995; Goncalves, Korin et al. 1996) verhielten.

Triton X-100 verursachte wie erwartet eine Zerstörung der Virionen, die in einer p24CA-Akkumulation in den obersten Schichten des Gradienten (1,08 g/cm³) resultierte. Im Gegensatz zu der unbehandelten Kontrolle und der Lösungsmittel-Kontrolle induzierte die Behandlung mit wässrigem Melissen-Extrakt eine aus-

geprägte Verschiebung des HIV-1-Gradienten-Profiles mit einer Anreicherung der Viruspartikel bei einer Saccharose-Dichte von $1,20 \text{ g/cm}^3$ (Abb. 3.11). Dies wurde in vergleichbarem Ausmaß auch für Pfefferminz-Extrakt beobachtet.

Zusammengenommen wurde eine erhöhte Dichte der HIV-1-Virionen ohne ersichtlichen Einfluss auf deren Integrität und Env-Gehalt als primäre durch die Extrakt-Behandlung verursachte physikobiochemische Veränderung identifiziert.

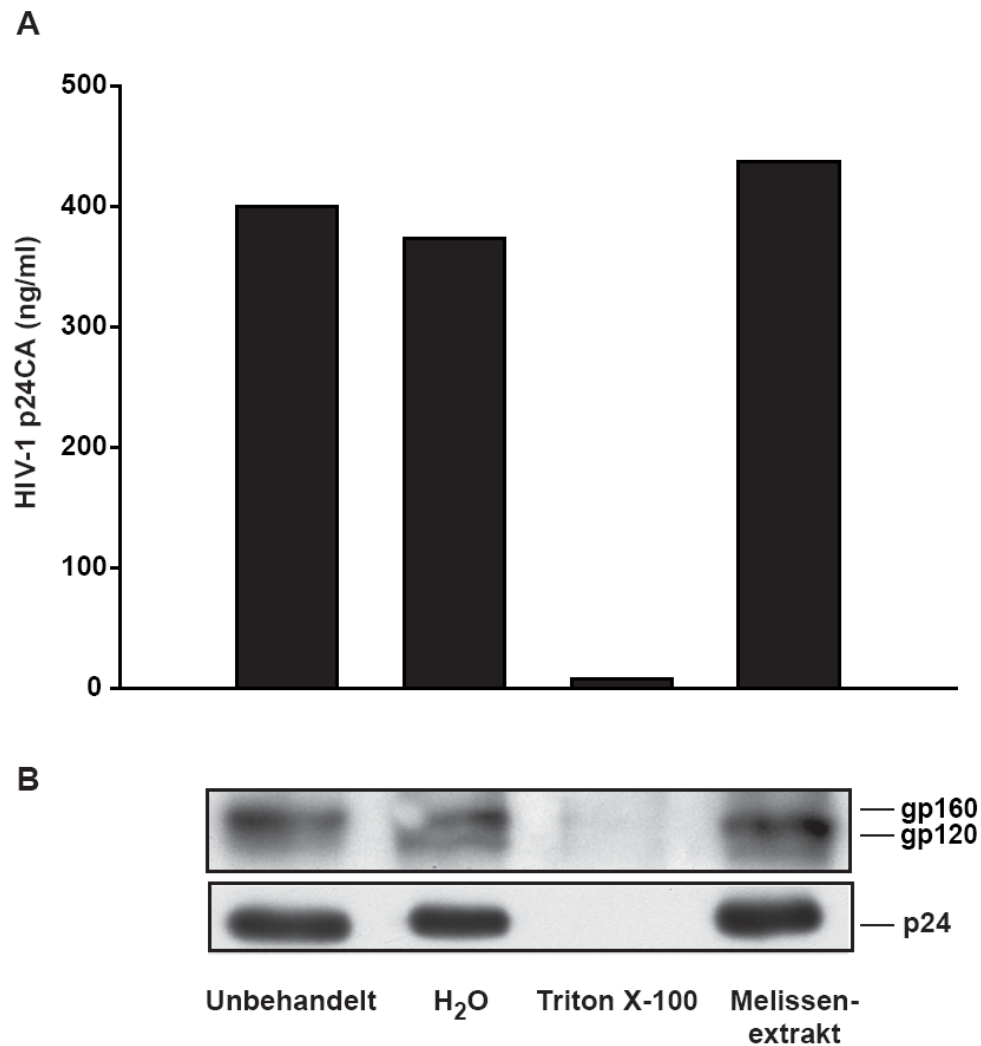


Abb. 3.10: Die Extrakt-Behandlung beeinträchtigt weder die Partikel-Stabilität noch den relativen Gehalt an Env oder an prozessiertem Gag. Aufgereinigte HIV-1_{NL4-3}-Virionen wurden vor der Ultrazentrifugation durch ein 20-%iges Saccharose-Kissen entweder mit Melissen-Extrakt (1%), H₂O (1%) oder Triton X-100 (0,5%) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Pellets wurden in PBS resuspendiert, und mittels (A) anti-p24CA-Antigen-ELISA und im (B) Western-Blot-Verfahren analysiert.

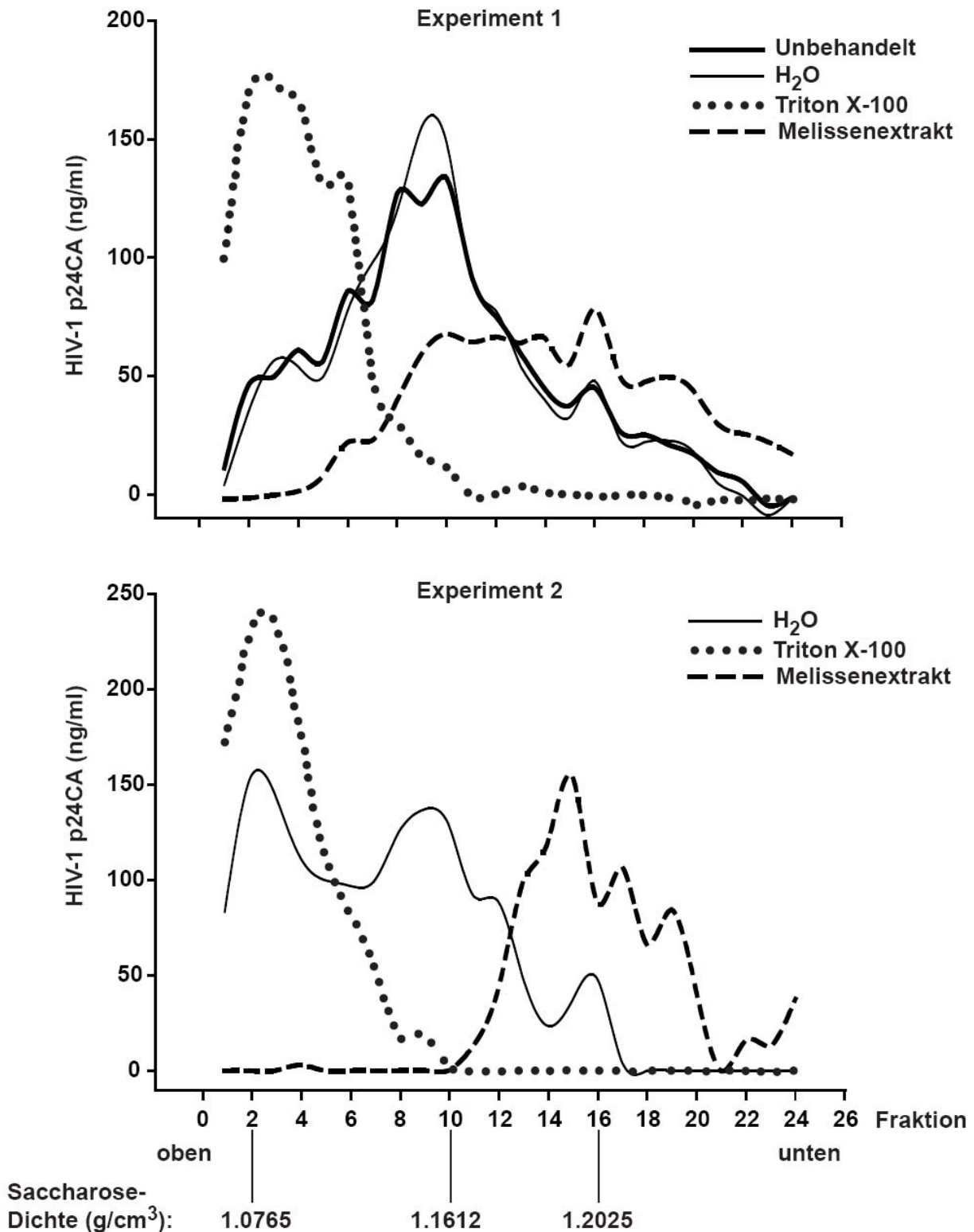


Abb. 3.11: Die Lamiaceen-Extrakt-Behandlung erhöht die Dichte von HIV-1-Partikeln. Aufgereinigte HIV-1_{NL4-3}-Virionen wurden entweder mit Melissen-Extrakt (1%), H₂O (1%) oder Triton X-100 (0,5%) für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend in einem Saccharose-Dichte-Gradienten ultrazentrifugiert. Die Fraktionen des Gradienten wurden von oben nach unten abgetragen und im anti-p24CA-Antigen-ELISA analysiert. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten sind abgebildet.

3.2 Identifikation antiviraler Flavonoide aus Lamiaceen

3.2.1 Spezifische Flavonoide inhibieren potent die HIV-1-Replikation

In Kollaboration mit Prof. F. Bailleul (Universität von Lille, Frankreich) und Dr. E. Davioud-Charvet (Universität Heidelberg) wurden 24 chemische Substanzen, Flavonoide, isoliert aus pflanzlichen Vertretern der Lamiaceae und Verbenaceae, auf ihre potentielle anti-HIV-Aktivität untersucht. Die Isolation der Substanzen erfolgte nach der Extraktion der getrockneten Blüten und oberirdischen Pflanzenteilen mit CH_2Cl_2 , MeOH und H_2O über Gelfiltration (siehe 2.1.9, Hennebelle 2007)

Zur Evaluation wurde das prototypische X4-Virus NL4-3 mit verschiedenen Konzentrationen [50 bis 0,5 μM] der Flavonoide für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Virus-Flavonoid-Suspensionen wurden zur Infektion von SupT1-T-Zellen verwendet. Nach der Exposition über Nacht wurden die Zellen gewaschen und mehrere Tage weiter kultiviert. Anhand der p24CA-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde die Effizienz der HIV-1-Infektion analysiert. Keine der Substanzen interferierte in der applizierten Maximalkonzentration mit der Viabilität der Zellen, wie aus parallel durchgeführten MTT-Standard-Viabilitätstests hervorging, dagegen hemmten im ersten Screening zwölf der Substanzen in dieser Konzentration die HIV-1-Replikation effektiv (Abb. 3.12, und nicht gezeigte Daten). Unter den analysierten Flavonoiden befanden sich vier, die in Konzentrationen unter 0,5 μM \geq 50% der HIV-1-Infektion inhibierten (Abb. 3.12). Darüber hinaus erwiesen sich in Folgeexperimenten zwei der Flavonoide als antiviral aktiv im niedrigen pikomolaren Bereich (Abb. 3.13), so dass sich aus den CC_{50} - und IC_{50} -Werten Selektivitätsindices von > 1000 für MP-03 und > 1428 für MP-04 errechnen ließen.

Aufgrund der effektiven HIV-1-Inhibition durch die aus *Marrubium peregrinum* (Grau-Andorn) isolierten Substanzen, MP-03 und MP-04, und ihrer Identifikation als Flavone (Abb. 3.14) wurden Einzelsubstanzen (Extrasynthese, Frankreich), deren chemische Struktur aus einem Flavon-Grundgerüst mit verschiedenen Substituenten, wie Hydroxyl- oder Methyl-Gruppen oder auch Glykosiden, bestand (siehe Abb. 2.2), bezüglich ihrer anti-HIV-Aktivität getestet. Die unterschiedlich substituierten Flavone wurden dem beschriebenen experimentellen Ablauf folgend in einer Konzentration von 5 μM analysiert, wobei aber keine der Substanzen mit der HIV-1-Replikation oder der Zellviabilität interferierte (Abb. 3.15).

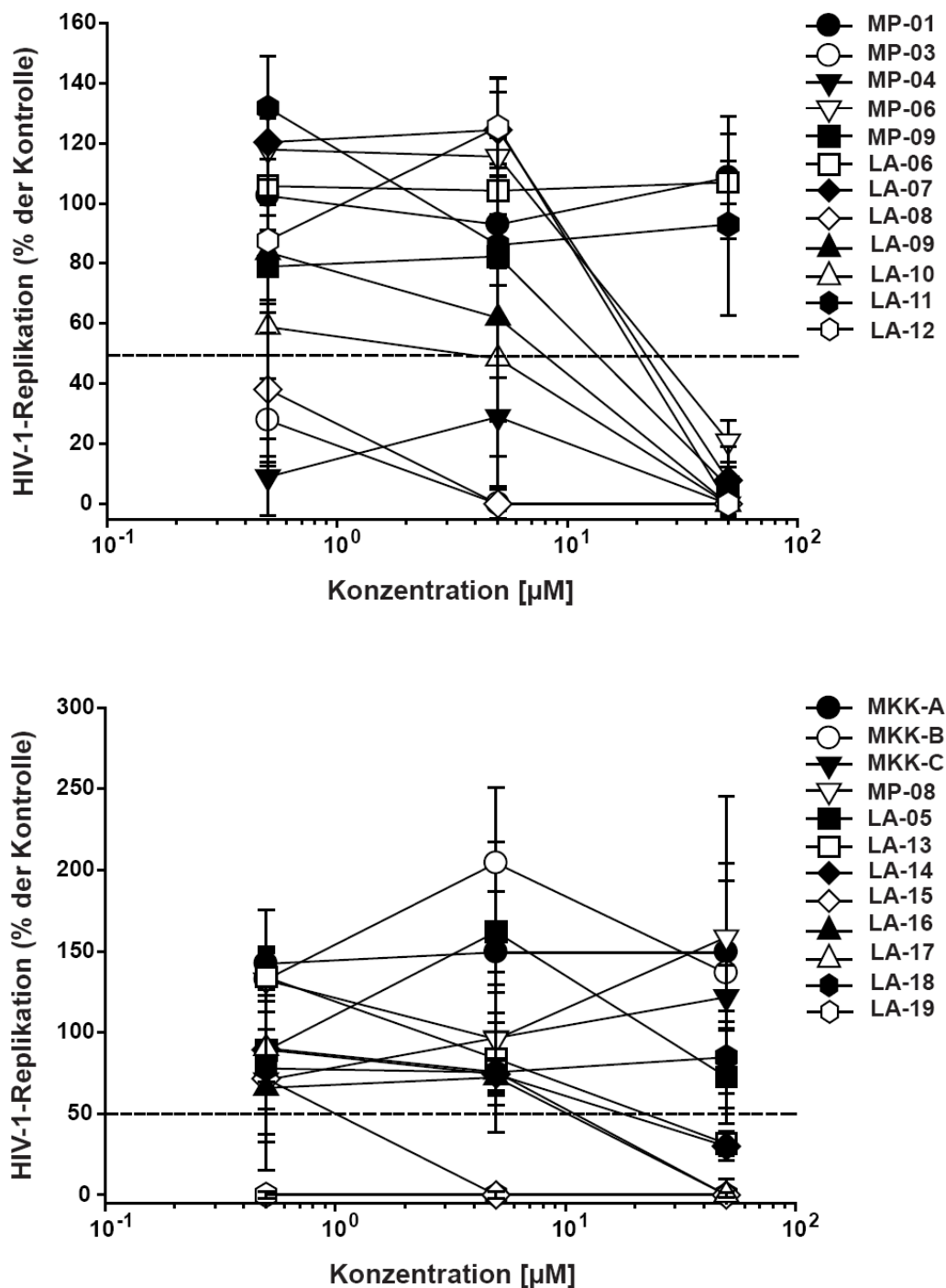


Abb. 3.12: Screening pflanzlicher Substanzen identifiziert Flavonoide mit anti-HIV Aktivität. HIV-1_{NL4-3}-Stocks wurden mit verschiedenen Flavonoiden in Konzentrationen von 50 - 0,5 µM für eine Stunde bei 37°C inkubiert. SupT1-T-Zellen wurden über Nacht mit der Virus-Flavonoid-Suspension inokuliert und am nächsten Tag gewaschen. Die HIV-1-Replikation wurde mit einem anti-p24CA-ELISA bestimmt, wobei die Werte aus dem Zellkulturüberstand des Tages 4 nach Infektion dargestellt sind. Das Experiment wurde zwei- bis viermal (je nach Substanz) unabhängig durchgeführt, dabei wurden Triplikate verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen eines repräsentativen Experiments.

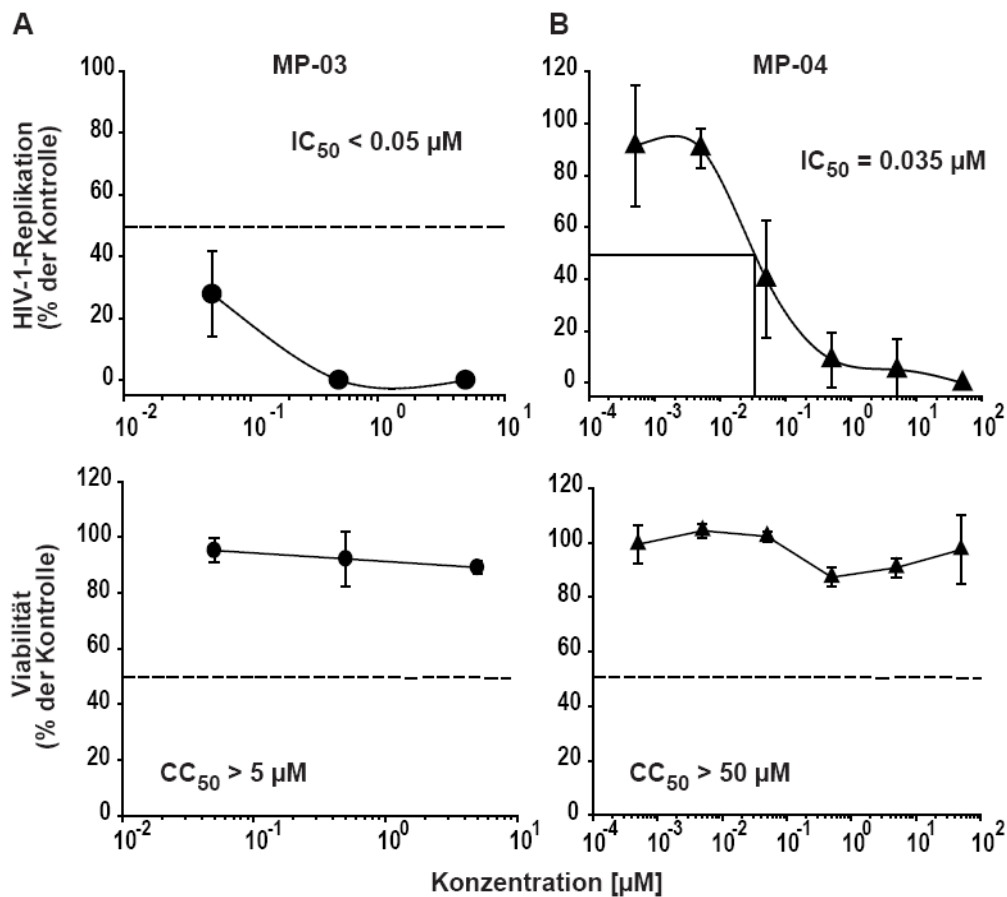


Abb. 3.13: Die antivirale Aktivität spezifischer Flavone ist konzentrationsabhängig. Oberer Teil (HIV-1-Replikation): HIV-1_{NL4-3}-Stocks wurden mit den dargestellten Konzentrationen der Flavone (A) MP-03 und (B) MP-04, oder DMSO für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend folgten die Inokulation von SupT1-Zellen mit der Virus-Flavon-Suspension über Nacht und ein Waschschrift am nächsten Tag. Die HIV-1-Replikation wurde über anti-p24CA-ELISA gemessen. Gezeigt sind die am Tag 7 nach Infektion aus dem Zellkulturüberstand bestimmten Werte. Unterer Teil (Viabilität): Zeitgleich wurden SupT1-Zellen mit den identischen Flavon-Konzentrationen über Nacht behandelt, am Folgetag gewaschen und vier Tage später in einem Standard-MTT-Viabilitätstest analysiert. Das Experiment (jeweils als Triplikat) wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt; Mittelwerte \pm Standardabweichungen eines Experiments sind dargestellt.

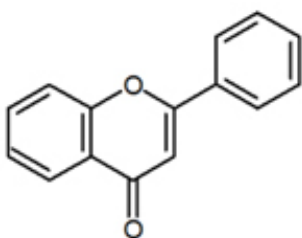


Abb. 3.14: Molekulare Struktur des Flavon-Grundgerüsts.

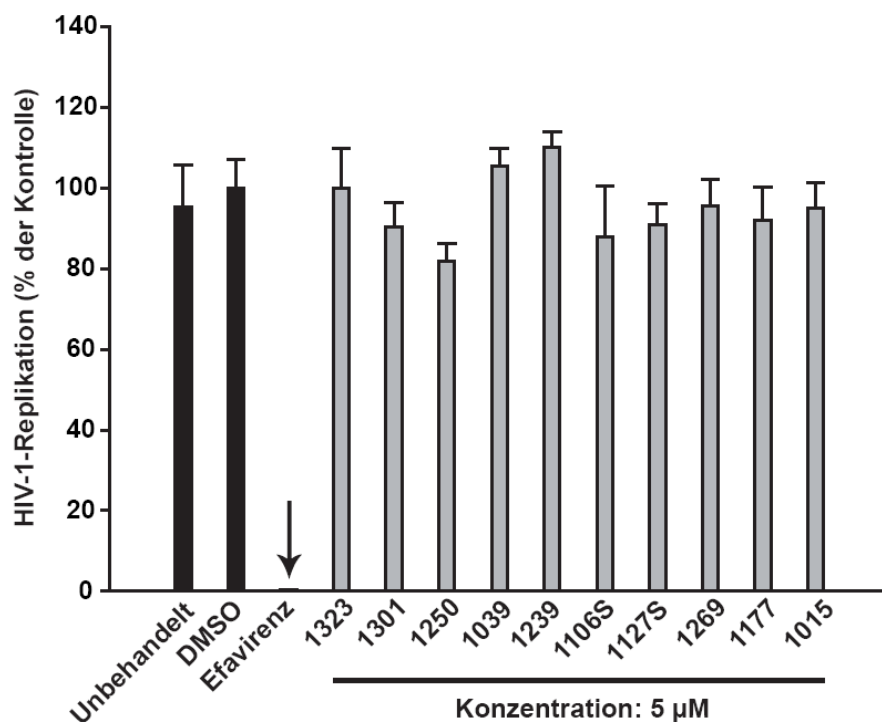
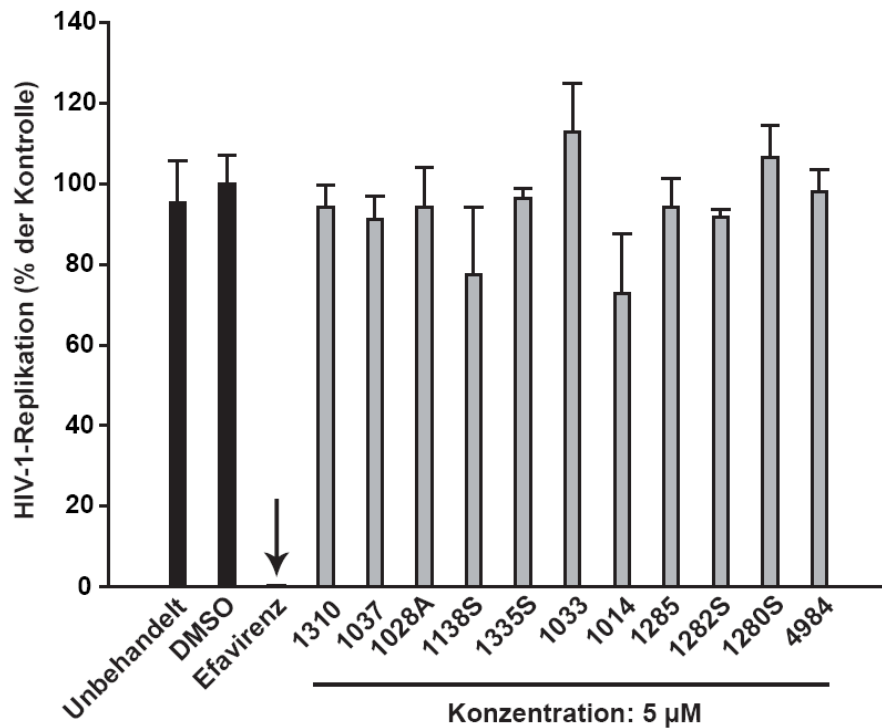


Abb. 3.15: Fehlende anti-HIV-Wirkung bei MP-03-/MP-04-ähnlichen Flavonen. HIV-1_{NL4-3}-Stocks wurden mit verschiedenen Flavonen, die strukturverwandt mit MP-03 und MP-04 sind, in einer nicht-toxischen Konzentration von 5 µM oder DMSO (1%) für eine Stunde bei 37°C vorbehandelt. Es folgten die Infektion von SupT1-T-Zellen über Nacht mit der Virus-Flavon-Suspension und ein Waschschritt am nächsten Tag. Die HIV-1-Replikation wurde am Tag 6 p. i. aus dem Zellkulturüberstand mit einem p24CA-Antigen-ELISA bestimmt und ist hier dargestellt. Das Experiment, in Mittelwerten aus Triplikaten ± Standardabweichungen abgebildet, wurde zweimal unabhängig durchgeführt.

3.2.2 BJ486K, chemisch synthetisiertes MP-03, ist vergleichbar wirksam gegen HIV-1 wie pflanzliches MP-03

In der Arbeitsgruppe von Dr. E. Davioud-Charvet wurde unter Anwendung des Baker-Venkataraman-Verfahrens MP-03 chemisch nachproduziert, resultierend in der Synthese von BJ486K. BJ486K kann aufgrund der chemischen Analyse durch Elektrospray-Ionisation und Massenspektrometrie als chemisch rein bezeichnet werden (persönliche Mitteilung durch Dr. E. Davioud-Charvet).

Aufgrund der limitierten Menge von MP-03 wurde diese Substanz in einer zweiten Extraktion aus *Marrubium peregrinum*-Extrakt erneut angereichert (Prof. F. Bailleul). Zunächst wurde MP-03 aus der zweiten Aufreinigung auf anti-HIV-Aktivität in HIV-1-Infektionstests mit SupT1-T-Zellen hin untersucht (Abb. 3.16 C, $IC_{50} = 1,8$). Bei dieser Überprüfung ergaben sich IC_{50} -Werte, die eine 100- bis 1000-fach niedrigere antivirale Aktivität gegenüber der des MP-03 aus der ersten Aufreinigung aufzeigten. Die Information, dass die erste Extraktion von MP-03 etwa zwei Jahre zurücklag, lässt die Hypothese zu, dass eine Art „Alterungsprozess“ chemische Veränderungen, die zu höherer anti-HIV-Aktivität führen, hervorgerufen haben könnte.

Zur antiviralen Evaluation wurde BJ486K neben MP-03 aus der zweiten Aufreinigung aus Pflanzenextrakt, das auch in allen folgenden Experimenten verwendet wurde, in einem HIV-1-Reporterassay mit TZM-bl-Zellen getestet. BJ486K war in geringer mikromolekularer Konzentration aktiv gegen zwei unterschiedlich pseudotypisierte (YU-2 Env und JR-FL Env) HIV-1-Reporterviren, ähnlich wie das getestete natürliche Flavon (Abb. 3.16 A und B). Die in diesen *single round*-Experimenten ermittelten IC_{50} -Werte von 0,8 und 7,8 μ M (MP-03) bzw. 4,8 und 11,2 μ M (BJ486K) für R5-Viren (mit YU-2 Env bzw. JR-FL Env pseudotypisiert) glichen außerdem Ergebnissen aus HIV-1-Replikationsassays mit dem prototypischen X4-Virus NL4-3 (Abb. 3.16 C, $IC_{50} = 1,8$). Sowohl bei der Applikation von MP-03 als auch bei der Verwendung von BJ486K in einer Konzentration von 100 μ M betrug der Anteil der lebenden Zellen über 80% (nicht dargestellt).

3.2.3 Die antivirale Aktivität von MP-03 richtet sich gegen Viruspartikel und hemmt deren Fusion mit Zielzellen

Um Einblicke in die antivirale Wirkungsweise des Flavons MP-03 zu gewinnen, wurden Experimente durchgeführt, die bei der Untersuchung der wässrigen Lamiaceen-Extrakte bereits Anwendung fanden. Durch die parallele Infektion von TZM-bl-Zellen, die entweder für eine Stunde bei 37°C mit MP-03 vorbehandelt und vor der Inokulation mit HIV-1-Luziferase-Reporterviren gewaschen wurden oder von unbehandelten Zellen, die mit MP-03 exponierten Viruspartikeln infiziert wurden, konnte nur bei letzterem Prozedere eine inhibierende Wirkung des Flavons mit einem IC_{50} -Wert von 9,8 μ M beobachtet werden (Abb. 3.17 A, C). Ein IC_{50} für MP-03 konnte bei der Zell-Vorbehandlung (Abb. 3.17 A) nicht ermittelt werden.

Des Weiteren schien dieser Effekt unabhängig von der Vorinkubation zu sein, da die simultane Zugabe von Virus und Flavon zu den Zielzellen die Infektion im gleichen Ausmaß beeinträchtigte (Abb. 3.17 B, IC_{50} -Wert = 11,8 μ M). In ähnlichen Experimenten mit HIV-1-GFP-Reporterviren führte dies zu einer etwa 5-fach reduzierten anti-HIV-Aktivität (Abb. 3.16 D). Eine Reduktion des antiviralen Effekts um einen Faktor 8 ließ sich auch gegen Viruspartikel verzeichnen, die zwei Stunden bei 4°C mit TZM-bl-Zellen inkubiert wurden und dementsprechend vor der Applikation von MP-03 an die Zelloberfläche gebunden sein sollten (Abb. 3.16 D).

Im Gegensatz dazu konnte mit dem Virionen-Fusionsassay, der auf der Inkorporation des β -Laktamase-Vpr-Fusionsproteins in replikationskompetente HIV-1-Virionen beruht (siehe 2.12.2), und einem parallel ausgeführten Replikationsassay gezeigt werden, dass die Inhibierung der Replikation die äquivalente Hemmung der Fusion reflektiert (Abb. 3.17 D), was auch an den gering voneinander abweichenden IC_{50} -Werten abzulesen ist (IC_{50} -Wert_{Fusion} = 2,6 μ M; IC_{50} -Wert_{Replikation} = 1,8 μ M). Dies weist darauf hin, dass MP-03 bei der Entfaltung seiner anti-HIV-Aktivität mit einem der frühen Ereignisse im Replikationsverlauf wie der Bindung des Viruspartikels an den Rezeptorkomplex oder dem Fusionsprozess interferiert.

Darüber hinaus ist von mechanistischer Bedeutung, dass MP-03 nicht nur die Infektion mit HIV-1-GFP-Reporterviren, die mit verschiedenen R5-Hüllproteinen (Ada Env, Ba-L Env, JR-FL Env, YU-2 Env) pseudotypisiert wurden, unterbinden kann, sondern auch gegen VSV-G-behüllte HI-Viren im gleichen Wirkfenster aktiv ist (Daten nicht dargestellt).

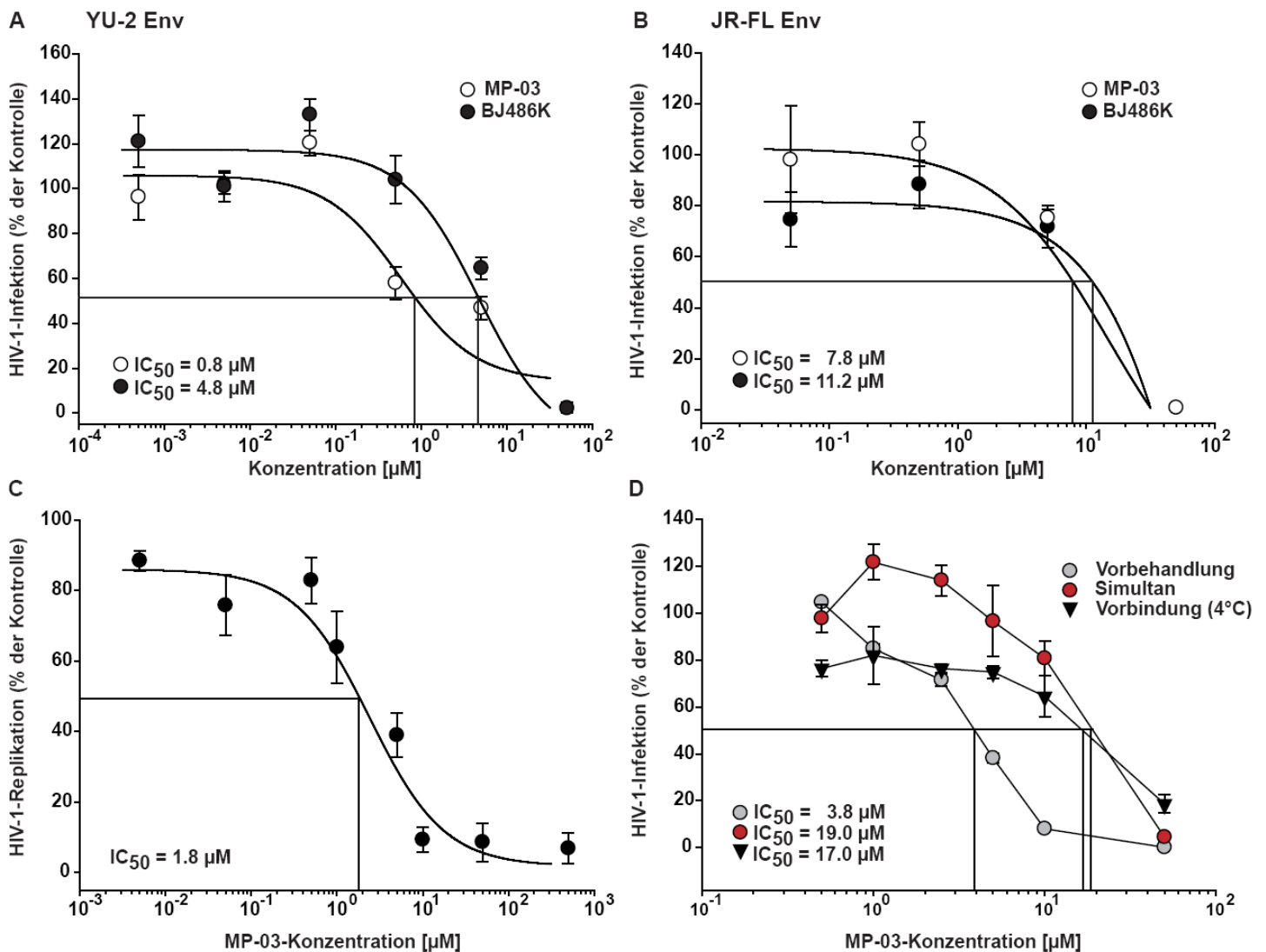


Abb. 3.16: Synthetisches MP-03 (BJ486K) zeigt gegen HIV-1, pseudotypisiert mit verschiedenen R5 HIV-1-Envs, eine vergleichbare anti-HIV-Aktivität wie pflanzliches MP-03, die gegenüber zelloberflächen-gebundenen Viruspartikel reduziert ist. TZM-bl-Zellen wurden mit HIV-1-GFP-Reporterviren, pseudotypisiert mit YU-2 Env (A) oder JR-FL Env (B), infiziert. Zuvor wurden die Viren mit MP-03 oder BJ486K in den dargestellten Konzentrationen für eine Stunde bei 37°C behandelt. Etwa 72 Stunden nach der Infektion wurde der Anteil der GFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (C) Replikationskompetente HIV-1_{NL4-3'}-Stocks wurden mit MP-03 in mehreren Konzentrationen für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Virus-MP-03-Suspension wurde zu Supt1-CCR5-Zellen gegeben, die am nächsten Tag gewaschen wurden. Die p24CA-Konzentration im Zellkulturüberstand als Maß für die HIV-1-Replikation wurde am Tag 5 nach Infektion mittels anti-p24CA-ELISA analysiert. (D) HIV-1-GFP-Reporterviren, pseudotypisiert mit YU-2 Env, wurden entweder für eine Stunde bei 37°C mit MP-03 vorbehandelt, direkt mit MP-03 zu TZM-bl-Zellen gegeben oder für 2 Stunden bei 4°C mit den Zellen inkubiert, dann mit MP-03 behandelt und bei 37°C weiter kultiviert. Drei Tage nach der Infektion wurde der Anteil der GFP-positiven Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die als Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 3) gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 bis 3 unabhängige Experimente.

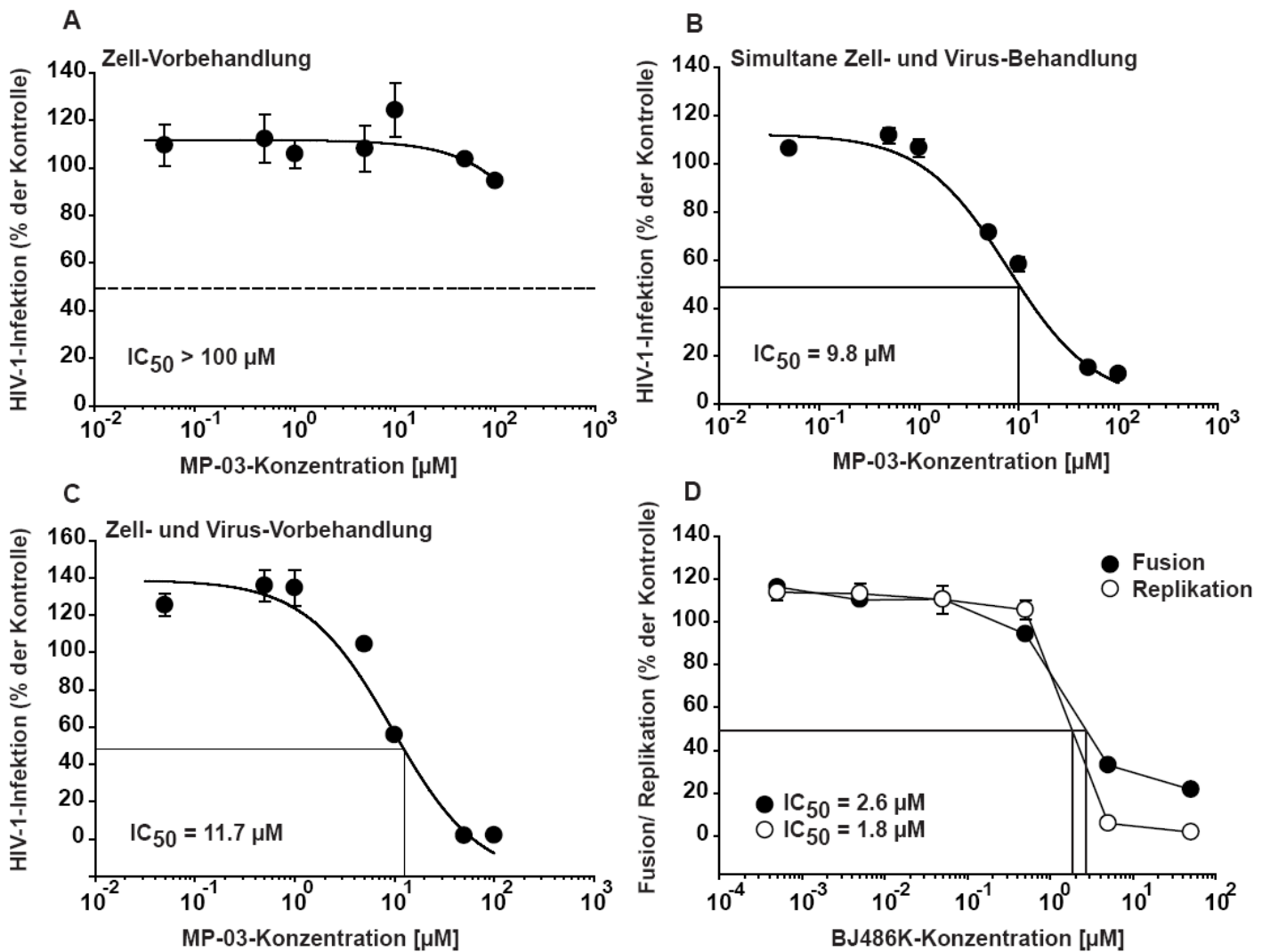


Abb. 3.17: MP-03-Behandlung von Zellen und Viruspartikeln führt zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der HIV-1-Fusion und -Replikation, während die alleinige Vorinkubation von Zellen mit MP-03 keinen Effekt hat. (A) Zell-Behandlung. TZM-bl-Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C mit den dargestellten MP-03-Konzentrationen oder DMSO inkubiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, folgte die Inokulation mit JR-FL-Env pseudotypisierten HIV-1_{NL4-3}-Luziferase-Reporterviren über Nacht. Etwa 48 Stunden nach einem weiteren Waschschrift wurde die Luziferase-Aktivität mittels des Luziferase-Reporter-Assay-Systems von Promega bestimmt. (B, C) Zell- und Virus-Behandlung. Die HIV-1_{NL4-3}-Reporterviren wurden entweder für eine Stunde bei 37°C mit MP-03 vorbehandelt oder simultan mit dem Flavon zu TZM-bl-Zellen gegeben. Die Zellen wurden am nächsten Tag gewaschen und weitere 2 Tage später auf die Enzymaktivität hin untersucht. Mittelwert \pm Standardabweichung eines Experiments sind gegeben. (D) HIV-1_{NL4-3}-Viren, die das BlaM-Vpr-Konstrukt tragen, wurden mit MP-03 für eine Stunde bei 37°C inkubiert, und anschließend zu C8166-T-Zellen gegeben. Ein Replikationstest wurde analog zum in der Legende zu Abb. 3.13 C beschriebenen experimentellen Ablauf mit dem identischen Virus-Stock durchgeführt. Das Experiment wurde zweimal unabhängig durchgeführt.

3.2.4 Potente Inhibition der HIV-1-Infektion durch die antivirale Aktivität mehrerer MP-03 enthaltender Fraktionen eines Lamiaceen-Extrakts

Durch die Zusammenarbeit mit Prof. F. Bailleul und Dr. E. Davioud-Charvet ergab sich die Möglichkeit zur Analyse verschiedener Fraktionen, die aus der HPLC-

Fraktionierung eines *Marrubium peregrinum*-Extrakts hervorgingen (Abb. 3.18, Hennebelle 2007), und durch unterschiedliche MP-03-Anteile charakterisiert wurden (Tab. 3.1).

In *single round*-Infektionsexperimenten mit HIV-1-GFP-Reporterviren, die vor der Zugabe zu TZM-bl-Zellen für eine Stunde bei 37°C mit den Fraktionen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert wurden, konnte für 11 der 15 getesteten Fraktionen eine anti-HIV-Aktivität mit einem IC₅₀-Wert unter 50 µg/ml ermittelt werden (Abb. 3.19). Dabei zeigte keine der Fraktionen zytotoxische Effekte (Daten nicht dargestellt). Die konzentrationsabhängige antivirale Wirkung der interessantesten Kandidaten, insbesondere LF-MPS3F3 und LF-MPS3F4, die im Weiteren S3F3 bzw. S3F4 usw. genannt werden, (Abb. 3.20 A), unter den Fraktionen wurden mehrfach analysiert (Abb. 3.20 B) und ihre IC₅₀-Werte aus verschiedenen Experimenten in Bezug zu dem jeweiligen MP-03-Gehalt gesetzt (Abb. 3.20 B, C, D). Am Beispiel von S3F3 und S3F4 (Abb. 3.20 A, IC₅₀ = 0,27 bzw. 0,16 µg/ml) ist die Bestimmung der IC₅₀-Werte dargestellt, diese liegen etwa 10-fach unter dem für MP-03 ermittelten Wert.

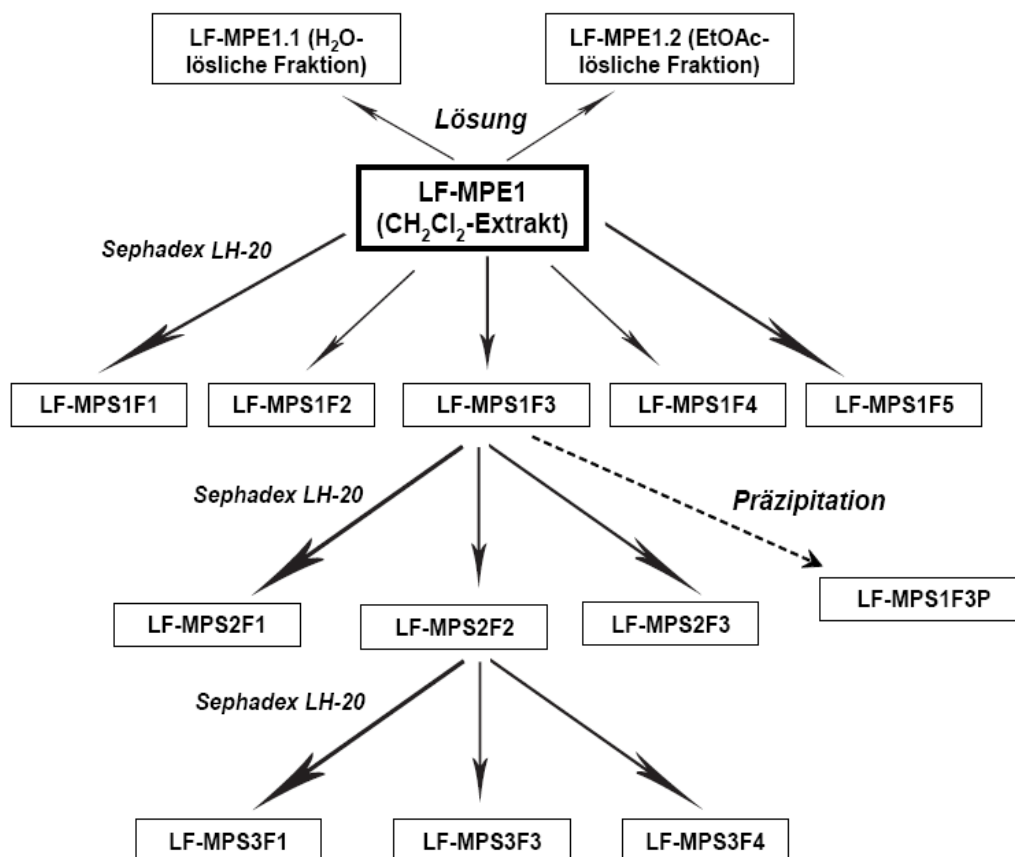


Abb. 3.18: Präparative Fraktionierung eines Lamiaceae-Extrakts von *Marrubium peregrinum*. Der Extrakt wurde evaporiert und lyophilisiert, und anschließend einer Gelfiltration durch Sephadex LH-20 sowie einer Aufreinigung über Silicagel 60H-Säulen unterzogen, so können Stoffe verschiedener Molekülmassen getrennt und gereinigt werden.

| Fraktion | MP-03-Anteil (%) |
|------------|------------------|
| LF-MPS1F1 | 0,6 |
| LF-MPS1F2 | 0,4 |
| LF-MPS1F3 | 29,3 |
| LF-MPS1F3P | 90,8 |
| LF-MPS1F4 | 14,3 |
| LF-MPS1F5 | 8,0 |
| LF-MPS2F1 | 0,0 |
| LF-MPS2F2 | 77,2 |
| LF-MPS2F3 | 69,7 |
| LF-MPS3F1 | 89,0 |
| LF-MPS3F3 | 83,1 |
| LF-MPS3F4 | 83,1 |

Tabelle 3.1: MP-03-Anteil der Fraktionen des *Marrubium peregrinum*-Extrakts.
Bestimmung des MP-03-Gehaltes der einzelnen Fraktionen durch Prof. Bailleul.

Wie dem Regressionskoeffizienten von 0,283 (Pearsons Korrelationsanalyse, errechnet in GraphPad), der sich unter Einbeziehung der Ergebnisse aller mehrfach analysierten Fraktionen ergibt, zu entnehmen ist, schien keine Korrelation zwischen der Höhe des MP-03-Gehaltes und der Effektivität der antiviralen Aktivität zu bestehen (Abb. 3.20 B).

Bei der Analyse der Experimente fielen jedoch neben dem synthetischen MP-03, BJ486K, drei weitere Fraktionen mit hohen prozentualen Anteilen an MP-03 hinsichtlich ihrer relativ geringen anti-HIV-Aktivität auf: S1F3P (90,8% MP-03), S2F2 (77,2% MP-03) und S2F3 (69,7% MP-03) (Abb. 3.20 C). Trotz des etwa 10-fach höheren MP-03-Gehalts als beispielsweise in S1F5 (8,0%) lagen die IC_{50} -Werte dieser Fraktionen in einem dem IC_{50} -Wert für S1F5 ähnlichen Bereich (1,367 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für S1F5; 1,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für S1F3P) bzw. darüber (Tab. 3.2) (Abb. 3.20 B). Aufgrund dieser Auffälligkeit wurden die genannten Fraktionen und BJ486K versuchsweise nicht in die Evaluierung der Beziehung zwischen IC_{50} -Werten und MP-03-Gehalt einbezogen. Für die übrigen Fraktionen, S2F1, S1F5, S1F4, S1F3, S3F3 und S3F4, offenbart sich eine sehr gute Korrelation (Regressionskoeffizient: 0,931) zwischen den beiden Parametern, IC_{50} -Wert und MP-03-Gehalt (Abb. 3.20 D).

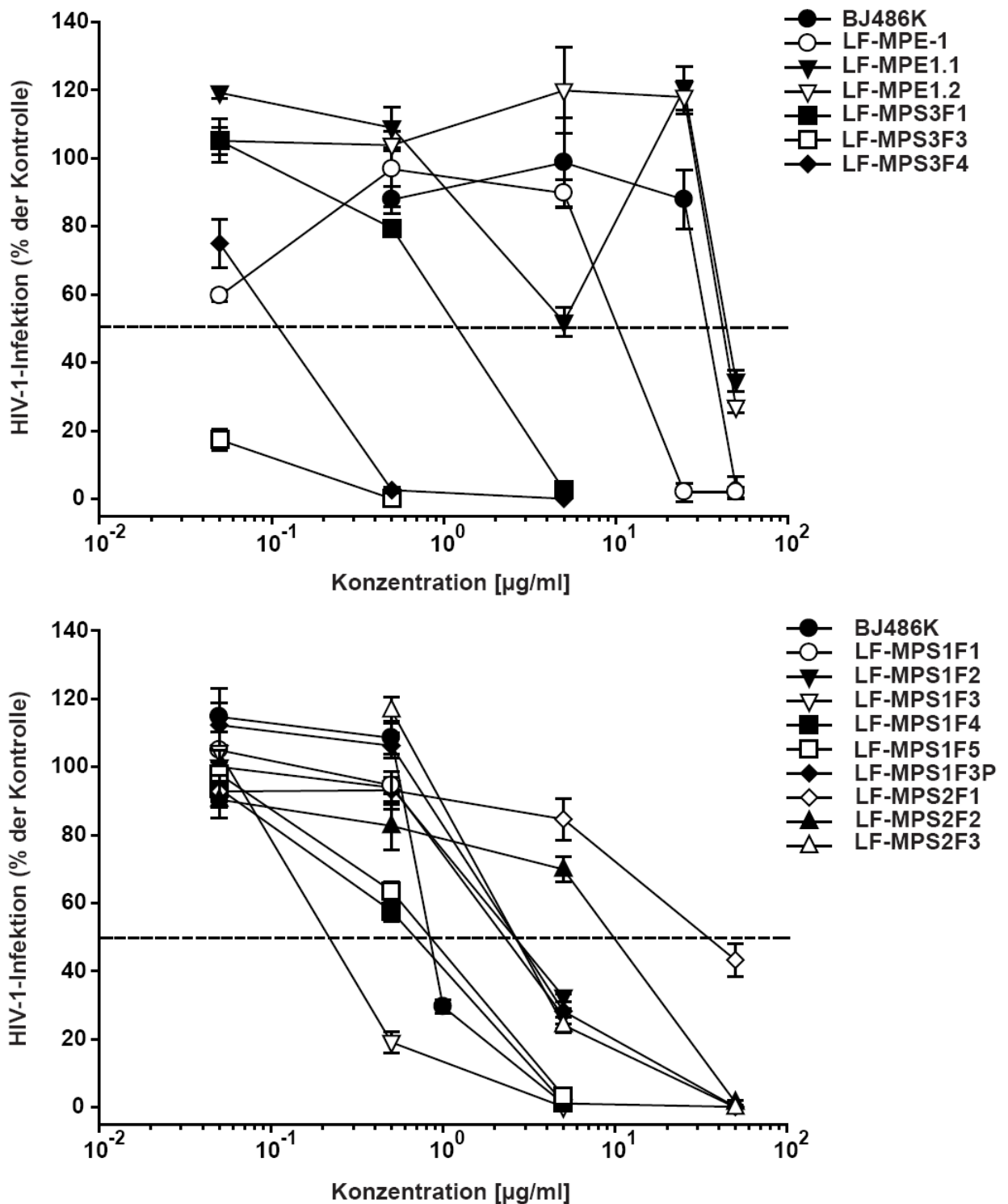


Abb. 3.19: Verschiedene Fraktionen des Lamiaceen-Extrakts inhibieren die HIV-1-Infektion. TZM-bl-Zellen wurden mit HIV-1 GFP-Reporterviren, pseudotypisiert mit YU-2 Env, infiziert. Zuvor wurden die Viren mit BJ486K oder den Extrakt-Fractionen in verschiedenen Konzentrationen für eine Stunde bei 37°C behandelt. Die Zellen wurden am Folgetag gewaschen. Etwa 72 Stunden nach der Infektion wurde der Anteil der GFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$) gezeigten Daten sind je nach Fraktion repräsentativ für 1 bis 4 unabhängige Experimente.

| Fraktion | MP-03-Anteil (%) | Anti-HIV-IC ₅₀ (µg/ml) |
|------------|------------------|-----------------------------------|
| LF-MPS1F1 | 0,6 | 2,20 |
| LF-MPS1F2 | 0,4 | 2,80 |
| LF-MPS1F3 | 29,3 | 0,31 |
| LF-MPS1F3P | 90,8 | 1,90 |
| LF-MPS1F4 | 14,3 | 0,97 |
| LF-MPS1F5 | 8,0 | 1,37 |
| LF-MPS2F1 | 0,0 | 22,00 |
| LF-MPS2F2 | 77,2 | 8,93 |
| LF-MPS2F3 | 69,7 | 0,55 |
| LF-MPS3F1 | 89,0 | 1,20 |
| LF-MPS3F3 | 83,1 | 0,10 |
| LF-MPS3F4 | 83,1 | 0,22 |

Tabelle 3.2: MP-03-Anteil und IC₅₀-Werte der Fraktionen des *Marrubium peregrinum*-Extrakts. Die IC₅₀-Werte wurden aus Infektionsexperimenten, wie in der Legende zu Abb. 3.20 beschrieben, ermittelt. Bestimmung des MP-03-Gehaltes der einzelnen Fraktionen durch Prof. Bailleul.

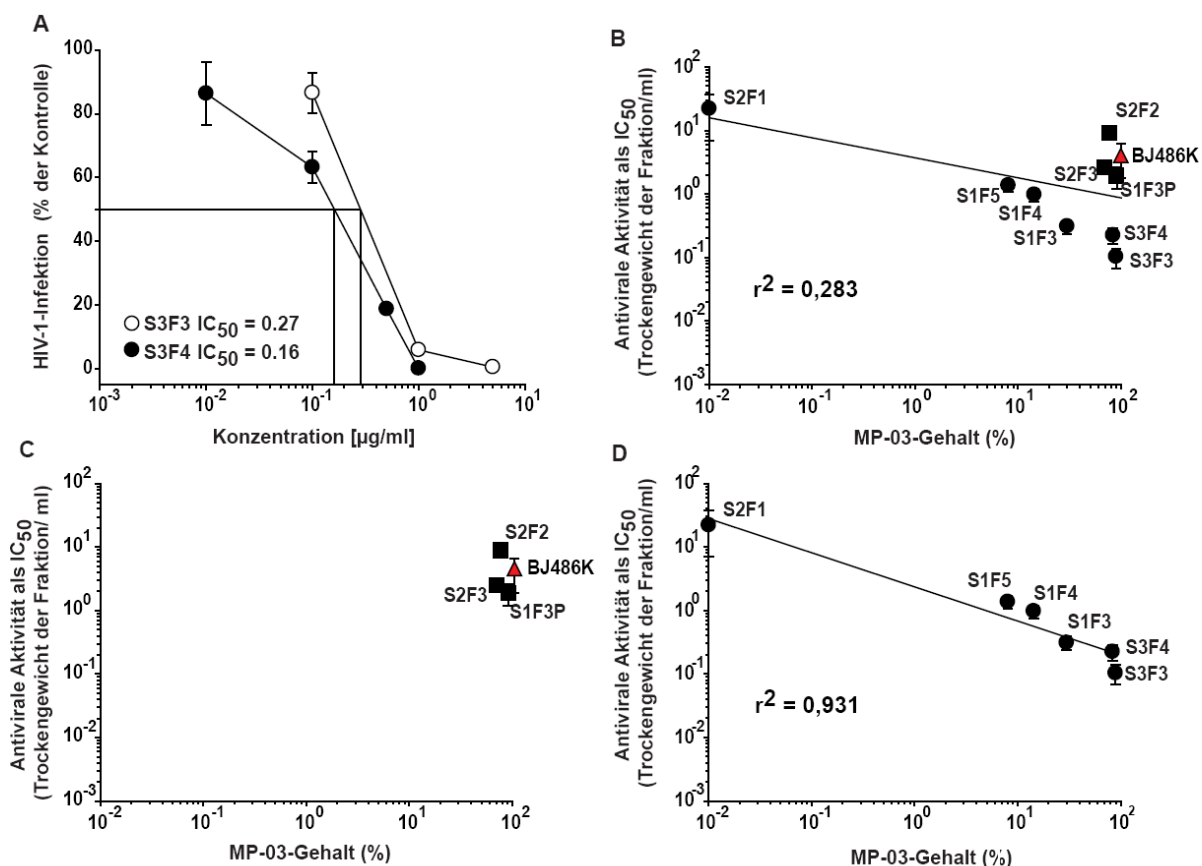


Abb. 3.20: Die anti-HIV-Aktivität zeigt Konzentrationsabhängigkeit und für bestimmte Fraktionen eine Korrelation mit dem MP-03-Gehalt. (A) TZM-bl-Zellen wurden mit HIV-1 GFP-Reporterviren, pseudotypisiert mit YU-2 Env, die für eine Stunde bei 37°C mit den Fraktionen S3F3 und S3F4 inkubiert wurden, infiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen gewaschen und zwei Tage danach der Anteil GFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die als Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3) gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente. (B, C, D) Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler der IC₅₀-Werte aller analysierten (B) bzw. ausgewählter (C und D) Fraktionen in Bezug zum prozentualen MP-03-Anteil der jeweiligen Fraktion.

3.3 Analyse der HIV-Pathogenität verschiedener HIV-1-Gruppe O-Isolate in primären Modellsystemen der Infektion

Ziel dieses Projektes war die Untersuchung primärer HIV-1-Viren der Gruppe O hinsichtlich ihres Replikations- und CD4⁺-T-Zell-Depletionsvermögens in einem physiologisch relevanten HIV-1-Infektionsmodell, der humanen Tonsillen-Histokultur, und im Vergleich mit Primärisolaten der HIV-1-Gruppe M.

3.3.1 Etablierung der humanen lymphoiden Aggregationskultur

Der erste Schritt zur Nutzung des primären Zellsystems für weitere Untersuchungen bestand in der Etablierung der humanen lymphoiden Aggregationskultur (HLAC, *human lymphoid aggregate culture*) aus Tonsillengewebe, das unmittelbar nach Tonsillektomien von der Hals-Nasen-Ohren-Abteilung der Kopfklinik (Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde.

Das Gewebe wurde zerteilt, so dass es durch Zellsiebe transferiert werden konnte. Die Zellen wurden am Tag nach der Präparation mit prototypischen HIV-1-Stämmen infiziert. Einen Tag später wurden die Zellen gewaschen, um Input-Virus zu entfernen, und 3, 5 und 10 Tage nach der Infektion wurde die Progression der viralen Replikation anhand der p24CA-Konzentration im Zellkulturüberstand analysiert.

Aus ersten Infektionsexperimenten ging hervor, dass dieses primäre *ex vivo*-Zellkultur-System Infektionen sowohl mit R5- (YU-2 und 49.5) als auch CXCR4-tropen (NL4-3) HI-Viren erlaubte (nicht dargestellt). 49.5 ist auf genomischer Ebene mit NL4-3, bis auf die V3-Schleife des Glykoproteins gp120 von Ba-L, identisch; diese führt zu einer Verschiebung des Korezeptor-Gebrauchs von CXCR4 zu CCR5.

X4- und R5-HIV-1-Viren unterscheiden sich bezüglich ihres Potentials CD4⁺-T-Zellen in HLA-Kulturen depletieren zu können. Während in Kulturen, die mit X4-HI-Viren infiziert sind, massiv CD4⁺-T-Zellen depletiert werden, geschieht dies nur in einem geringeren Ausmaß in R5-infizierten Kulturen (Jekle et al., 2002; Penn et al., 1999). Dieses Phänomen konnte in Vorexperimenten, in denen der Anteil der CD4⁺-T-Zellen indirekt über CD8⁺- und CD3⁺-T-Zellen in infizierten HLA-Kulturen durchflusszytometrisch bestimmt wurde, reproduziert werden. NL4-3-infizierte Kulturen zeigten eine 6- bis 7-fache Reduktion der CD4⁺-T-Zellen (CD3⁺/CD8⁻) gegenüber den

CD8⁺-T-Zellen (CD3⁺/CD8⁺). Im Gegensatz dazu wurde das Verhältnis zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen durch die Infektion mit den CCR5-verwendenden Viren 49.5 und YU-2 kaum beeinflusst (nicht abgebildet), da es nur hier zu einem geringen Verlust an CD4⁺-T-Zellen kam.

3.3.2 Replikationskinetiken laboradaptierter HI-Viren und primärer Virus-Isolate der HIV-1-Gruppen M und O

Zur Untersuchung der Replikationsfähigkeit primärer HIV-1-Gruppe O-Isolate im Vergleich mit prototypischen X4- und R5-Vertretern, wie NL4-3, 49.5 oder YU-2, und Primärisolaten anderer klassifizierter HIV-1-Gruppen, wurden HLA-Kulturen und Primär-T-Zellkulturen eines einzelnen Donors oder mehrerer Donoren mit identischen p24CA-Konzentrationen (5 ng p24CA/ well) der einzelnen Viren infiziert. Die Primärisolate wurden zuvor in Primär-T-Zellkulturen über einen Zeitraum von etwa drei Wochen expandiert. Im Verlauf des Experimentes wurde die Replikationskinetik der Viren verfolgt. Zu diesem Zweck wurde zu drei Zeitpunkten (4, 7 und 11 Tage p.i.) die p24CA-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels p24CA-Antigen-ELISA analysiert.

Die Infektion mit X4- (linker Teil der Abb. 3.21) und R5-HI-Viren (rechter Teil der Abb. 3.21) resultierte innerhalb eines Donors (Abb. 3.21 A und B; C und D; usw.) und in den verschiedenen Zellsystemen (Abb. 3.21) in ähnlich hohen p24CA-Werten. Eine Ausnahme bildete in diesem Experiment der Donoren-Pool primärer Lymphozyten (Abb. 3.21 G, H). Die HIV-1-Replikation war gegenüber den anderen Zellsystemen reduziert, was in zwei weiteren Experimenten jedoch nicht bestätigt wurde (nicht abgebildet).

Das Gros der HI-Viren, insbesondere der R5-Gruppe O-Isolate, replizierte in den verschiedenen Zellsystemen zwar produktiv, jedoch mit relativ geringen p24CA-Konzentrationen (3 bis 15 ng, Abb. 3.21 A-G). Im Gegensatz dazu standen beispielsweise die HIV-1-Gruppe O-Isolate MVP-9435-96 (R5) und MVP-2901-94 (R4), die ebenso effizient wie die laboradaptierten Viren Ba-L (Abb. 3.21 B) bzw. NL4-3 (Abb. 3.21 C) replizierten.

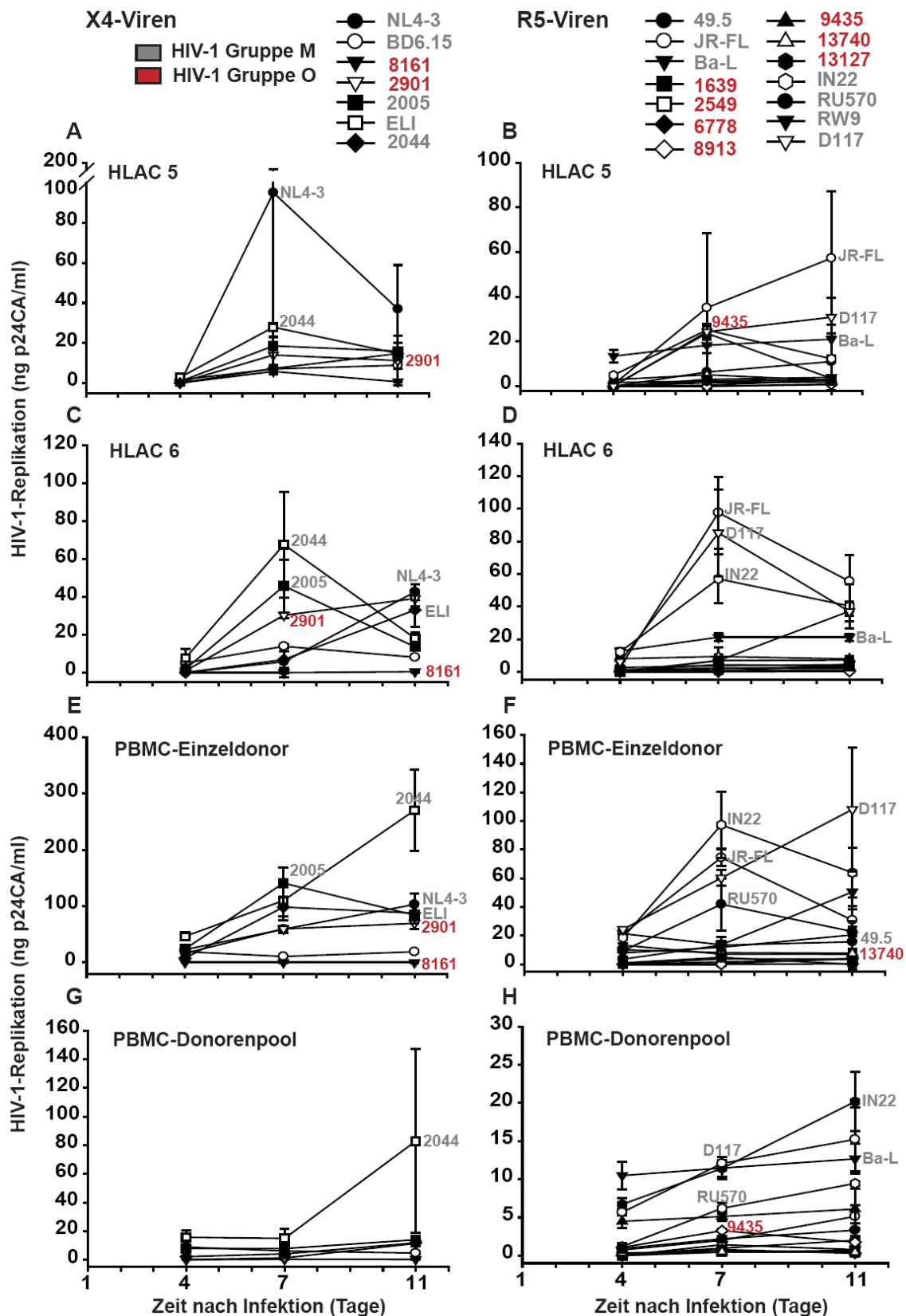


Abb. 3.21: Replikationskinetiken verschiedener HI-Viren in der humanen Tonsillen-Histokultur und in primären T-Zellen. HLA-Kulturen (2×10^6 Zellen/well) der Tonsillen 5 (A, B) und 6 (C, D) sowie primäre T-Zell-Kulturen (1×10^6 Zellen/well) eines einzelnen Donors (E, F) und eines 4-Donoren-Pools (G, H) wurden ausgesät und am nächsten Tag mit X4- (linker Teil der Abb.) und R5- (rechter Teil der Abb.) HI-Viren (5 ng p24CA/well) infiziert. Es folgte ein Waschschriff am folgenden Tag. 4, 7 und 11 Tage nach der Infektion wurde die HIV-1-Replikation via p24CA-Antigen-ELISA aus dem Zellkulturüberstand bestimmt. Das Experiment wurde dreimal unabhängig, jeweils im Triplikate, durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen eines Experiments.

Diese Tendenz ist auch zu erkennen, wenn man Abbildung 3.22 betrachtet, in welcher das Gesamt-Replikationspotential der HI-Viren über den gesamten Zeitverlauf des Experimentes dargestellt ist. Die p24CA-Messungen, die über einen bestimmten Zeitraum hinweg durchgeführt wurden, wurden als Integral, dem Flächeninhalt unter einer Kurve (AUC, *area under the curve*) zusammengefasst (Audige et al., Homann et al. in Überarbeitung). Die starken Replizierer unter den Gruppe-O-Viren, MVP-2901-94 und MVP-13740-96, im Folgenden als 2901 und 13740 usw. bezeichnet, waren ebenso produktiv wie NL4-3 (Abb. 3.22 B, C), Ba-L (Abb. 3.22 B, C) oder JR-FL (2901 in Abb. 3.22 C, D, 13740 in Abb. 3.22 D). Die Mehrheit der HI-Viren des O-Typs replizierte relativ schwach, aber vergleichbar zu Primärisolaten verschiedener Subtypen der HIV-1-Gruppe M wie RW9 (Abb. 3.22, Subtyp A) oder RU570 (Abb. 3.22, Subtyp G).

In allen durchgeführten Experimenten war zu beobachten, dass die absolute Replikationsfähigkeit eines Isolates in den unterschiedlichen Modellsystemen der HIV-Infektion stärker voneinander differierte als dessen relativer Grad der Replikation gegenüber anderen Viren: Ein Virus, das in einer HLA-Kultur effizient replizierte, z.B. das O-Typ-Isolat 2901 oder das C-Typ-Isolat IN22 (Abb. 3.22 A, B), replizierte, relativ zu den anderen Viren gesehen, auch in primären Lymphozyten-Kulturen effizienter (Abb. 3.22 C, D). Trotz dieses analogen „relativen“ Replikationspotentials, variierte der absolute Replikationsgrad etwa um Faktor 5 bis 13 für IN22 bzw. 2901.

Insgesamt waren die Replikationsfähigkeiten jedes Virus-Stammes relativ zu den anderen in den verschiedenen Zellsystemen gleich, das heißt die Rangfolge der Viren untereinander spiegelte sich mit hoher Zuverlässigkeit in jedem untersuchten Testsystem wieder. Des Weiteren unterschieden sich die absoluten Replikationswerte der HIV-1-Gruppe O-Primärisolate in den HLA-Kulturen nicht mehr als um Faktor 2,3 von den Primärisolaten der HIV-1-Gruppe M bzw. Faktor 3,1 von den laboradaptierten Viren. Der Faktor wurde durch die addierten AUC-Werte der drei Virus-Gruppen (Primärisolate der Gruppe M, der Gruppe O und laboradaptierte Viren), bezogen auf ihre Anzahl in jedem Zellsystem errechnet. Der geringste Unterschied hinsichtlich der Replikation zwischen den analysierten HIV-1-Gruppen war im Kontext von PBMC-Donor-Pool-Infektionen zu beobachten (Faktor 1,8 zw. laboradaptierten Viren und HIV-1-Gruppe O-Primärisolaten, Faktor 1,2 zw. HIV-1-Gruppe M- und O-Primärisolaten).

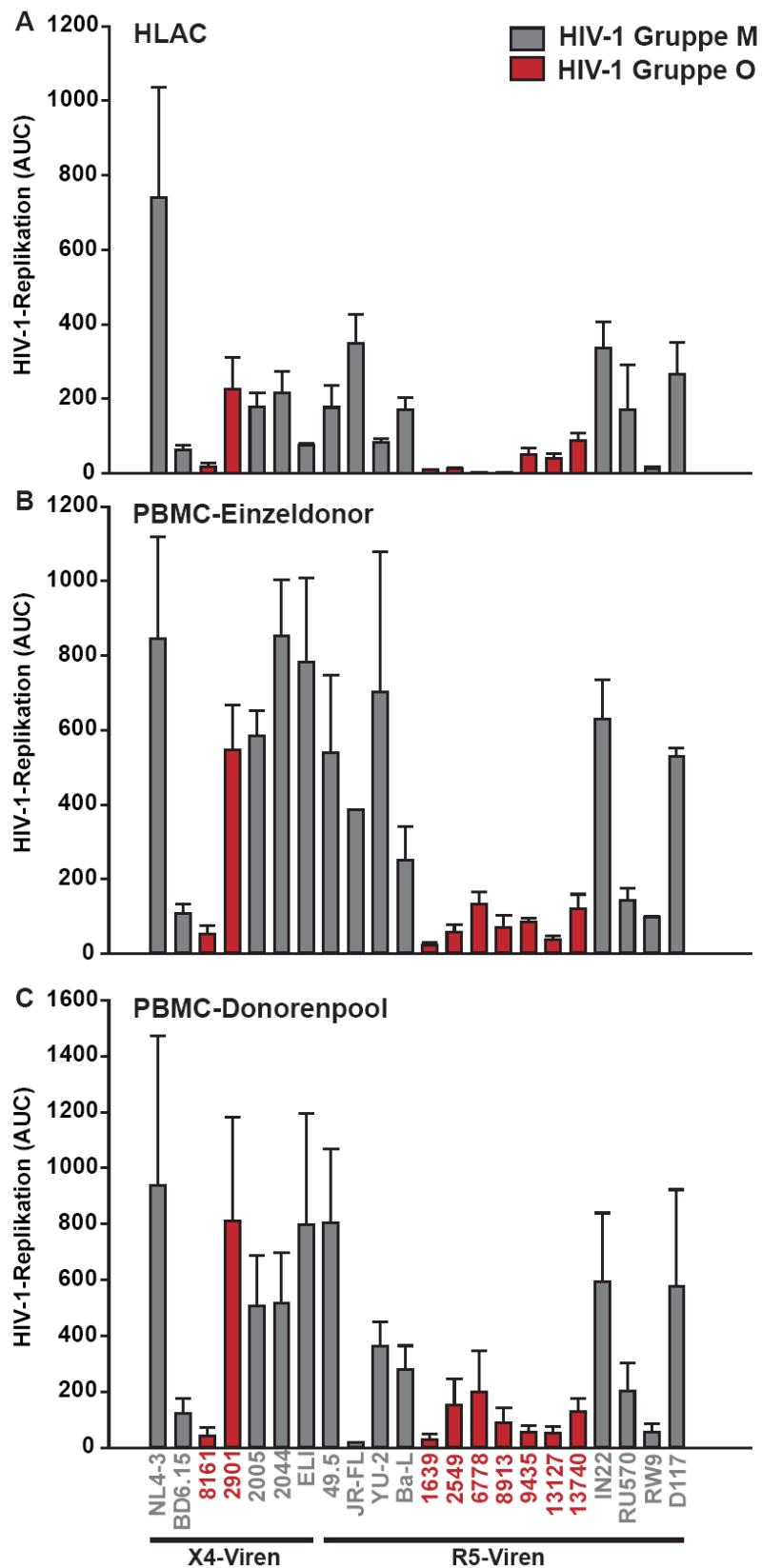


Abb. 3.22: Einzelne HIV-1-Gruppe O-Viren replizieren ähnlich effizient wie verschiedene Primärisolate der HIV-1-Gruppe M, dabei spiegelt sich das Replikationspotential der primären und laboradaptierten HI-Viren in jedem Zellsystem wieder. HLA-Kulturen der Tonsillen 5 (A) und 6 (C) und primäre T-Zell-Kulturen eines Einzel-Donors (B) und eines 4-Donoren-Pools (D) wurden wie beschrieben infiziert und auf eine produktive HIV-Replikation hin analysiert (s. Legende zu Abb. 1). Das Experiment (n = 3) wurde im Triplikat durchgeführt. Dargestellt ist die HIV-1-Replikation, welche an drei Messzeitpunkten im Verlauf eines Experiments (s. Abb. 1) ermittelt wurde, als Integral in arbiträren Zahlen (AUC, *area under the curve*).

3.3.3 X4-HI-Viren und zwei R5-HIV-1-Gruppe O-Isolate depletieren CD4⁺-T-Zellen effizient in humanen Tonsillen-Histokulturen

Tonsillen von jeweils zwei Donoren wurden als Aggregationskulturen präpariert und, wie unter 3.3.2 beschrieben, infiziert. Parallel zur Ernte des Zellkulturüberstandes wurden am Tag 7 und 11 nach Infektion Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und ihre CD3- und CD8-Expression im Durchflusszytometer gemessen. Dies diente der Analyse der CD4⁺-T-Zell-Depletion, indem das Verhältnis zwischen CD4⁺-T-Zellen (CD3⁺/CD8⁻) und CD8⁺-T-Zellen (CD3⁺/CD8⁺) ermittelt wurde. Das Verhältnis der nicht-infizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Die CD4⁺-T-Zell-Depletion entspricht danach in den nicht-infizierten Zellen 0%; die anderen Werte wurden darauf bezogen.

Wie zuvor bereits mehrfach dokumentiert wurde (Jekle et al., 2002; Penn et al., 1999), zog die Infektion mit X4-Viren eine starke Depletion der CD4⁺-T-Zell-Population (linker Teil der Abb. 3.23) nach sich; mit Ausnahme des X4-Virus` MVP-8161-94, das zusätzlich kaum replizierte (Abb. 3.22 A, B, 5 A, E, G).

Im Gegensatz zu den X4-Viren hatte die Infektion mit den meisten R5-Viren erwartungsgemäß einen Verlust von maximal 25% der CD4⁺-T-Zellen (gestrichelte Linie, rechter Teil der Abb. 3.23) zur Folge. Zwei CCR5-verwendende HIV-1 Gruppe O-Viren; 2549 und 13740, verhielten sich nicht konform, da sie, phänotypisch einem X4-Virus vergleichbar, weit über 50% der CD4⁺-T-Zellpopulation depletierten (Abb. 3.23 B, D). Dieser Effekt war in den Tonsillen 5 und 6 am prominentesten, wurde aber durch weitere Experimente gestützt (Abb. 3.24 D, F). In den HLA-Kulturen von zwei Donoren (3 und 4) wurden insgesamt weniger CD4⁺-T-Zellen depletiert, was sich auch nach der Infektion mit dem CXCR4-verwendenden Gruppe O-Virus 2901 zeigte.

Beim Vergleich der zwei R5-HIV-1-Gruppe O-Viren, 2549 und 13740, mit den prototypischen Viren NL4-3 und 49.5 sowie weiteren Primärisolaten wurde deren intermediärer bis X4-Virus-ähnliche Charakter offensichtlich (Abb. 3.24). Durch die Infektion mit dem R5-Virus 49.5 kam es erwartungsgemäß zu geringen Verlusten in der CD4⁺-T-Zellpopulation, während NL4-3 und das X4-Primärisolat 2005 massiv CD4⁺-T-Zellen depletierten (Abb. 3.24 A, B, E). Die Infektion mit NL4-3 wurde teilweise von starken zytotoxischen Effekten begleitet, worauf das Fehlen der Depletionsdaten der Tonsillen 1, 3 und 4 beruht (Abb. 3.24 A, 5 A).

Zusammengefasst besitzen die R5-HIV-1-Typ O-Isolate 2549 und 13740 ein untypisch hohes und allen X4-Viren, wie beispielsweise dem X4-Gruppe O-Isolat 2901, sehr ähnliches Depletionspotential (Abb. 3.24 C, D, F).

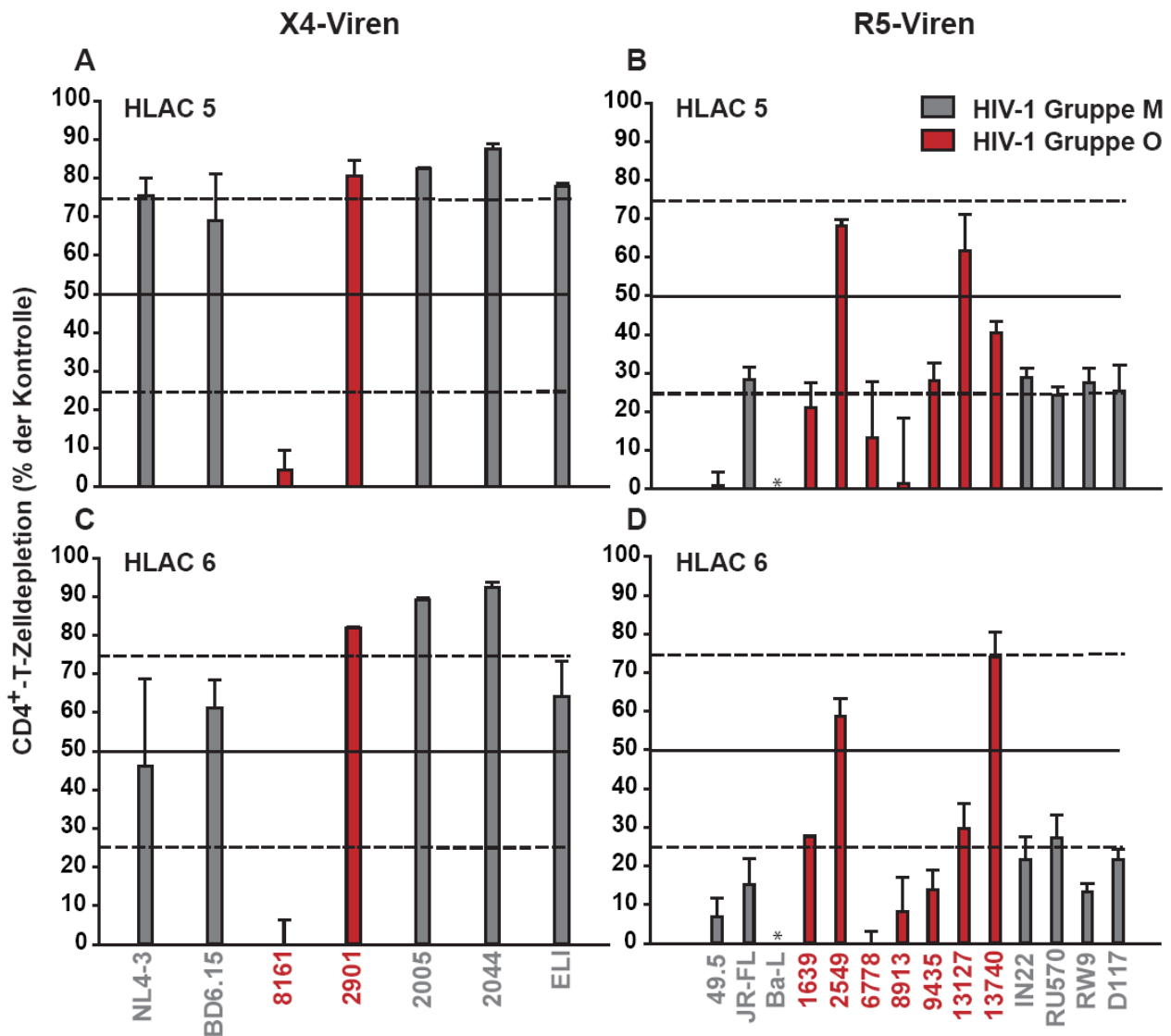


Abb. 3.23: Depletion von CD4⁺-T-Zellen in HLAC nach Infektion mit X4-HI-Viren und zwei R5-HIV-1-Gruppe O-Isolaten. HLA-Kulturen der Tonsillen 5 (A, B) und 6 (C, D) wurden, wie in der Legende zu Abb. 3.21 dargestellt, infiziert. Am 7. und 11. Tag p.i. wurden Zellen auf CD3- und CD8-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Das Verhältnis zwischen CD4⁺- (CD3⁺/CD8⁻) und CD8⁺-T-Zellen (CD3⁺/CD8⁺) wurde bestimmt, wobei das Verhältnis für nicht infizierte Zellen auf 100% gesetzt wurde. Dargestellt ist die Depletion der CD4⁺-T-Zellen, die in der nicht infizierten Probe 0% entspricht, dazu wurden die anderen Proben in Bezug gesetzt. Eins von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung des Tages 11 nach Infektion. Nicht erhobene Daten, aufgrund von Zytotoxizität sind mit * gekennzeichnet.

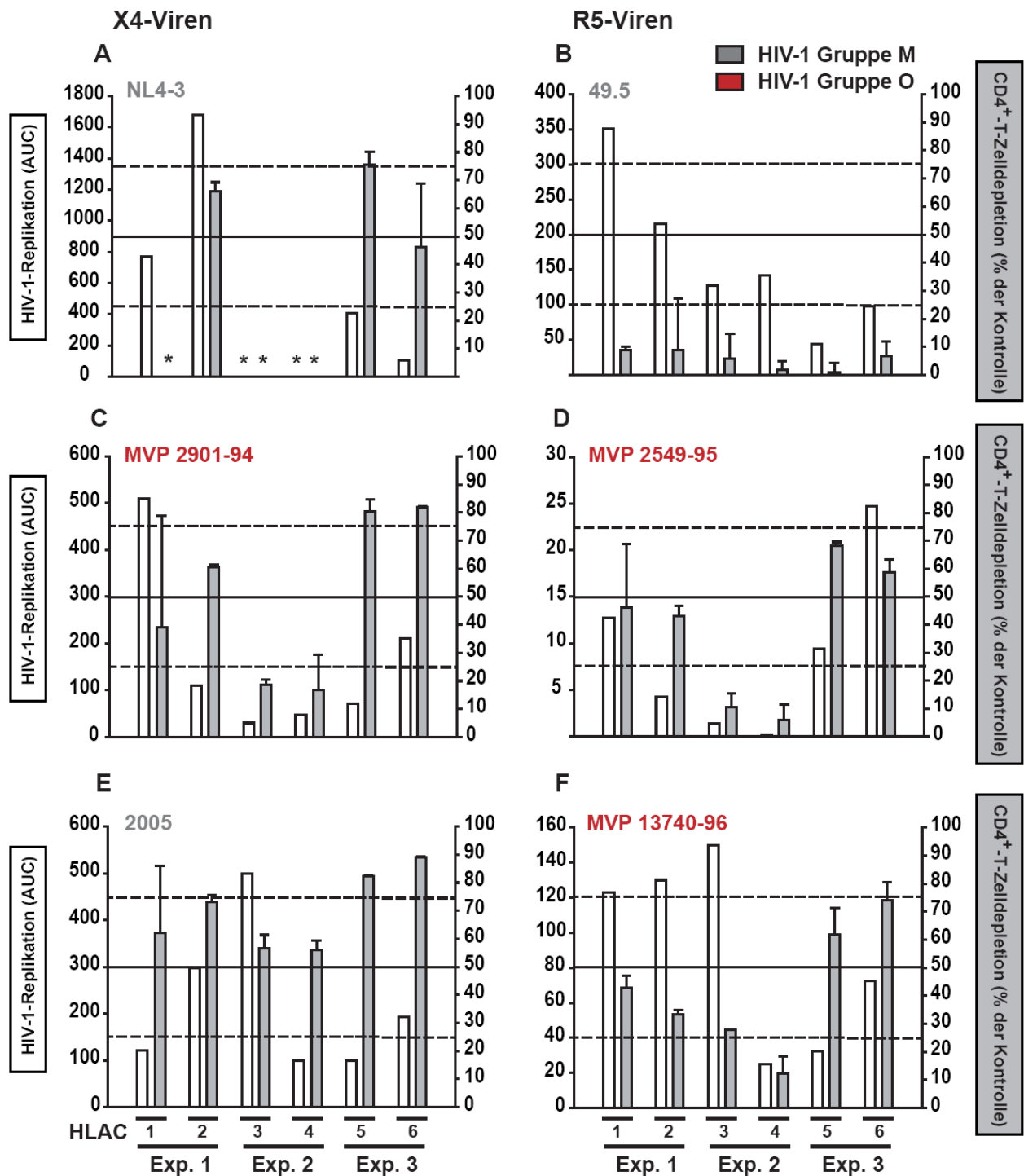


Abb. 3.24: Zwei primäre R5-HIV-1-Gruppe O-Isolate depletieren CD4⁺-T-Zellen in einer X4-Virus typischen Weise. Sechs Tonsillen-Histokulturen wurden mit den prototypischen HI-Viren NL4-3 (A, X4) und 49.5 (B, R5), sowie 3 Primärisolaten der Gruppe O (C, X4-; D, F, R5) und einem Primärisolat der Gruppe B (E, X4) infiziert. 4, 7 und 10 - 11 Tage nach der Infektion wurde die HIV-1-Replikation via p24CA-Antigen-ELISA aus dem Zellkulturüberstand als auch an den beiden letzten Zeitpunkten die CD4⁺-T-Zelldepletion bestimmt. Dazu wurde die CD3- und CD8-Expression der vitalen Zellen durchflusszytometrisch gemessen und das Verhältnis zwischen CD4⁺- (CD3⁺/CD8⁻) und CD8⁺-T-Zellen (CD3⁺/CD8⁺) bestimmt, wobei das der nicht infizierten Zellen auf 100% gesetzt wurde. Gezeigt ist die Depletion der CD4⁺-T-Zellen, die in der nicht infizierten Probe 0% entspricht. Die anderen Proben wurden dazu in Bezug gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung des Tages 7 (HLAC 1 - 4) oder 11 (HLAC 5, 6) nach Infektion. Die Replikation ist als AUC dargestellt. Nicht erhobene Daten, aufgrund von Zytotoxizität sind mit * gekennzeichnet.

3.3.4 R5-HIV-1-Gruppe O-Viren besitzen ein variables $CD4^+$ -T-Zell-Depletionsvermögen, wobei die Depletionskapazität nicht vom Replikationspotential abhängt

Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur massiven Depletion von $CD4^+$ -T-Zellen nicht mit einer effizienteren Replikation der X4-Viren, verglichen mit R5-Viren, in Zusammenhang steht (Penn et al., 1999; Jekle et al., 2002). Beispielsweise die primären R5-Isolate IN22 (HIV-1 Gruppe C) und D117 (HIV-1 Gruppe B) und das laboradaptierte HIV-1 JR-FL replizieren im Vergleich mit dem X4-Isolat ELI besser (Abb. 3.25), führen aber im Gegensatz zu diesem in keinem Experiment zu $CD4^+$ -T-Zell-Verlusten über 25% (Abb. 3.25).

Die durchgeführten Experimente belegen außerdem, dass Depletion und Replikation auch innerhalb der Gruppe der X4-Viren nicht streng miteinander korrelieren, sofern eine produktive Infektion stattfindet. Das X4-Virus 8161 replizierte nicht in den Tonsillen-Histokulturen und depletierte dementsprechend keine $CD4^+$ -T-Zellen (Abb. 3.23).

Das X4-Primärisolat ELI (HIV-1-Gruppe D) infizierte die analysierten HLA-Kulturen etwa gleich effizient (AUC zwischen 50 und 100), und führte dabei zu 30 bis 80% Depletion innerhalb der $CD4^+$ -T-Zell-Population (Abb. 3.25 A, C, E, G). Untermuert wird die Hypothese ebenso durch die Beobachtungen zum Primärisolat 2901, das gut replizierend (AUC: 500) 40% (Abb. 3.25 A) bzw. schwächer replizierend (AUC: 65) 80% (Abb. 3.25 E) der $CD4^+$ -T-Zellen depletiert.

An der breiten Verteilung der X4- als auch der R5-Viren der HIV-1-Gruppe M über die gesamte Länge der X-Achse ist erkennbar (Abb. 3.25), dass die HI-Viren ein stark variables Replikationspotential besitzen, das sich jedoch kaum auf deren $CD4^+$ -T-Zell-Depletionspotential auswirkt. Unter den R5-Viren trifft dies nicht auf die HIV-1-Gruppe O zu, deren Verteilung sich über die Y-Achse erstreckt, und damit einer größeren Variabilität im Depletionsvermögen entspricht, bei relativ vergleichbaren Replikationseigenschaften (rechter Teil der Abb. 3.25). Besonders stechen die R5-Primärisolate (HIV-1-Gruppe O) 13740 und 2549 hervor, da sie sich durch eine starke, im Bereich der X4-Viren liegende, $CD4^+$ -T-Zelldepletion auszeichnen (vergleiche Abb. 3.25 A und B, C und D usw.).

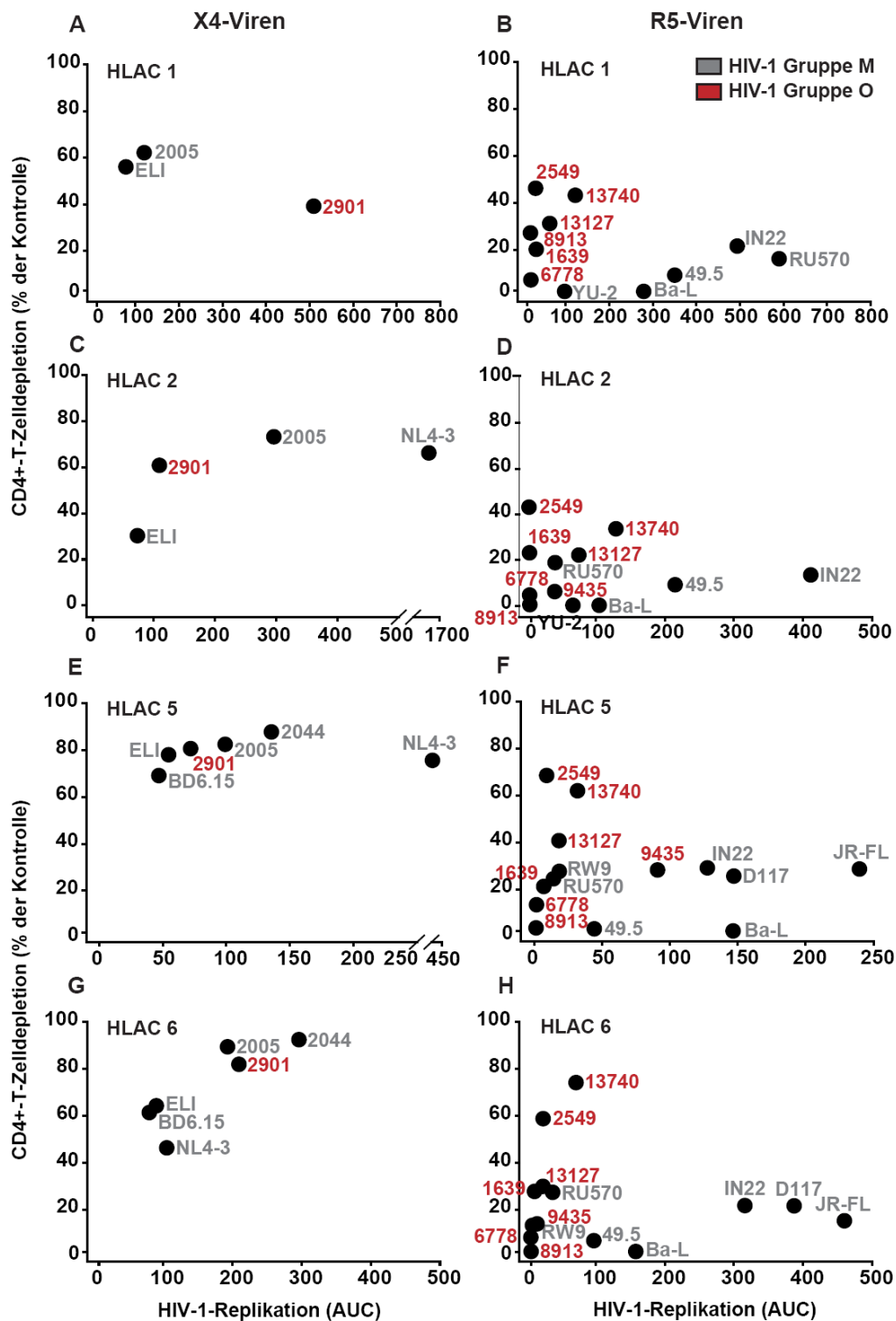


Abb. 3.25: R5-HIV-1-Gruppe O-Viren zeigen eine breite Variabilität im CD4⁺-T-Zell-Depletionsvermögen, die HI-Viren der Gruppe M dagegen große Varianz in der Replikation, wobei Depletions- und Replikationspotential der Viren unabhängig voneinander sind. Aggregationskulturen von Tonsillen wurden, wie in der Legende zu Abb. 3.21 erläutert, infiziert. 4, 7 und 11 Tage nach der Infektion wurde die HIV-1-Replikation via p24CA-Antigen-ELISA aus dem Zellkulturüberstand bestimmt. Die Replikation ist in der arbiträren Einheit AUC aufgetragen und in Bezug zur CD4⁺-T-Zell-Depletion gesetzt. Dazu wurde die CD3- und CD8-Expression der lebenden Zellen am Tag 7 (A - D) bzw. 11 (E - H) p.i. durchflusszytometrisch gemessen und das Verhältnis zwischen CD4⁺- (CD3⁺/CD8⁻) und CD8⁺-T-Zellen (CD3⁺/CD8⁺) bestimmt, wobei das der nicht infizierten Zellen auf 100% gesetzt wurde. Die anderen Proben wurden dazu in Bezug gesetzt. Das Experiment wurde dreimal unabhängig durchgeführt. Daten (MW eines Triplikates) aus zwei Versuchen sind abgebildet.

3.3.5 Phänotypische Analysen bestätigen die CCR5-Verwendung der HIV-1-Gruppe O-Primärisolate 2549 und 13740

Mit Hilfe funktioneller Analysen sollte die Korezeptor-Verwendung der untersuchten Viren, insbesondere der CD4⁺-T-Zellen-depletierenden CCR5-verwendenden HIV-1-Gruppe O-Isolate 2549 und 13740, bestätigt werden. Dazu wurden TZM-bl-Zellen, Reporterzellen mit β -Galaktosidase- und Luziferase-Aktivität, mit den identischen HI-Virusstocks, die für die Infektionen von HLA- und primären T-Zell-Kulturen verwendet wurden, inokuliert. Die Infektion der Zielzellen erfolgte entweder direkt oder nach Vorbehandlung der Zellen mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 [1 μ M] oder dem CCR5-Inhibitor SCH-D [1 μ M]. Diese Wirkstoffe blockieren durch Bindung an den entsprechenden Korezeptor die Interaktion zwischen diesem und HIV-Env.

Abbildung 3.26 zeigt exemplarisch für NL4-3, 2901 und 2005, dass X4-Viren unbehandelte sowie SCH-D-behandelte TZM-bl-Zellen effizient infizieren; während nach einer AMD3100-Vorbehandlung keine oder eine stark verminderte Infektion erfolgte.

Gegensätzlich verhielt es sich bei R5-Viren. Eine Antagonisierung des CXCR4-Korezeptors ließ eine produktive, im Falle von 13740 gegenüber der Kontrollzellen leicht reduzierte, Infektion der Zielzellen zu, wohingegen eine Applikation des CCR5-Antagonisten SCH-D die Infektion der TZM-bl-Zellen komplett (49.5, 13740) bzw. weitestgehend (2549) inhibierte (Abb. 3.26).

3.3.6 Vorhersagen der Korezeptor-Verwendung, basierend auf der V3-Schleifen-Sequenz der HIV-1-Gruppe O-Isolate, stimmen nur teilweise mit den phänotypischen Analysen überein

Nach einer DNS-Extraktion aus HIV-1-Gruppe O-Virus-infizierten TZM-bl-Zellen wurde aus der integrierten viralen DNS mit Hilfe von spezifischen Primern die V3-Schleife des *env*-Gens amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Nukleotidabfolge der V3-Schleife des HIV-1 gp120, die als Hauptdeterminante für den Korezeptor-Tropismus eines Virus angesehen wird, wurde mit Hilfe des Programms geno2pheno analysiert. So kann eine Sequenz-basierte Vorhersage über den Korezeptor-Gebrauch getroffen werden. Dazu wurden die zu

analysierenden Nukleotid-Sequenzen mit der des HIV-1-Gruppe M-Virus HXB2 verglichen.

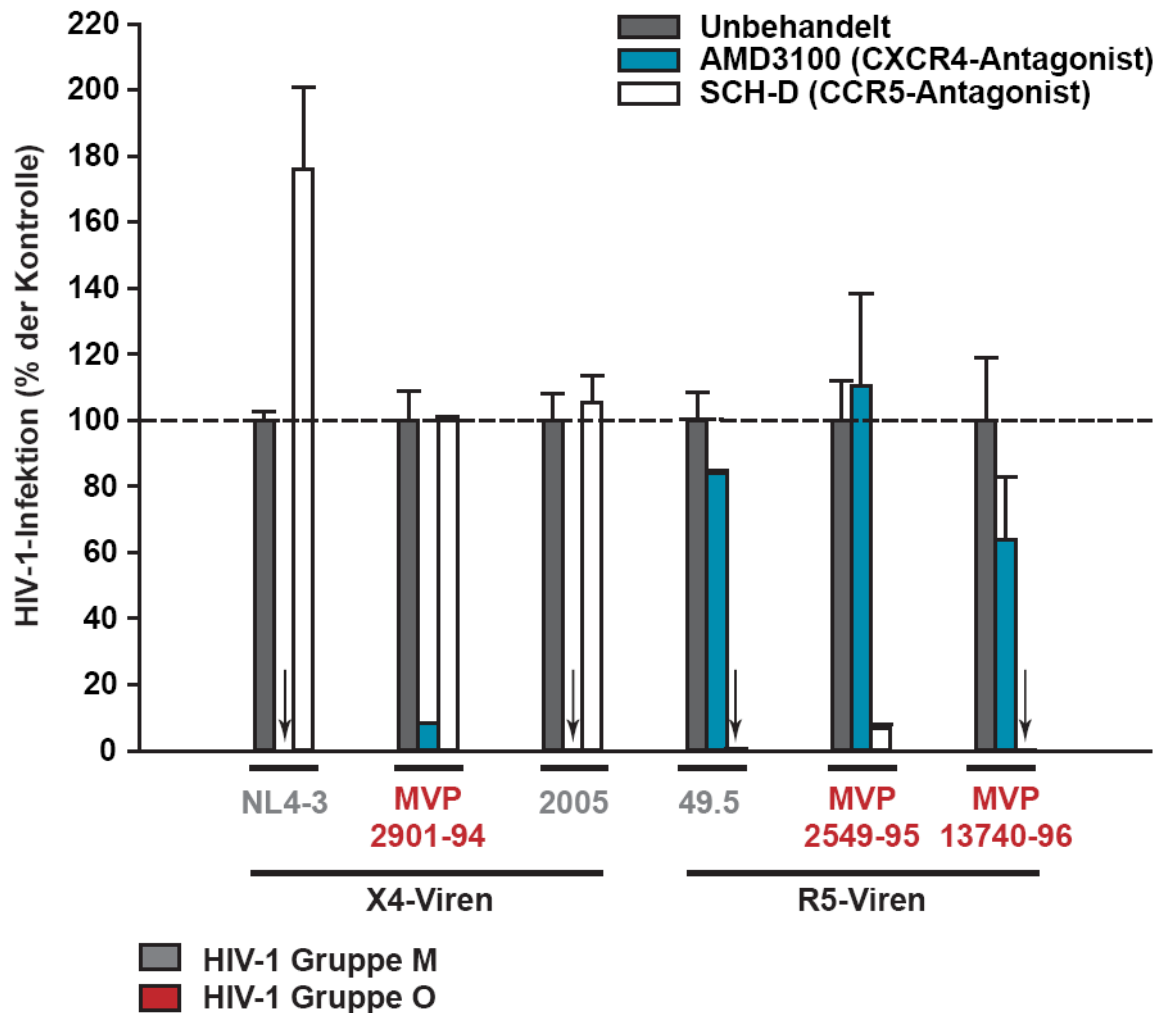


Abb. 3.26: Bestimmung der Korezeptor-Verwendung prototypischer HI-Viren und primärer Virusisolate. TZM-bl-Zellen (2×10^4 /well einer 96-well-Platte) wurden ausgesät und am nächsten Tag entweder direkt mit 15 bzw. 0,3 (MVP-13740-96) ng p24CA/ well infiziert oder vor der Inokulation für 30 Minuten mit den Korezeptor-Antagonisten AMD3100 (CXCR4) oder SCH-D (CCR5) (beide $1 \mu\text{M}$) behandelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen. 72 Stunden nach der Infektion folgte auf die Zellyse eine Quantifizierung der Luziferase-Aktivität. In der Abbildung sind Daten (Mittelwerte von Duplikaten \pm Standardabweichung) aus drei Experimenten zusammengefasst. \downarrow kennzeichnet eine Reduktion der Infektion auf Hintergrund-Niveau.

Wie der Tabelle 3.3 zu entnehmen ist, stimmte das Ergebnis der Sequenzanalyse nur im Fall von zwei Viren, 6778 und 8913, mit der im Rahmen der Arbeit durchgeführten phänotypischen Analysen unter Verwendung von Korezeptor-Antagonisten (3.3.5) überein. Dittmar und Kollegen publizierten 1999 Daten, die die im Rahmen dieser Arbeit analysierten HIV-1-Gruppe O-Isolate betreffen. Die Aussagen zum Korezeptor-Tropismus wurden für drei HI-Isolate durch die Sequenz-

analysen bestätigt, während die funktionellen Daten für fünf von sechs Primärisolaten mit den veröffentlichten konsistent sind. Die publizierten Daten stammen von Experimenten mit GHOST-Indikatorzellen, die stabil humanes CD4 entweder zusammen mit CXCR4 oder CCR5 exprimierten.

Die Analyse der Sequenz des Primärisolats 2549 ergab keine Vorhersage über die Korezeptor-Verwendung mittels $\text{geno2pheno}_{[\text{coreceptor}]}$.

Tabelle 3.3: Primärisolate der HIV-1-Gruppe O und deren Korezeptor-Verwendung. ^a siehe 3.3.5; ^b siehe 3.3.6; ^c publiziert in Dittmar et al., 1999

| Primärisolat | HIV-1-Gruppe | Korezeptor-Tropismus | | |
|---------------------|--------------|---|--|---|
| | | Funktionelles Testergebnis ^a | Vorhersage der Sequenzanalyse ^b | Funktionelles Testergebnis ^c |
| MVP 13127-96 | O | CCR5 | CXCR4 | CCR5 |
| MVP 13740-96 | O | CCR5 | CXCR4 | CCR5 |
| MVP 2549-95 | O | CCR5 | - | nicht untersucht |
| MVP 2901-94 | O | CXCR4 | CCR5 | CCR5 |
| MVP 6778-94 | O | CCR5 | CCR5 | CCR5 |
| MVP 8913-95 | O | CCR5 | CCR5 | CCR5 |
| MVP 9435-96 | O | CCR5 | CXCR4 | CCR5 |

4. Diskussion

4.1 Wässrige Extrakte von *Melissa officinalis*, *Mentha x piperita* und *Salvia officinalis* sind antiviral aktiv

Verschiedene Spezies aus der Familie der Lamiaceae werden in der traditionellen Medizin, insbesondere in der Phytotherapie angewendet. In der Phytotherapie wird *Melissa officinalis* unter anderem als antiviral (Dimitrova, Dimov et al. 1993), antimikrobiell (Larrando 1995) und antioxidativ (Ribeiro 2001) eingestuft.

Antivirale Eigenschaften gegen *Herpes simplex*-Virus Typ 1 und 2 wurden für Melissen-Extrakt mehrfach beschrieben (Cohen et al. 1964; Dimitrova et al. 1993; (Mohrig 1996); kürzlich wurde diese Aktivität auch bei anderen Arten der Lamiaceen beobachtet (Nolkemper, Reichling et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die wässrigen Extrakte von Vertretern dieser Pflanzenfamilie hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung gegen Infektionen mit HIV-1 untersucht. Dies führte zur Identifikation einer wirkungsvollen anti-HIV-Aktivität in den Extrakten aus getrockneten Blättern dreier bekannter Pflanzen. Die antivirale Wirkung dieser Tee-ähnlichen Extrakte aus Melisse, Pfefferminze und Salbei war hauptsächlich gegen HIV-1-Virionen gerichtet. Die Extrakte inhibierten die Fähigkeit der Viruspartikel in Zielzellen einzudringen.

4.1.1 Wässrige Lamiaceen-Extrakte zeigen eine konzentrationsabhängige anti-HIV-1-Aktivität auf humanen T-Zelllinien, primären Makrophagen und in der Tonsillen-Histokultur *ex vivo*

Die systematische Untersuchung der wässrigen Pflanzenextrakte mit Hilfe eines experimentellen Konzepts, dass die Beobachtung der potentiellen Effekte der Extrakte auf verschiedene Schritte der Virus-Replikation als auch auf die Zellen zuließ, demonstrierte starke anti-HIV-Aktivitäten für die drei Extrakte (Abb. 3.1, 3.2). Dabei lag die effektive Konzentration der pflanzlichen Extrakte typischerweise zwei Log-Stufen unter der zytotoxischen Konzentration, die parallel zu den Infektions-experimenten in Standard-Viabilitätstests kontrolliert wurde (Abb. 3.1, 3.2).

Diese Befunde ließen sich nicht nur in humanen T-Zelllinien beobachten, sondern auch in verschiedenen Modellsystemen mit größerer biologischer Relevanz, primären Makrophagenkulturen und der humanen Tonsillen-Histokultur, bestätigen (Abb. 3.2).

Neben den erwähnenswerten Selektivitätsindices ist auch die longitudinale Wirkung der wässrigen Extrakte hervorzuheben. Die HIV-1-Infektion primärer Makrophagen konnte über eine Periode von sechzehn Tagen durch eine nur dreimalige Zugabe von Melissen-Extrakt in 1- und 0,3-prozentiger Konzentration komplett unterdrückt werden (Abb. 3.2 C). Im Hinblick auf die Entwicklung von topischen Mikrobiziden ist dies ein attraktives Charakteristikum, denn an diese Substanzklasse würde der Anspruch gestellt, idealer Weise über Stunden effektiv zu sein.

Die Selektivitätsindices für alle drei Lamiaceen-Extrakte, die zwischen > 19 und > 1834 liegen, sind für komplexe Pflanzen-Extrakte vielversprechend. Zum Vergleich, SI-Werte von > 40 , > 50 und > 333 wurden für Zellulosesulfat, Polymethylen-Hydroquinonsulfonat und für das Mandelsäure-Kondensationspolymer SAMMA bei der Infektion von primären Zielzellen mit HIV-1_{Ba-L} ermittelt (Keller, Klotman et al. 2003); diese Substanzen sind Kandidaten für die Entwicklung topischer Mikrobizide.

Das zuvor erwähnte Zellulosesulfat gehört wegen der Ergebnisse einer klinischen Studie, bei der nach Applikation des Wirkstoffes eine erhöhte Seroconversion auftrat, nicht mehr zu den Mikrobizid-Kandidaten. Neben den Erfahrungen mit Nonoxynol-9 (Van Damme, Ramjee et al. 2002) offenbaren die Resultate mit Zellulosesulfat, dass die Unschädlichkeit des Produktes von absoluter Wichtigkeit ist. Interessanterweise betragen die SI-Werte für die wässrigen Extrakte von Salbei, Melisse und Pfefferminze auch im Rahmen von HSV-2-Infektionen zwischen 65 und 2037 (Nolkemper, Reichling et al. 2006).

4.1.2 Die wässrigen Lamiaceen-Extrakte wirken direkt und schnell auf die HIV-1-Partikel und beeinträchtigen somit die Virionen-Fusion

Parallel durchgeführte Infektionen nach Extrakt-Exposition von sowohl Viruspartikeln als auch Zellen, oder von Zielzellen alleine, lieferten erste Hinweise auf den Wirkmechanismus der wässrigen Extrakte, da nur das Experiment, das die Behandlung

freier Viruspartikel einschloss, zu einer effektiven Inhibition der HIV-Infektion führte (Abb. 3.3 A, B). Ein zelluläres Ziel für die anti-HIV-Aktivität der Extrakte konnte damit weitestgehend ausgeschlossen werden.

Mechanistisch konnte die Wirkweise der Extrakte mit Hilfe des Virionen-Fusionstests (Cavrois, De Noronha et al. 2002) weiter aufgeklärt werden, der die Rolle der Extrakt-induzierten Inhibition der Fusion der Virionen mit Zielzellen aufdeckte. Die inhibierte Fusion spiegelte sich in einer gehemmten Replikation wieder (Abb. 3.4 B) und stellt damit wohl den Hauptmechanismus für die anti-HIV-Aktivität der Extrakte dar.

Die antivirale Hauptaktivität der wässrigen Lamiaceen-Extrakte scheint also viruzid zu sein und aufgrund dieses Mechanismus die Interaktion zwischen Virus und Zelle zu beeinträchtigen. Diese Aktivität wirkte sich schnell aus, da auch die simultane Zugabe von Virus und Extrakt zu den Zellen die Entfaltung der vollen antiviralen Wirkung erlaubte (Abb. 3.6 B). Stattdessen waren bereits an die Zelloberfläche gebundene Viruspartikel weitestgehend vor der anti-HIV-Aktivität geschützt (Abb. 3.6 C), was nahelegt, dass nach der Bindung des HIV-Rezeptor-Komplexes die Extrakt induzierte Veränderung des Virions entweder nicht vor sich gehen kann oder ihre funktionelle Konsequenz verliert.

Zum jetzigen Zeitpunkt können reversible oder transiente Effekte der Extrakte auf die Zelloberfläche, die zusätzlich die Virus-Fusion behindern oder auf intrazelluläre Schritte des HIV-1-Replikationszyklus wirken, nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

4.1.3 Wässrige Lamiaceen-Extrakte inhibieren effizient die Infektionen mit diversen Virusstämmen, darunter Enfuvirtid-insensitive HIV-1-Mutanten, aber führen nicht zur Inhibition einer HIV-1-Env-vermittelten Zell-Zell-Fusion

Es wurde in *single-round*-Infektionen eine starke antivirale Aktivität gegen verschiedene Virustypen, die ein breites Spektrum viraler Hüllproteine abdeckten (Abb. 3.8), beobachtet, jedoch keine gegen unbehüllte Adenoviren vom Typ 5 (Abb. 3.8 F).

Aufgrund der Tatsache, dass die Extrakte HIV-1-Virionen, die mit verschiedenen X4- und R5-Hüllproteinen als auch mit dem heterologen VSV-G pseudotypisiert wurden, inhibierten, mit MoMLV-Infektionen interferierten und außerdem als

hochaktiv gegen HSV-1 und HSV-2 gelten (Nolkemper, Reichling et al. 2006), ist ein Mechanismus, der nicht Virus-spezifische Komponenten der Virus-Hülle involviert, wahrscheinlich. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang, dass die Extrakte die Fusion von Viruspartikeln mit Zellen inhibierten, während sich der verwendete Melissen-Extrakt vollständig ineffektiv bezüglich der Blockierung einer HIV-1-Env-vermittelten Zell-Zell-Fusion erwies (Abb. 3.7 B). Dies lässt den Schluss zu, dass der Kontext der Virus-Membran eine Grundvoraussetzung oder sogar der ideale Angriffspunkt für die antivirale Aktivität, die von den Lamiaceen-Extrakten ausgeht, ist.

gp41 stellt als transmembranes Protein in der Hüllmembran von HIV-Partikeln das spezifische Target des Fusionsinhibitors Enfuvirtid dar. Enfuvirtid inhibiert den HIV-1-Eintritt durch kompetitive Bindung an eine Helix-Struktur in der gp41-Sequenz und verhindert somit die Bildung der fusionsaktiven Haarnadel-Struktur (Pierson, Doms et al. 2004).

In Experimenten wurde die Wirkung der wässrigen Extrakte auf HIV-1-Mutanten mit reduzierter Enfuvirtid-Sensitivität untersucht (Abb. 3.6 A), und konnte als ebenso effektiv wie gegen das Wildtyp-HI-Virus NL4-3 bewertet werden. Im Rahmen der antiviralen Therapie stellt die Ausbildung von Resistenzen eine große Problematik dar, die im Falle der Enfuvirtid-insensitiven HIV-Stämme mit Hilfe eines eher unspezifischen Wirkmechanismus, wie er augenscheinlich bei den Lamiaceen-Extrakten vorliegt, im Kontext der HIV-Transmission überwunden werden könnte.

Einige Kandidaten, die sich derzeit in der Entwicklungsphase zum Mikrobizid befinden, darunter Membran-zerstörende Detergenzien und säuernde Agenzien, inaktivieren die HIV-Partikel direkt (Lederman, Offord et al. 2006). Einen interessanten Vergleich liefern verschiedene Peptide mit anti-HIV-Aktivität, die direkt mit der Transmembran-Untereinheit des Hüll-Glykoproteins gp41 interagieren und so die Virus-Fusion verhindern. Zu diesen Peptiden gehören sowohl SJ-2176 und das zuvor genannte Enfuvirtid (Jiang, Lin et al. 1993; Wild, Shugars et al. 1994), als auch VIRIP, ein natürlich vorkommendes, in Hämofiltrat identifiziertes Peptid (Munch, Standker et al. 2007).

Während den Lamiaceen-Extrakte und den beschriebenen antiviralen Peptiden gemeinsam ist, dass sie die Fusion von HIV-Partikeln mit Zellen inhibieren, unterscheiden sie sich stark hinsichtlich des Wirkmechanismus. Auf der einen Seite stehen die auf gp41-wirkenden Peptide, die hochselektiv gegen HIV-1 gerichtet und

nur in sehr hohen Dosen zytotoxisch sind, aber die Bindung des Virus an den Rezeptor noch ermöglichen. Auf der anderen Seite befinden sich die komplexen wässrigen Extrakte, die die Viruspartikel, ohne deren Integrität zu beeinträchtigen, so zu modifizieren scheinen, dass bereits die Virus-Anheftung inhibiert wird. Dies geschieht, indem sie nicht selektiv auf spezifische Virus-Hüllen wirken, womit sie eine breitere antivirale Aktivität bei nur moderater Zytotoxizität aufweisen.

Pflanzliche Stoffe können aber ebenso durch spezifische Wirkmechanismen frühe Schritte des Replikationszyklus bei der Infektion mit HIV-1 hemmen, worauf Experimente mit Granatapfelsaft (*Punica granatum* aus der Familie der Lythraceae) hinweisen. Die Vorbehandlung des viralen Glykoproteins gp120 inhibierte die Bindung von löslichem CD4. Weitere Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Granatapfelsaft auch die Bindung zwischen gp120 und den Korezeptoren blockieren kann (Neurath, Strick et al. 2005).

4.1.4 Die bis dato identifizierten Hauptinhaltsstoffe liefern keine Erklärung für die anti-HIV-Aktivität der wässrigen Lamiaceen-Extrakte

Die Identifikation von individuellen Komponenten mit hoher antiviraler Aktivität beispielsweise durch eine auf biologischen Ergebnissen beruhende Fraktionierung der wässrigen Extrakte, könnte ihre Verwendung als eine Hauptkomponente für die Entwicklung eines topischen Mikrobizids gegen die Transmission von den zwei wichtigen sexuell-übertragbaren Pathogenen HIV-1 und HSV-2 stärken.

Phytochemisches Screening von *Melissa officinalis* hat das Vorhandensein von Flavonoiden, Terpenen und Terpensäuren sowie Kaffee- und Rosmarinsäure als auch weiteren phenolischen Substanzen und Tannin (Hohmann, Zupko et al. 1999) aufgedeckt. Dem Tannin Rosmarinsäure wurden antivirale Eigenschaften gegen HIV zugeschrieben (Mazumder, Neamati et al. 1997; Yamasaki, Nakano et al. 1998; Kim, Lee et al. 1999), die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden konnten. Ebenso wenig konnte für Kaffeesäure als zweite analysierte Einzelsubstanz, die in hohen Konzentrationen in Lamiaceen vorkommt oder für beide Säuren in Kombination, eine anti-HIV-Aktivität aufgezeigt werden.

Auch aufgrund ihrer geringen relativen Molekülmasse können diese beiden Einzelsubstanzen, zumindest als einzelne Moleküle, als ursächlich für die anti-HIV-

Effekte der Lamiaceen-Extrakte ausgeschlossen werden; denn basierend auf eigens durchgeführten Dialyse-Studien (Abb. 3.9 D) scheinen die aktiven Komponenten der Extrakte ein Molekulargewicht von mehr als 12 kDa zu besitzen.

4.1.5 Wässrige Lamiaceen-Extrakte verändern die Dichte der Viruspartikel, aber weder deren Stabilität noch die Virus-assoziierte Menge von Env und Gag

Durch Experimente, in denen Viruspartikel nach Extrakt-Exposition durch Saccharose-Kissen pelletiert wurden, konnte ein Effekt der wässrigen Pflanzen-Extrakte auf die Integrität der Virionen ausgeschlossen werden (Abb. 3.10).

Mechanistisch gesehen induzierte die Extrakt-Behandlung eine Akkumulation von Virionen in einer höheren Saccharose-Dichte (Abb. 3.11); physikobiochemisch betrachtet kann dies nicht auf eine Aggregation von Viruspartikeln im Gradienten zurückzuführen sein. Stattdessen zeigt dieser Befund, eine Korrelation zwischen der Erhöhung der Viruspartikel-Dichte und der reduzierten Infektiosität auf, jedoch lässt sich ein Kausalzusammenhang zu diesem Zeitpunkt nicht beweisen.

Solch eine Dichte-Erhöhung könnte zum Beispiel auf chemischen Modifikationen der Proteine, Glykane (Balzarini 2007) oder Lipide des Virions durch spezifische Extrakt-Komponenten basieren; auch eine Anheftung von Extrakt-Bestandteilen an die Viruspartikel wäre als Ursache vorstellbar.

In diesem Kontext ist interessant, dass die experimentelle Modifikation der Lipid-Komposition von HIV-1-Partikeln, zum Beispiel durch Methyl- β -Cyclodextrin induzierte Cholesterol-Depletion und/ oder exogene Anreicherung mit Lipiden, in einer höheren Dichte der Virionen und einer Reduktion der Infektiosität resultieren kann (Campbell, Crowe et al. 2002; Campbell, Gaus et al. 2004). Bemerkenswert ist, dass der Effekt durch die Melissen-Extrakt-Behandlung auf die Dichte der Virionen relativ zu den unbehandelten Kontroll-Viruspartikeln mindestens so ausgeprägt zu sein scheint wie der durch die exogen modifizierten Lipide erreichte (Campbell, Crowe et al. 2002; Campbell, Gaus et al. 2004).

Zusammengenommen lässt sich daraus ein plausibles Modell zum Wirkmechanismus der wässrigen Lamiaceen-Extrakte ableiten: eine Extrakt-induzierte Dichte-Erhöhung der behüllten Viruspartikel verhindert ihre Bindung an die Zellmembran der Zielzellen. Es wäre sehr interessant den molekularen Mechanismus,

aufgrund dessen die Lamiaceen-Extrakte die Dichte der HIV-1-Partikel erhöhen, weiter zu erforschen.

Zusammenfassend gesagt, reduzieren wässrige Extrakte von Lamiaceen drastisch und schnell die Infektiosität von HIV-1 in nicht-zytotoxischen Konzentrationen. Die antivirale Aktivität beruht wahrscheinlich auf einer Extrakt-induzierten Erhöhung der Viruspartikel-Dichte bevor es zur Bindung an die Zelloberfläche bzw. an Rezeptoren kommt. Aufgrund der ebenso effektiven Wirkung gegen HSV-2 könnten die Lamiaceen-Extrakte eine innovative Basis für die Entwicklung viruzider topischer Mikrobizide liefern.

4.2 Flavonoide Lamiaceen zeigen anti-HIV-Aktivität

Die weltweite Verbreitung von HIV hat einen intensiven Forschungsaufwand zur Entdeckung neuer Präparate, die effizient HI-Viren inhibieren können, angeregt. Natürliche Produkte, wie beispielsweise Flavonoide, sind eine reiche Quelle für biologisch aktive Verbindungen. Diese in höheren Pflanzen ubiquitären Substanzen kommen als natürliche Komponenten in der Nahrung des Menschen vor. Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass ein erhöhter Konsum von Flavonoid-haltiger Nahrung mit dem allgemeinen Wohlbefinden und der Prävention von chronischen und degenerativen Erkrankungen assoziiert ist (Havsteen 2002); (Johnson 2004); (Ames, Shigenaga et al. 1993). Für eine Reihe von Flavonoiden wurden antivirale Wirkungen nachgewiesen (Vlietinck, De Bruyne et al. 1998; Middleton, Kandaswami et al. 2000).

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden die Entdeckung und Entwicklung von Flavonoiden und ihren Analoga als anti-HIV-Agentien in größerem Umfang erforscht, und bedeutende Fortschritte erzielt: beispielsweise zeigte Acacetin-7-O- β -D-galaktopyranosid, isoliert aus dem Methanol-Extrakt von *Chrysanthemum morifolium* (Chrysantheme, Asteraceae), starke anti-HIV-Aktivität (Hu 1994), wie auch Isorhamnetin ($EC_{50} = 5,63 \mu\text{M}$), das aus *Artemisia capillaris* (Orientalischer Beifuß, Asteraceae) isoliert wurde (Wu 2001). Calanolid A stammt ursprünglich aus *Calophyllum lanigerum*, dem tropischen Bintangor-Baum. Die antivirale Aktivität ist gegen frühe Schritte des HIV-1-Replikationszyklus gerichtet (Dharmaratne, Wanigasekera et al. 1998); (Kashman 1992), wobei der IC_{50} -Wert für den AZT-resistenten HIV-1-Stamm G910-6 bei $0,027 \mu\text{M}$ in MT-2-Zellen lag.

Flavonoide gehören zur großen Gruppe der pflanzlichen Polyphenole (Harborne and Williams 2000). Sie leiten sich strukturell vom Flavan (2-Phenylbenzodihydropyran) ab, dessen Struktur aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem Sauerstoff-haltigen heterozyklischen C-Ring besteht. Je nach Oxidationszustand der Kohlenstoffatome 2, 3 und 4 im C-Ring werden die Flavanderivate in sechs Unterklassen unterteilt, neben den bekannten Anthocyanen und Isoflavonoiden stellen die Flavone (3-Oxo-flav-2-ene) eine dar.

Das Oxidationspotential der Flavonoide ist vom Substitutionsmuster der Hydroxylgruppen der drei Benzenringe abhängig (Cotelle, Bernier et al. 1996; Cao, Sofic et al. 1997; Arora, Nair et al. 1998; Arora, Nair et al. 1998). Unter ver-

schiedenen Bedingungen besitzen sie oxidierende oder reduzierende Eigenschaften (Yang 2001); ein weiteres wichtiges chemisches Charakteristikum ist ihre Funktion als Eisen- (Morel 1993; van Acker 1998) oder Kupfer-Chelatbildner (Brown, Khodr et al. 1998); (Kuo 2001).

4.2.1 Spezifische Flavonoide inhibieren potent die HIV-1-Replikation

Innerhalb der Flavonoid-Unterklassen können Substitutionen funktioneller Gruppen an verschiedenen Positionen des Grundgerüsts stattfinden, wobei Hydroxylierungen und/ oder Methoxylierungen die wichtigsten Modifikationen darstellen. Zudem wird das Spektrum möglicher Derivate vor allem durch die Verbindungen mit Zuckern, Sulfat- oder Acetylresten vergrößert, so dass bislang über 5000 verschiedene natürliche Flavonoide bekannt sind (Harborne und Williams, 2000). Aus der großen Gruppe der Flavonoide wurden in dieser Arbeit 24 Verbindungen systematisch auf ihre antivirale Wirkung getestet.

Zu diesem Zweck wurde HIV-1_{NL4-3} vor der Infektion von humanen T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der zu analysierenden Substanzen inkubiert. Die HIV-1-Replikation wurde anhand der p24CA-Konzentration im Zellkulturüberstand verfolgt. Diese Herangehensweise ließ sowohl mögliche Effekte der Flavonoide auf die Zellen als auch auf die extra- und intrazellulären Schritte des retroviralen Replikationszyklus zu. Mehrere der untersuchten Flavonoide inhibierten die HIV-Infektion der Zielzellen in einer Konzentration von 50 µM (Abb. 3.12) und reihten sich damit in die Liste der Flavonoide mit antiviralen Eigenschaften, von denen bereits einige Beispiele genannt wurden (4.2, ein. Neben der antiviralen Wirkung der Verbindungen wurde ihre mögliche Zytotoxizität mittels eines Standard-Viabilitätstests kontrolliert. Die Substanzen interferierten auch in der höchsten applizierten Konzentration nicht mit der Zellviabilität. Es ist bekannt, dass Flavonoide im Gegensatz zu anderen aktiven Pflanzenstoffen, wie beispielsweise den Alkaloiden, eine geringere Toxizität aufweisen. Dennoch wurde ihr pharmakologischer Nutzen bereits wegen ihrer potentiellen Toxizität intensiv diskutiert. Beispielsweise führt die Oxidation von Flavonoiden zur Entstehung von Intermediaten, die als freie Radikale schädlich für Zellen sein können (Galati and O'Brien 2004). Dies schien in den durchgeführten Experimenten kein Problem darzustellen.

Zwei Flavonoide, bezeichnet als MP-03 und MP-04, zeichneten sich in den Experimenten, die mit den Flavonoiden aus einer ersten Aufreinigung durchgeführt wurden, durch besonders potente und konzentrationsabhängige anti-HIV-Aktivität ohne Anzeichen von Zytotoxizität aus. Die IC_{50} -Werte lagen im picomolaren Konzentrationsbereich (Abb. 3.13). Diese aus *Marrubium peregrinum* (Grau-Andorn, Lamiaceae) isolierten Substanzen gehören zu der chemischen Klasse der Flavone. Bekannte natürliche Flavone sind Apigenin, Luteolin und Tangeritin. Flavone liegen in nur wenigen Nahrungspflanzen vor. Sie werden von verschiedenen Lamiaceen, darunter auch mehrere Pfefferminz-Spezies, produziert (Zaidu 1998). Reutrakul und Kollegen demonstrierten, dass zwei Flavone aus Grätenblattgewächsen (Ochnaceae) die Reverse Transkriptase von HIV-1 mit IC_{50} -Werten von 2,0 und 2,4 $\mu\text{g/ml}$ inhibieren konnten (Reutrakul, Ningnuek et al. 2007).

Für MP-03 und MP-04, aus der ersten durchgeführten Aufreinigung des Pflanzen-Extraktes, ergaben sich Selektivitätsindices von > 1000 bzw. > 1428 . Die SI-Werte der im Rahmen der Arbeit untersuchten wässrigen Lamiaceen-Extrakte betragen im gleichen Testsystem zwischen 71 und 103 (Geuenich 2008). Da die Menge des MP-03 begrenzt war, wurde das Flavon erneut aus *Marrubium peregrinum* aufgereinigt. Die antivirale Aktivität des MP-03 dieser zweiten Aufreinigung war im Vergleich zur ersten Aufreinigung 100- bis 1000-fach schwächer und damit verringerten sich auch die SI-Werte, je nach Zell- und Testsystem, auf etwa 8 bis 60. Zur weiteren Einordnung, der Richtwert des Selektivitätsindex von Pharmazeutika sollte über 4 liegen, und für verschiedene Substanz-Kandidaten in der Mikrobizid-Entwicklung wurden SI-Werte zwischen > 40 und > 333 ermittelt (Keller et al. 2003).

Die beiden Flavone MP-03 und MP-04, letzteres mit einer zusätzlichen Methylgruppe am A-Ring, weisen sehr ähnliche chemische Strukturen auf. Mithilfe der Analyse von unterschiedlichen Flavonen auf antivirale Wirkung, wurde versucht die für die anti-HIV-Aktivität essentiellen Substituenten des Flavon-Grundgerüsts zu identifizieren. Keines der untersuchten Flavone der Firma Extrasynthese (siehe Abb. 2.2) inhibierte die HIV-1-Infektion der humanen Zielzellen. Aufgrund der Strukturunterschiede dieser Flavone zu MP-03 und MP-04 könnte eine Hydroxygruppe am A-Ring (*meta*-Stellung) in Kombination mit einer Methoxygruppe am B-Ring (*ortho*-Stellung) eine entscheidende Rolle für die Inhibierung der HIV-1-Infektion spielen. Diese Substituenten haben MP-03 und MP-04 gemeinsam,

während keines der anderen getesteten Flavone diese beiden Atomgruppen gepaart besitzt.

4.2.2 BJ486K, chemisch synthetisiertes MP-03, ist antiviral aktiv

Aufgrund der starken HIV-1-Infektionen inhibierenden Wirkung als auch der limitierten Menge des aus pflanzlichem Material aufgereinigten Flavons MP-03 wurde dieses einerseits durch chemische Synthese (Dr. E. Davioud-Charvet) und andererseits durch erneute Aufreinigung, wie auch in 4.2.1 erwähnt, aus *Marrubium peregrinum* gewonnen. Die Überprüfung hinsichtlich der antiviralen Aktivität der neu aufgereinigten bzw. synthetisierten Verbindung demonstrierte in *single-round*-Experimenten mit HIV-1-GFP-Reporterviren (Abb. 3.16 A, B) als auch in Infektionen mit Wildtyp-HIV-1_{NL4-3} (Abb. 3.16 C), eine vergleichbare Wirkung für MP-03 und BJ486K (= synthetisches MP-03). Jedoch verschoben sich die IC₅₀-Werte gegenüber denen aus Experimenten mit MP-03, aus der ersten Aufreinigung, um etwa Faktor 100 von piko- zu mikromolaren Konzentrationen. Beide Substanzen zeigten keine zytotoxischen Effekte.

Das aus Pflanzen aufgereinigte MP-03 und das chemisch synthetisierte BJ486K wurden mit verschiedenen chemischen bzw. physikalischen Methoden hinsichtlich ihrer atomaren Zusammensetzung und Reinheit analysiert. Zum weiteren Vergleich wurde MP-03 und MP-04 aus der ersten Aufreinigung ebenfalls getestet. Während die Flavone aufgrund der Analyse mittels NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie als chemisch rein bezeichnet werden können, werden bei der Untersuchung durch ESI-Massenspektrometrie mehrere Peaks aufgezeichnet. Ein Peak im Massenspektrum von MP-04 bzw. MP-03 (beide aus der ersten Aufreinigung) entspricht der erwarteten molekularen Masse, die weiteren Peaks könnten Komplexe der Flavone mit bivalenten anorganischen Kationen oder Dimere bzw. Oligomere der Flavone darstellen. Das Ergebnis der NMR-Spektroskopie würde dem nicht widersprechen. Organische Verunreinigungen, z. B. Oxidationsprodukte, die weniger als 1% der Substanz ausmachen, was der Sensitivitätsgrenze der NMR-Spektroskopie entspricht, würden ebenso wie anorganische Moleküle nicht detektiert werden. Auch die antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide, die in *in vitro*-Studien nachgewiesen wurden (Hagerman 1998; Plumb, De Pascual-Teresa et al. 1998;

Ogawa 1999), sowie die oxidierenden Eigenschaften (Yang et al. 2001), lassen Raum für die beschriebenen Möglichkeiten.

Beide Charakteristika könnten zusätzlich dem Wirkmechanismus des anti-HIV-Effekts unterliegen. Oxidation von Flavonoiden kann zur Entstehung von Dimeren führen, die Polymerisierung kann über C-C-Verbindungen oder C-O-Bindungen erfolgen (Krishnamachari, Levine et al. 2004). Es wurde außerdem postuliert, dass die Oxidation von Polyphenolen durch zelluläre Oxidasen oder Peroxidasen in der Bildung von Dimeren als Endprodukten resultiert (Jimenez-Atienzar, Cabanes et al. 2004; Jimenez-Atienzar, Escribano et al. 2005). Eine wichtige Eigenschaft des antioxidativen Potentials von Flavonoiden besteht in der Fähigkeit, freie zweiwertige Kationen, wie Cu^{2+} - oder Fe^{2+} -Ionen, die entweder an sich prooxidativ wirken, oder oxidative Prozesse katalysieren bzw. auslösen können, zu chelatisieren, wodurch die Lipidperoxidation inhibiert wird. In verschiedenen *in vitro*- und auch einigen *in vivo*-Studien zeigten z. B. Catechin und Quercetin hohe Affinität, mit Kupfer- bzw. Eisenionen Chelat-Komplexe zu bilden, und sie auf diese Weise in ihrer Eigenschaft als Prooxidans unwirksam zu machen (Afanas'ev, Dorozhko et al. 1989; Kozluca, Olcay et al. 1996; Ferrali, Signorini et al. 1997; Cheng and Breen 2000; Mira, Fernandez et al. 2002).

Des Weiteren wurde die Beobachtung gemacht, dass MP-03 sowie MP-04, beides Aglykone, im Verlauf mehrerer Experimente und über die Zeit hinweg bis zu 100-fach an anti-HIV-Aktivität verloren haben (Daten nicht gezeigt). Dem Aktivitätsverlust könnte ein „Alterungsprozess“ durch Oxidation, beispielsweise ausgelöst durch mehrmaliges Auftauen der bei -20°C gelagerten Flavon-Lösung zu Grunde liegen. Im pflanzlichen Gewebe liegen die Flavonoide (mit Ausnahme der Flavanole) hauptsächlich glykosidisch gebunden vor (Harborne, 1994). Die Glykosylierung erhöht ihre Löslichkeit im Pflanzensaft und, möglicherweise in diesem Zusammenhang von Bedeutung, stabilisiert sie gegenüber Licht und enzymatischen Abbauvorgängen (Salunkhe 1990; Aherne and O'Brien 2002).

4.2.3 Die direkte Interaktion mit HIV-Partikeln und die Inhibierung der Fusion mit Zielzellen bestimmen die MP-03-Aktivität

Infektionsexperimente mit HIV-1-Luziferase-Reporterviren, die entweder vorab mit MP-03 behandelt wurden, oder zu MP-03-behandelten und nach der Inkubationszeit gewaschenen TZM-bl-Zellen gegeben wurden, gewährten erste mechanistische Einblicke. Voraussetzung für die HIV-inhibierende Wirkung war die Behandlung der Viruspartikel mit MP-03 (Abb. 3.17 B, C). Eine Interaktion von MP-03 mit einem zellulären Ziel konnte, aufgrund der ausgebliebenen Hemmung der Infektion nach der alleinigen Behandlung der Zellen, nahezu ausgeschlossen werden (Abb. 3.17 A). Mittels des Virionen-Fusionstests konnte die antivirale MP-03-Wirkung auf die HI-Viruspartikel einer direkten Inhibierung der Fusion der Virionen mit Zielzellen zugeschrieben werden. Die Hemmung des Fusionsereignisses wurde in einer inhibierten HIV-1-Replikation reflektiert (Abb. 3.17 D). Auch für Baicalin, ein Flavonoid, das aus *Scutellaria baicalensis* Georgi (Baikal-Helmkraut aus der Familie der Lamiaceae) isoliert wurde, konnte gezeigt werden, dass seine anti-HIV-Aktivität auf der Blockierung des Eintritts von HIV-1 in die Zielzellen basiert (Li, Fu et al. 2000).

Im Kontext von HIV-1-Infektionen wurden ohne die einstündige Vorinkubation der Viruspartikel mit MP-03, dem entsprechend durch die direkte Zugabe der MP-03-Virus-Suspension zu Zellen, vergleichbare antivirale Effekte erreicht (Abb. 3.17 B). Dies legt nahe, dass die Interaktion zwischen Flavon und Viruspartikel schnell stattfindet und die antivirale Wirkung sich rasch entfalten kann. Gegenüber an die Zelloberfläche absorbierten HIV-Partikeln war der hemmende Effekt des Flavons MP-03 reduziert - ein Hinweis darauf, dass nach der Bindung des Partikels die durch MP-03 verursachte Modifikation des Virions oder deren nachfolgende Funktion weniger effektiv ist.

Von der mechanistischen Seite her gesehen, ist außerdem interessant, dass MP-03 neben den Infektionen mit HIV-1 (X4- und R5-Hüllproteine) und auch die mit VSV-G-pseudotypisierten HI-Viren blockierte. Dies spricht dafür, dass die antivirale MP-03-Wirkung nicht spezifisch gegen die Virus-Hülle gerichtet ist, sondern sich eher unspezifisch entfaltet, was den Vorteil eines breiteren Wirkspektrums bietet. Eine ähnlich unspezifische Wirkung wurde für das Flavonoid Quercetin demonstriert, dass die Infektiosität von Herpes simplex-Virus Typ 1, Polio-Virus Typ 1 und Para-

influenza-Virus Typ 3 reduzierte (Kaul, Middleton et al. 1985). Beispielsweise im Zusammenhang mit der Entwicklung von topischen Mikrobiziden ist nicht nur die Inhibierung des Virus-Eintritts, sondern auch die Eigenschaft, unterschiedliche Virus-typen hemmen zu können, vorteilhaft. Interessant wäre, die Breite der antiviralen Aktivität in Infektionstests mit weiteren pathogenen Viren wie HSV zu untersuchen. Die Studien könnten die Basis für die Entwicklung einer neuen Substanzklasse im Bereich der viruziden topischen Mikrobizide liefern.

4.2.4 HIV-1-Infektion werden effektiv durch MP-03 enthaltende Fraktionen eines Lamiaceen-Extrakts inhibiert

Im Rahmen dieser Studie wurden mehrere Fraktionen, die durch Gelfiltration eines *Marrubium peregrinum*-Extrakts (Extraktion der Blüten und oberirdischen Pflanzenteile mit Dichlormethan) isoliert wurden, auf ihre anti-HIV-Aktivität untersucht. In den Fraktionen wurde neben weiteren phenolischen Verbindungen MP-03 identifiziert (Hennebelle 2007), dessen unterschiedlicher Gehalt pro Fraktion zur Charakterisierung dieser beitrug. Die Vorbehandlung von HIV-1-Viruspartikeln mit einigen Fraktionen resultierte in einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der Infektion von TZM-bl-Zielzellen (Abb. 3.19). Die stärksten Infektionshemmungen wurden durch die Virus-Vorinkubation mit den Fraktionen S3F3 ($IC_{50} = 0,27 \mu\text{g/ml}$) und S3F4 ($IC_{50} = 0,16 \mu\text{g/ml}$) erreicht (Abb. 3.20 A). Der MP-03-Anteil in S3F3 betrug 89,0% und in S3F4 83,1%. Die antivirale Aktivität dieser beiden Fraktionen war angesichts der hohen MP-03-Konzentration nicht unerwartet; die Wirkung des Flavons gegen HIV-1 wurde bereits in den vorherigen Kapiteln erörtert. Überraschend war jedoch, dass die inhibitorische Aktivität der Fraktionen, S3F3 und S3F4, die von BJ486K (= 100% MP-03, chemisch synthetisiert) übertraf. Ebenso unerwartet, lag etwa ein Faktor 30 bzw. 50 zwischen den IC_{50} -Werten von S3F3 bzw. S3F4 und der Fraktion S2F2 ($IC_{50} = 8 \mu\text{g/ml}$), deren MP-03-Anteil ca. 77,2% ausmachte. Zwei weitere Fraktionen, S1F3P und S2F3, mit hohem MP-03-Gehalt zeigten sich gegenüber Fraktionen mit geringeren MP-03-Anteilen in ihrer anti-HIV-Aktivität reduziert. Für sechs Fraktionen, darunter die potentesten Inhibitoren, S3F3 und S3F4, ergab sich dennoch eine gute Korrelation ($r^2 = 0,931$, Pearsons Korrelationsanalyse) zwischen MP-03-Gehalt und antiviraler Aktivität als IC_{50} -Wert

(Abb. 3.20 D). Die Schlussfolgerung, dass der Anteil des MP-03 der Fraktionen nicht das einzige Kriterium für die anti-HIV-Wirkung ist, liegt nahe. Theoretisch ist denkbar, dass eine andere organische Verbindung mit antiviraler Aktivität in den inhibitorisch wirksamen Fraktionen enthalten ist. Alternativ könnte MP-03 durch Oxidationsreaktionen vom monomeren Zustand in Di-, Tri- oder Oligomere übergegangen sein, die unterschiedliche antivirale Potenz besitzen könnten. Der Anteil der z. B. MP-03-Dimere oder -Trimere könnte sich in den verschiedenen Fraktionen unterscheiden, so dass nicht der MP-03-Anteil an sich, sondern die Menge an Dimeren, Trimeren usw. entscheidend für die Stärke der anti-HIV-Aktivität sein könnte. Wie bereits erläutert (4.2.2), können Oxidationen Oligomerisierungen von Flavonoidmolekülen induzieren (Krishnamachari, Levine et al. 2004). Es wäre möglich, dass oxidationsfördernde Stoffe in bestimmten Fraktionen diesen Prozess beschleunigen könnten und dies zu einer verstärkten antiviralen Aktivität der Gesamtfraktion beitragen würde.

Eine genaue Analyse der einzelnen Fraktionen mittels ESI-MS und/ oder NMR mit anschließender sorgfältiger Interpretation der erhaltenen Daten im Kontext ihrer anti-HIV-Aktivität könnte Aufschluss über die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen liefern (derzeit im Labor von Dr. E. Davioud-Charvet durchgeführt), was zum Verständnis beitragen könnte. Besonders eine vergleichende Analyse zwischen Fraktionen mit vergleichbaren MP-03-Anteilen, aber unterschiedlicher antiviraler Aktivität wäre in diesem Kontext interessant. Hier wird der interdisziplinäre Charakter der Studie deutlich, da chemische Struktur bzw. Zusammensetzung und biologische Aktivität der Fraktionen direkt zu verfolgen wären.

4.3 Untersuchung des Replikations- und Pathogenitätspotentials primärer HIV-1-Gruppe O-Isolate

Die HIV-1-Subtypen können sich in der Progression zu AIDS unterscheiden. Beispielsweise führt die Infektion mit Viren des Subtyps A im Vergleich zu Infektionen mit anderen Subtypen zu einer signifikant längeren AIDS-freien Phase (Kanki, Hamel et al. 1999). Verglichen mit den HIV-1-Gruppe M-Viren wurden erst wenige Studien mit Gruppe O-Viren durchgeführt. Die ersten Infektionen mit Gruppe O-Viren wurden auf die frühen sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts datiert (Jonassen, Stene-Johansen et al. 1997), 1990 wurden sie erstmals beschrieben (De Leys, Vanderborght et al. 1990).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten primäre HIV-1-Gruppe O-Isolate hinsichtlich ihres Replikations- und CD4⁺-T-Zelldepletionspotentials in einem *ex vivo* Tonsillen-Kultursystem sowie Einzel- und Multi-Donor-Pools von PBMCs im Vergleich mit HIV-1-Gruppe M-Isolaten und laboradaptierten Viren untersucht werden.

4.3.1 Verwendung der humanen lymphoiden Aggregationskultur

Das Originalmodell der *ex vivo* humanen Tonsillen-Histokultur, das aus kleinen Gewebeblöcken besteht, wurde als biologisch höchst relevantes Modellsystem für Studien der HIV-Infektion und -Pathogenese beschrieben (Glushakova, Baibakov et al. 1997). Im Vergleich zu anderen Systemen aus Kulturen oder Ko-Kulturen primärer Zellen besitzt die Tonsillen-Histokultur bestimmte Eigenschaften, die das Ergebnis und den Verlauf der HIV-Infektion maßgeblich beeinflussen können. Dieses Modellsystem erhält die komplexe dreidimensionale Zellorganisation, die in humanem Lymphgewebe vorliegt. Aufgrund dessen können die Zellen in ihrem natürlichen Zytokinmilieu kultiviert werden, und sind ohne exogene Stimulation für die HIV-1-Infektion suszeptibel, die sich über das gesamte Gewebe ausbreiten kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden dispergierte Kulturen des Tonsillengewebes als eine modifizierte Version des Originalmodells verwendet, die von Goldsmith und Kollegen (Eckstein, Penn et al. 2001; Kreisberg, Kwa et al. 2001; Jekle, Schramm et al. 2002) entwickelt wurde. Die so genannte HLAC (*human lymphoid aggregate culture*) erlaubt größere experimentelle Flexibilität. Bedeutsam ist, dass bislang keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Replikation, Infektion, Depletion und

Apoptose von CD4⁺-T-Zellen zwischen den beiden Modellen beobachtet wurden (Jekle, Keppler et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die HLAC aus Tonsillengewebe präpariert und mit X4- (NL4-3) und R5- (YU-2, 49.5) HIV-1-Virionen infiziert. Die p24CA-Werte, die zehn Tage nach der produktiven Infektion im Zellkulturüberstand gemessen wurden, decken sich gut mit publizierten Werten (Jekle, Keppler et al. 2003).

Zur weiteren Evaluation des Tonsillen-Kultursystems wurde die Depletion innerhalb der CD4⁺-T-Zellpopulation der infizierten Kulturen analysiert. In Übereinstimmung mit Penn et al. (1999) kam es nach der Infektion mit einem X4-Virus (NL4-3) zu starken CD4⁺-T-Zell-Verlusten, die nach Infektion mit R5-Viren (YU-2, 49.5) nur mäßig ausfielen. X4-HI-Viren induzieren apoptotische Prozesse insbesondere auch in nicht infizierten (*bystander*) CD4⁺-T-Zellen, während R5-Viren dieses Charakteristikum nicht aufweisen (Jekle, Keppler et al. 2003).

Zusammenfassend, konnten zentrale publizierte Merkmale der HIV-1-Infektion in der humanen lymphoiden Aggregationskultur nachvollzogen und für weiterführende Experimente genutzt werden.

4.3.2 HIV-1-Gruppe M-Viren weisen, im Gegensatz zu Gruppe O-Isolaten, große Variabilität in ihrem Replikationspotential auf

Das HI-Virus vom Typ 1 ist in die drei Gruppen M (*major*), O (*outlier*) und N (*new*) klassifiziert. Das Epizentrum der HIV-1-Gruppe O liegt in Kamerun sowie den benachbarten Staaten Gabun und Äquatorialguinea. Die in dieser Studie analysierten HI-Viren der Gruppe O stammten von Patienten aus Kamerun (Dittmar, Zekeng et al. 1999). Zum Zeitpunkt der Probenentnahme und Isolation der Viren war die HIV-1-Gruppe O für 3 bis 7% aller HIV-1-Infektionen in Kamerun verantwortlich (Gurtler, Hauser et al. 1994; Zekeng, Gurtler et al. 1994).

Neben der humanen Tonsillen-Histokultur stellen Kulturen primärer T-Zellen biologisch relevante Modellsysteme der HIV-1-Infektion dar, die im Rahmen dieser Studie parallel verwendet wurden. Die Fähigkeit eines Virus zur Replikation in PBMCs wird als dessen *ex vivo*-Fitness definiert (Quinones-Mateu, Ball et al. 2000; Arts and Quinones-Mateu 2003).

Die in dieser Arbeit analysierten Viren der HIV-1-Gruppen M und O replizierten sowohl in HLA-Kulturen als auch in Kulturen primärer T-Zellen. Die p24CA-Konzentration nach sieben bis elf Tagen Infektion betrug für das prototypische X4-Virus NL4-3 40 bis über 100 ng p24CA/ml, was im Konzentrationsbereich einer anderen Tonsillen-Histokultur-Studie liegt (140 ng p24CA/ml bei Jekle et al. 2003). Das R5-Virus JR-FL replizierte mit p24CA-Werten zwischen 60 und 100 ng/ml etwa ebenso produktiv. X4- und R5-Viren weisen ähnliche Replikationskinetiken und p24CA-Produktion am Endpunkt der Analysen sowohl in PBMCs als auch Tonsillen-Histokulturen auf (Penn, Grivel et al. 1999).

Der CCR5-Korezeptor, der für die Infektion mit R5-Viren obligat ist, wird auf nur circa 10 bis 30% der aktivierten CD4⁺-T-Zellen im Tonsillengewebe exprimiert (Bleul, Wu et al. 1997; Holm, Zhang et al. 2004). Dieser im Vergleich mit CXCR4-exprimierenden Zellen geringe Anteil an der CD4⁺-T-Zellpopulation würde nicht die Ähnlichkeit in der Replikationskinetik von X4-Viren und R5-Viren erklären. Es wurde demonstriert, dass jedoch nur etwa 50% des viralen *outputs* der R5-Viren von CD4⁺-T-Zellen stammt (Eckstein, Penn et al. 2001). Die Vermutung, dass die Kombination der Virus-Produktion von infizierten T-Zellen, Makrophagen und möglicherweise weiteren (nicht identifizierten) Zelltypen wie dendritischen Zellen eine Erklärung ist, liegt nahe. Makrophagen können dabei aufgrund der hohen Expression von CCR5, verglichen mit CXCR4, einen großen Beitrag zur Virus-Replikation für R5-Viren leisten (Grivel, Elliott et al. 2007).

Um das Replikationspotential der verschiedenen Viren besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Gesamt-Virusproduktion während der Infektion abgeschätzt. Zu diesem Zweck wurde das Integral der p24CA-Kinetik-Kurven (z. B. Abb. 3.22 A) jedes Virus¹, bezeichnet als AUC, errechnet. Bei der Gegenüberstellung (Mittelwerte der AUCs \pm SEM) von HIV-1-Gruppe O- und HIV-1-Gruppe-M-Primärisolaten wurde ersichtlich, dass die Mehrheit der Gruppe M-Isolate (in der HLAC: 1010 ± 155) stärker als die Gruppe O-Viren (in der HLAC: 435 ± 92) repliziert. Daraus ergibt sich zum Beispiel im Zellsystem der HLA-Kulturen ein Faktor von 2,3. Jedoch ist die Replikation einzelner Gruppe-O-Primärisolate nicht nur ebenso effizient wie die der Primärisolate der Gruppe M, sondern auch wie die laboradaptierter Viren. Diese Beobachtung steht in starkem Gegensatz zu publizierten Ergebnissen welche große Unterschiede in Bezug auf die relative Replikationsfähigkeit zwischen HIV-1-Gruppe M und Gruppe O, als auch HIV-2 propagieren

(Arien, Troyer et al. 2005): In Konkurrenzexperimenten, die in PBMCs durchgeführt wurden, erwiesen sich die sechs getesteten HIV-1-Gruppe O-Isolate mehr als 100-fach weniger fit als Primärisolate der Gruppe M. Die Fitness der von Arien und Kollegen untersuchten Viren wurde über das Replikationspotential eines Virus im direkten Vergleich mit einem weiteren Virus in einer PBMC-Kultur definiert, während im Rahmen dieser Arbeit einzelne Viren in einer Kultur replizieren konnten, ohne unmittelbar miteinander zu konkurrieren. Die verschiedenen experimentellen Systeme (Konkurrenz vs. Einzelreplikation) könnten eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen. Die extreme Reduktion wurde nicht nur für die Replikation in PBMCs, sondern auch bei der Transmission von dendritischen Zellen auf CD4⁺-T-Zellen beobachtet (Arien, Troyer et al. 2005). Die Frage nach der Transmissioneffizienz der verschiedenen Primärisolate *in vitro* wurde in der vorliegenden Arbeit nicht adressiert. Für das Replikationsverhalten konnte weder in Kulturen primärer T-Zellen noch in HLA-Kulturen im Rahmen der vorliegenden Studie mehr als ein Faktor 1,8 bis 2,8 zwischen den beiden HIV-1-Gruppen ermittelt werden.

Der Terminus „pathogene Fitness“ definiert, dass das HIV-Replikationspotential in PBMCs mit der Krankheitsprogression eines Patienten korreliert (Blaak, Brouwer et al. 1998; Blaak, van't Wout et al. 2000; Quinones-Mateu, Ball et al. 2000; Barbour, Hecht et al. 2004). Bislang gibt es keine definierten Erkenntnisse über die Pathogenese und die Progressionsrate zu AIDS in HIV-1-Gruppe O-infizierten Individuen (Janssens 1999). Jedoch wird unter anderem die Meinung vertreten, dass der durch HIV-1-Gruppe O-Isolate verursachte Krankheitsverlauf dem durch HIV-1-Gruppe M-Viren ausgelösten (Dittmar, Zekeng et al. 1999) gleicht, was auch durch das ähnliche Replikationspotential der beiden untersuchten HIV-1-Gruppen in *ex vivo* HLA-Kulturen und PBMC-Kulturen unterstützt würde.

Das absolute Replikationspotential eines Virus kann vom relativen unterschieden werden. In den durchgeführten Experimenten war das Replikationspotential der Primärisolate und auch der laboradaptierten HI-Viren relativ zueinander sowohl in Tonsillen-Histokulturen als auch T-Zellkulturen konstanter als deren absolute Fitness. In anderen Studien konnte ebenfalls eine hohe Vergleichbarkeit hinsichtlich der relativen Fitness einzelner HIV-Isolate in PBMCs von verschiedenen Donoren gezeigt werden (Quinones-Mateu, Ball et al. 2000; Ball, Abraha et al. 2003; Arien, Troyer et al. 2005). Auch in der Tonsillen-Histokultur variieren die absoluten Werte der Virusreplikation um das bis zu 30-fache zwischen den Geweben verschiedener

Donoren, während sich die „virale Hierarchie“ unter den jeweiligen Isolaten als relativ konstant erwies (Karlsson 2005). Die Bedeutung viraler Faktoren als Hauptdeterminante des relativen Replikationspotentials wird durch diese Daten unterstrichen, im Gegensatz dazu scheint das absolute Niveau der Replikation durch Donor-spezifische Faktoren beeinflusst zu werden.

Abschließend soll hervorgehoben werden, dass die experimentellen Daten, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, die publizierten ausgeprägten Unterschiede im Replikationspotential zwischen Primärisolaten der HIV-1-Gruppen M und O (>100-fach, Arien et al. 2005) nicht unterstützen, sondern im Gegenteil eher für ein ähnliches Replikationsverhalten sprechen.

4.3.3 Effiziente CD4⁺-T-Zell-Depletion in humanen Tonsillen-Histokulturen durch X4- und zwei R5-HI-Viren der Gruppe O

Kennzeichnend für die HIV-Infektion ist der progressive Verlust von CD4⁺-T-Zellen im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, damit korrelieren eine Erhöhung der Viruslast (Furtado, Kingsley et al. 1995) als auch vermehrte CD4⁺-T-Zell-Apoptose (Gougeon 1997). Der programmierte Zelltod stellt den Hauptmechanismus der CD4⁺-T-Zelldepletion dar, der über verschiedene Signalwege von HIV induziert werden kann. Betroffen sind nicht nur die HIV-infizierten Zellen, sondern auch die uninfizierten CD4⁺-T-Zellen (Carbonari, Cibati et al. 1995; Finkel, Tudor-Williams et al. 1995). Auf Infektionen mit X4-Viren folgt eine massive HIV-1-induzierte Apoptose von *bystander*-CD4⁺-T-Zellen, während als Konsequenz von R5-Infektionen nur wenige nicht-infizierte CD4⁺-T-Zellen sterben (Jekle, Keppler et al. 2003). Der Tod HIV-infizierter Zellen resultiert zum Einen aus deren Eigenschaft kurzlebige Synzytien zu bilden und zum Anderen auf der erhöhten Suszeptibilität für Apoptose. Nicht infizierte Zellen können durch mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen im Kontext einer HIV-Infektion getötet werden: entweder durch einen Fas-vermittelten Mechanismus während AICD (*activation-induced cell death*) oder aufgrund von HIV-Proteinen (Tat, gp120, Nef, Vpu), die von infizierten Zellen sezerniert werden und die Auslösung des programmierten Zelltodes stimulieren (Alimonti, Ball et al. 2003).

Der Grad der Depletion von CD4⁺-T-Zellen in *ex vivo* infiziertem humanen Tonsillengewebe korreliert mit der Krankheitsprogression *in vivo* (Karlsson et al.

2005). Somit bietet dieses Modellsystem eine Plattform von biologischer Relevanz zur Untersuchung des pathogenen Potentials, insbesondere der $CD4^+$ -T-Zell-depletion, der verschiedenen Primärisolate, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden sollen. Dies ist von Interesse, da über den durch HIV-1-Gruppe O-Isolate verursachten Krankheitsverlauf wenig bekannt ist. Auch innerhalb einer HIV-Gruppe kann die Dauer bis zur Progression zu AIDS nach Infektion mit verschiedenen Subtypen nicht generalisiert werden. Viren vom HIV-1-Subtyp D (Gruppe M) führen beispielsweise zu einer rascheren Krankheitsprogression als Viren der anderen Subtypen, besonders Infektionen mit Viren vom Subtyp A bleiben offensichtlich lange asymptomatisch (Baeten, Chohan et al. 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass X4-Viren das Verhältnis zwischen $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen stärker verändern als R5-Viren. Die Infektion mit X4-Viren resultierte in massiven Verlusten innerhalb der $CD4^+$ -T-Zell-Population (meist $> 75\%$), während im Verlauf von R5-Virus-Infektionen deutlich weniger ($\leq 25\%$) $CD4^+$ -T-Zellen depletiert wurden, was konsistent mit bereits publizierten Erkenntnissen ist (Jekle, Keppler et al. 2003). Es zeigte sich jedoch in Experimenten mit Tonsillen-Histokulturen vier verschiedener Donoren, dass das $CD4^+$ -T-Zell-Depletionspotential von zwei R5-HIV-1-Gruppe O-Primärisolaten, 2549 und 13740, keinem der anderen R5-Viren ähnelte, sondern im Gegenteil den X4-Viren glich. Die CCR5-Verwendung dieser Isolate wurde in phänotypischen Tests mit Korezeptor-Antagonisten klar bestätigt (3.3.5.). 2549 und 13740 induzierten eine Depletion von etwa 50 bis 75% der $CD4^+$ -T-Zellen. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu allem, was unserem Wissen nach bislang in diesem Zusammenhang über R5-Viren in HLH- und HLA-Kulturen veröffentlicht wurde.

Der HIV-Korezeptor CCR5 wird, wie bereits erwähnt, nur auf einem Teil der $CD4^+$ -T-Zellen exprimiert (ca. 15 - 30%), wohingegen der Chemokinrezeptor CXCR4 auf der großen Mehrheit (ca. 90%) desselben Zelltyps vorhanden ist (Holm et al. 2004; Bleul et al. 1997). Es wurde demonstriert, dass R5-Isolate fast ausschließlich aber effizient im $CCR5^+$ -Pool der $CD4^+$ -T-Zellen depletierten, während X4-Isolate und ein multitropes Virus eine profunde Depletion in beiden $CD4^+$ -T-Zell-Gruppen ($CCR5^+ CXCR4^+ CD4^+$ vs. $CCR5^- CXCR4^+ CD4^+$) verursachten (Schramm, Penn et al.). Dies implizierte, dass die unterschiedliche Expression von CXCR4 und CCR5 im lymphoiden Gewebe ein kritischer Faktor für das unterschiedlich ausgeprägte zytopathische Verhalten von R5- und X4-Viren ist.

Man könnte mutmaßen, dass die hohe Depletion von CD4⁺-T-Zellen durch die R5-Viren 2549 und 13740 aus der HIV-1-Gruppe O auf eine besonders starke CCR5-Expression auf den CD4⁺-T-Zellen der Tonsillen-Donoren zurückzuführen ist. Dies würde zu einer stärkeren Depletion durch fast alle R5-Viren führen, was in den durchgeführten Experimenten jedoch nicht zu beobachten war. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Infektion mit den beiden R5-HIV-1-Gruppe O-Viren in einer extrem effizienten Virusproduktion und damit einhergehend unter anderem einer starken Freisetzung viraler Proteine und Fas-L resultieren würde. Die HIV-1-Proteine Tat, gp120, Nef und Vpu können in nicht infizierten Zellen apoptotische Prozesse induzieren (Alimonti, Ball et al. 2003). Diese Hypothese wird aber aufgrund der im Vergleich zu anderen analysierten Viren eher geringen p24CA-Konzentration im Zellkulturüberstand, was insbesondere auf 2549 zutrifft, teilweise entkräftet. Denkbar wäre jedoch, dass die HIV-1-Proteine der beiden starken R5-HIV-1-CD4⁺-T-Zell-Depletierer, beispielsweise Env oder Tat, die im Verlauf der Infektion sezerniert werden, intrinsische Eigenschaften besitzen, die die zur Apoptose führende Signalkaskade in nicht-infizierten Zellen stärker aktivieren als andere Viren. Es wurde bereits gezeigt, dass R5-Viren Fas- und Caspase 8-abhängige Apoptose in nicht-infizierten T-Zellen induzieren können (Algeciras-Schimnich 2002).

Ursächlich für die ungewöhnlich effiziente CD4⁺-T-Zelldepletion könnte auch sein, dass sich in dem großen Pool von R5-Viren wenige aber infektiöse R5X4- oder X4-Viren, zum Beispiel unter den experimentellen Bedingungen bei der Infektion der HLA-Kulturen oder bereits als Quasispezies im Patienten, entwickelt haben. Der phänotypische Test zur Bestimmung der Korezeptor-Verwendung (3.3.5) lieferte keine Hinweise auf eine CXCR4-Verwendung der Viren nach der Expansion in PBMC-Kulturen. Ein möglicher Korezeptor-*switch* von CCR5- zu CXCR4-Verwendung im Verlauf der *ex vivo*-Infektion von humanem Tonsillengewebe könnte verfolgt werden, indem der Korezeptor-Gebrauch der Viren zu einem späten Zeitpunkt der Infektion nochmals überprüft werden würde.

Dittmar *et al.* vermuteten aufgrund der Tatsache, dass nur zwei der analysierten HIV-1-Gruppe O-Isolate CXCR4 als Korezeptor verwendeten, aber zehn Primärisolate von ARC (*AIDS related complex*)- und AIDS-Patienten stammten, dass der Ko-Rezeptor-*switch* zumindest bei Gruppe O-Infektionen weniger wichtig für den Krankheitsverlauf ist als zu diesem Zeitpunkt für Infektionen mit Gruppe M-Viren angenommen wurde (van't Wout et al. 1998). Die im Rahmen dieser Arbeit

gewonnenen Daten stützen diese Hypothese in der Hinsicht, dass die Infektion mit den untersuchten R5-HIV-1-Gruppe O-Viren in der Mehrheit zu stärkeren Verlusten in der CD4⁺-T-Zellpopulation führt als in die Tests einbezogene R5-Viren der HIV-1-Gruppe M.

Im Allgemeinen war zu beobachten, dass die Höhe der CD4⁺-T-Zelldepletion nicht mit der Effizienz der Replikation eines Virus korrelierte, auch nicht im Fall der stark depletierenden X4-Viren. Dies war allerdings an die Bedingung geknüpft, dass das HI-Virus im Tonsillen-Histokultur-System überhaupt im messbaren Bereich replizierte.

Zusammenfassend, im Rahmen dieser Pathogenitätsanalysen wurden zum ersten Mal R5-Viren entdeckt, die zu einer starken Depletionen innerhalb der CD4⁺-T-Zellpopulation in einem Ausmaß vergleichbar dem von X4-Viren, führen. Diese beiden R5-Viren, 2549 und 13740, gehören zur Gruppe O der HIV-Typ 1-Viren.

4.3.4 Diskrepanz phänotypischer und genotypischer Korezeptor-Gebrauch-Analysen bei HIV-1-Gruppe O-Primärisolaten

Im frühen klinischen Stadium der HIV-Infektion findet man vor allem R5-Viren, die im Verlauf der Erkrankung eine breite Korezeptor-Verwendung entwickeln können. Bei etwa 50% der HIV-infizierten Patienten tritt ein Korezeptor-*switch* von CCR5 zu CXCR4 ein (Scarlatti, Tresoldi et al. 1997).

Infektionen mit HI-Viren können *in vitro* mit Antagonisten der Chemokin-Rezeptoren inhibiert werden. AMD3100 fungiert als CXCR4-Antagonist (Esté 1999), wohingegen SCH-D die Interaktion zwischen CCR5-Rezeptor und HIV Env stört (Strizki, Tremblay et al. 2005). Zur Bestimmung des Korezeptor-Gebrauchs der analysierten Primärisolate der HIV-1-Gruppen O und M wurden TZM-bl-Zellen vor der Virus-Inokulation mit AMD3100 oder SCH-D vorbehandelt und anschließend die Infektionseffizienz untersucht. Viren, die in Gegenwart von AMD3100, zu einer der unbehandelten Kontrolle vergleichbaren Infektion der Zielzellen führten, wurden als R5 klassifiziert; Viren, deren Infektion durch SCH-D unbeeinflusst war, hingegen als X4. Durch diesen phänotypischen Test konnten sieben der neun analysierten Gruppe O-Isolate als R5-Viren, darunter 2549 und 13740, klassifiziert werden. Für 5 von 6 untersuchten R5-Viren, 13740 eingeschlossen, bestätigt diese Funktionsanalyse die

bereits publizierten Ergebnisse zur Korezeptor-Verwendung (Dittmar, Zekeng et al. 1999); In der Publikation von Dittmar und Kollegen wurde die CCR5-Verwendung für das Gruppe O-Isolat 13740 zusätzlich bestätigt, indem die Infektion von PBMCs und Makrophagen mit dem spezifischen CCR5-Liganden RANTES effizient gehemmt werden konnte.

Die Infektion mit zwei HIV-1-Gruppe O-Isolaten konnte in den durchgeführten Experimenten durch AMD3100 komplett inhibiert werden. Für 8161 stimmt dieses Ergebnis mit dem veröffentlichten CXCR4-Gebrauch überein, nicht jedoch für 2901 (Dittmar, Zekeng et al. 1999). Insgesamt konnte die Korezeptor-Verwendung also für sieben von acht publizierten HIV-1-Gruppe O-Primärisolaten bestätigt werden. Hervorzuheben ist besonders, dass die beiden stark CD4⁺-T-Zellen depletierenden Primärisolate, 2549 und 13740, durch die funktionellen Analysen eindeutig als R5-Viren klassifiziert werden konnten.

Das Ergebnis dieser phänotypischen Untersuchungen steht in starkem Gegensatz zu den Sequenz-basierten Analysen. Die genotypische Vorhersage zur Korezeptor-Verwendung, die mithilfe des Programms `geno2pheno[coreceptor]` (Sing, Low et al. 2007) getroffen wurde, stimmt nur für zwei von sechs analysierten HIV-1-Gruppe O-Viren mit den im Rahmen der Arbeit generierten Daten überein. Eine mögliche Erklärung liefert der Sequenz-Abgleich der V3-Region von HIV-1 gp120 des zu untersuchenden Virus mit dem Referenzvirus, auf welchem die genotypische Vorhersage hauptsächlich basiert. Als Referenz dient HXB2, ein HIV-1-Gruppe M-Virus. Die Nukleotid-Sequenz von HIV-1-Gruppe O-Viren ist nur zu etwa 65 Prozent homolog zu den anderen HIV-1-Gruppen (Gürtler et al. 1994), was eine klare Limitation beim Sequenzalignment zweier Nukleotidsequenzen birgt. Deutlich hilfreicher wäre eine Software-Entwicklung, die eine zusätzliche HIV-1-Gruppe O-Sequenz als spezifische Referenz nutzen würde.

Zu beachten ist bei der Interpretation der genotypischen Daten außerdem die Falsch-Positiv-Rate; diese ist definiert als die Wahrscheinlichkeit ein R5-Virus fälschlicherweise als X4-Virus zu klassifizieren. Je geringer diese Rate ist, desto sicherer ist die Vorhersage für den Korezeptor-Gebrauch. 2901 wurde als R5 klassifiziert, die Falsch-Positiv-Rate betrug jedoch 23,6%. Dieses Virus erwies sich in den funktionellen Tests klar als CXCR4-verwendend. Die Falsch-Positiv-Raten für drei weitere Viren, u. a. 13740, für die sich keine konsistenten Ergebnisse mit den beiden phänotypischen Testmethoden (Chemokin-Rezeptor-Antagonisten/ GHOST-

Zellen) ergaben, betragen bei der Klassifizierung als X4-Viren zwischen 0,4 und 1,7%. Trotz dieser sehr guten angegebenen Falsch-Positiv-Raten ist die Vorhersage der genotypischen Korezeptor-Gebrauch-Analyse nicht in Übereinstimmung mit der auf phänotypischen Analysen basierenden Klassifizierung, was die Notwendigkeit der Verbesserung dieses Software-Programms deutlich macht.

Insgesamt sind die Ergebnisse der funktionellen Tests unter Verwendung der Korezeptor-Antagonisten als aussagekräftiger einzuschätzen, insbesondere aufgrund der großen Sequenzunterschiede zwischen HIV-1-Gruppe O- und M-Viren, die sich bei der Anwendung bioinformatischer Sequenzvergleiche zur Korezeptor-Vorhersage als problematisch erweisen. Für 2549, eines der stark CD4⁺-T-Zellen depletierenden R5-Viren, war aufgrund zu weniger homologer Regionen in der Nukleotidsequenz keine Prognose möglich. Dies ist wahrscheinlich auf die zusätzlich hohe Diversität innerhalb der HIV-1-Gruppe O-Viren zurückzuführen (Tebit, Zekeng et al. 2004), die für einige Viren dieser Gruppe einen Sequenz-basierten Vergleich mit einem HIV-1-Gruppe M-Virus erlaubt, für andere aber nicht.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieses Projektes zwei, aufgrund phänotypischer Tests als R5 klassifizierte, Viren der HIV-1-Gruppe O identifiziert, die sich durch ein starkes CD4⁺-T-Zell-Depletionspotential in *ex vivo* HLA-Kulturen auszeichneten. Die R5-HIV-1-Gruppe O-Viren zeigten ein variables Depletionsvermögen kombiniert mit geringen Unterschieden im Replikationspotential. Im Gegensatz dazu, waren bei den HIV-1-Gruppe M-Viren wenig Variabilität im Depletionsvermögen jedoch große Unterschiede im Replikationsniveau zu beobachten.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Vorhersage bzw. Bestimmung des Korezeptor-Tropismus, die mit dem bioinformatischen Sequenzvergleich im Vergleich zu den funktionellen Tests erzielt wurden, verdeutlichen, dass für gesicherte sequenzbasierte Aussagen eine Erweiterung der Software-Programme um Nukleotidsequenzen weiterer HIV-1-Gruppen, eventuell auch Subtypen, wünschenswert wäre.

5. Referenzen

- Adachi, A., H. E. Gendelman, et al. (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.
- Afanas'ev, I. B., A. I. Dorozhko, et al. (1989). "Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation." *Biochem Pharmacol* **38**(11): 1763-9.
- Aherne, S. A. and N. M. O'Brien (2002). "Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism." *Nutrition* **18**(1): 75-81.
- Algeciras-Schimmich, A., S.R. Vlahakis, A. Villasis-Keever, T. Gomez, C.J. Heppelmann, G. Bou, C.V. Paya (2002). "CCR5 mediates Fas- and caspase-8 dependent apoptosis of both uninfected and HIV infected primary human CD4 T cells." *AIDS* **16**(11): 1467-78.
- Alimonti, J. B., T. B. Ball, et al. (2003). "Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS." *J Gen Virol* **84**(Pt 7): 1649-61.
- Alter, G., M. P. Martin, et al. (2007). "Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes." *J Exp Med* **204**(12): 3027-36.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17): 7915-22.
- Arien, K. K., R. M. Troyer, et al. (2005). "Replicative fitness of historical and recent HIV-1 isolates suggests HIV-1 attenuation over time." *Aids* **19**(15): 1555-64.
- Arora, A., M. G. Nair, et al. (1998). "Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system." *Arch Biochem Biophys* **356**(2): 133-41.
- Arora, A., M. G. Nair, et al. (1998). "Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system." *Free Radic Biol Med* **24**(9): 1355-63.
- Arts, E. J. and M. E. Quinones-Mateu (2003). "Sorting out the complexities of HIV-1 fitness." *Aids* **17**(5): 780-1.
- Baeten, J. M., B. Chohan, et al. (2007). "HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads." *J Infect Dis* **195**(8): 1177-80.
- Ball, S. C., A. Abraha, et al. (2003). "Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C." *J Virol* **77**(2): 1021-38.
- Balzarini, J. (2007). "Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy." *Nat Rev Microbiol* **5**(8): 583-97.
- Barbour, J. D., F. M. Hecht, et al. (2004). "Higher CD4+ T cell counts associated with low viral pol replication capacity among treatment-naive adults in early HIV-1 infection." *J Infect Dis* **190**(2): 251-6.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-71.
- Blaak, H., M. Brouwer, et al. (1998). "In vitro replication kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in relation to virus load in long-term survivors of HIV-1 infection." *J Infect Dis* **177**(3): 600-10.
- Blaak, H., A. B. van't Wout, et al. (2000). "In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1269-74.
- Bleul, C. C., L. Wu, et al. (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1925-30.
- Braaten, D., E. K. Franke, et al. (1996). "Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus SIV(CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses." *J Virol* **70**(7): 4220-7.
- Braaten, D. and J. Luban (2001). "Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells." *Embo J* **20**(6): 1300-9.
- Briggs, D. R., D. L. Tuttle, et al. (2000). "Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages)." *Aids* **14**(18): 2937-9.
- Briggs, J. A., K. Grunewald, et al. (2006). "The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions." *Structure* **14**(1): 15-20.

- Briggs, J. A., T. Wilk, et al. (2003). "Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores." *Embo J* **22**(7): 1707-15.
- Brown, J. E., H. Khodr, et al. (1998). "Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties." *Biochem J* **330** (Pt 3): 1173-8.
- Bukrinsky, M. (2004). "A hard way to the nucleus." *Mol Med* **10**(1-6): 1-5.
- Campbell, S., K. Gaus, et al. (2004). "The raft-promoting property of virion-associated cholesterol, but not the presence of virion-associated Brij 98 rafts, is a determinant of human immunodeficiency virus type 1 infectivity." *J Virol* **78**(19): 10556-65.
- Campbell, S. M., S. M. Crowe, et al. (2002). "Virion-associated cholesterol is critical for the maintenance of HIV-1 structure and infectivity." *Aids* **16**(17): 2253-61.
- Cao, G., E. Sofic, et al. (1997). "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships." *Free Radic Biol Med* **22**(5): 749-60.
- Carbonari, M., M. Cibati, et al. (1995). "Measurement of apoptotic cells in peripheral blood." *Cytometry* **22**(3): 161-7.
- Cavrois, M., C. De Noronha, et al. (2002). "A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes." *Nat Biotechnol* **20**(11): 1151-4.
- Cheng, I. F. and K. Breen (2000). "On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex." *Biometals* **13**(1): 77-83.
- Chesebro, B., J. Nishio, et al. (1991). "Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, and macrophages." *J Virol* **65**(11): 5782-9.
- Choe, H., M. Farzan, et al. (1996). "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates." *Cell* **85**(7): 1135-48.
- Chou, C. S., O. Ramilo, E.S. Vitetta (1997). "Highly purified CD25- resting T cells cannot be infected de novo with HIV-1." *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**(4): 1361-5.
- Clapham, P. R. and A. McKnight (2001). "HIV-1 receptors and cell tropism." *Br Med Bull* **58**: 43-59.
- Cotelle, N., J. L. Bernier, et al. (1996). "Antioxidant properties of hydroxy-flavones." *Free Radic Biol Med* **20**(1): 35-43.
- Daecke, J., O. T. Fackler, et al. (2005). "Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry." *J Virol* **79**(3): 1581-94.
- De Leys, R., B. Vanderborght, et al. (1990). "Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin." *J Virol* **64**(3): 1207-16.
- Descamps, D., G. Collin, et al. (1997). "Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses." *J Virol* **71**(11): 8893-8.
- Descamps, D., G. Collin, et al. (1995). "HIV-1 group O sensitivity to antiretroviral drugs." *Aids* **9**(8): 977-8.
- Dharmaratne, H. R., W. M. Wanigasekera, et al. (1998). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase activity by cordatolides isolated from *Calophyllum cordato-oblongum*." *Planta Med* **64**(5): 460-1.
- Dimitrova, Z., B. Dimov, et al. (1993). "Antiherpes effect of *Melissa officinalis* L. extracts." *Acta Microbiol Bulg* **29**: 65-72.
- Dittmar, M. T., L. Zekeng, et al. (1999). "Coreceptor requirements of primary HIV type 1 group O isolates from Cameroon." *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**(8): 707-12.
- Eckstein, D. A., M. L. Penn, et al. (2001). "HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues." *Immunity* **15**(4): 671-82.
- Esté, J. A., C. Cabrera, E. De Clercq, S. Struyf, J. Van Damme, G. Bridger, R.T. Skerlj, M.J. Abrams, G. Henson, A. Gutierrez, B. Clotet, D. Schols (1999). "Activity of different bicyclam derivatives against human immunodeficiency virus depends on their interaction with the CXCR4 chemokine receptor." *Mol Pharmacol*. **55**(1): 67-73.
- Fackler, O. T. and M. Geyer (2002). "Neue Strategien für die Bekämpfung von HIV: Der Aktivität des Nef-Proteins auf der Spur." *Biologie in unserer Zeit* **32**: 90-100.
- Ferrali, M., C. Signorini, et al. (1997). "Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity." *FEBS Lett* **416**(2): 123-9.
- Finkel, T. H., G. Tudor-Williams, et al. (1995). "Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes." *Nat Med* **1**(2): 129-34.
- Fischl, M. A., D. D. Richman, et al. (1987). "The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial." *N Engl J Med* **317**(4): 185-91.
- Freed, E. O. (2001). "HIV-1 replication." *Somat Cell Mol Genet* **26**: 13-33.

- Furtado, M. R., L. A. Kingsley, et al. (1995). "Changes in the viral mRNA expression pattern correlate with a rapid rate of CD4+ T-cell number decline in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals." *J Virol* **69**(4): 2092-2100.
- Galati, G. and P. J. O'Brien (2004). "Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties." *Free Radic Biol Med* **37**(3): 287-303.
- Ganser-Pornillos, B. K., M. Yeager, et al. (2008). "The structural biology of HIV assembly." *Curr Opin Struct Biol* **18**(2): 203-17.
- Garcia, J. V. and A. D. Miller (1991). "Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef." *Nature* **350**(6318): 508-11.
- Geuenich, S., C. Goffinet, S. Venzke, S. Nolkemper, I. Baumann, P. Plinkert, J. Reichling, O.T. Keppler (2008). "Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density. ." *Retrovirology* **5**(27).
- Glushakova, S., B. Baibakov, et al. (1997). "Experimental HIV infection of human lymphoid tissue: correlation of CD4+ T cell depletion and virus syncytium-inducing/non-syncytium-inducing phenotype in histocultures inoculated with laboratory strains and patient isolates of HIV type 1." *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**(6): 461-71.
- Goffinet, C., I. Allespach, et al. (2007). "HIV-susceptible transgenic rats allow rapid preclinical testing of antiviral compounds targeting virus entry or reverse transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(3): 1015-20.
- Goncalves, J., Y. Korin, et al. (1996). "Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription." *J Virol* **70**(12): 8701-9.
- Goodenow, M. M. and R. G. Collman (2006). "HIV-1 coreceptor preference is distinct from target cell tropism: a dual-parameter nomenclature to define viral phenotypes." *J Leukoc Biol* **80**(5): 965-72.
- Gougeon, M. L. (1997). "Programmed cell death in HIV infection: dysregulation of BCL-2 and Fas pathways and contribution to AIDS pathogenesis." *Psychoneuroendocrinology* **22 Suppl 1**: S33-9.
- Grinsztejn, B., B. Y. Nguyen, et al. (2007). "Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial." *Lancet* **369**(9569): 1261-9.
- Grivel, J. C., J. Elliott, et al. (2007). "HIV-1 pathogenesis differs in rectosigmoid and tonsillar tissues infected ex vivo with CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1." *Aids* **21**(10): 1263-72.
- Gurtler, L. G., P. H. Hauser, et al. (1994). "A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon." *J Virol* **68**(3): 1581-5.
- Hagerman (1998). "High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants." *J Agric Food Chem* **46**: 1887-92.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." *Phytochemistry* **55**(6): 481-504.
- Havsteen, B. H. (2002). "The biochemistry and medical significance of the flavonoids." *Pharmacol Ther* **96**(2-3): 67-202.
- He, J., Y. Chen, et al. (1997). "CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia." *Nature* **385**(6617): 645-9.
- He, J., S. Choe, et al. (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity." *J Virol* **69**(11): 6705-11.
- Heil, M. L., J. M. Decker, et al. (2004). "Determinants of human immunodeficiency virus type 1 baseline susceptibility to the fusion inhibitors enfuvirtide and T-649 reside outside the peptide interaction site." *J Virol* **78**(14): 7582-9.
- Hennebelle, B. (2007). "Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*." *Biochem Syst and Ecol* doi 10.1016/j.bse.2007.02.006.
- Hillier, S. L., T. Moench, et al. (2005). "In vitro and in vivo: the story of nonoxynol 9." *J Acquir Immune Defic Syndr* **39**(1): 1-8.
- Hohmann, J., I. Zupko, et al. (1999). "Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa Officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation." *Planta Med* **65**(6): 576-8.
- Holm, G. H., C. Zhang, et al. (2004). "Apoptosis of bystander T cells induced by human immunodeficiency virus type 1 with increased envelope/receptor affinity and coreceptor binding site exposure." *J Virol* **78**(9): 4541-51.
- Hu, C. Q., K. Chen, Q. Shi, R.E. Kilkuskie, Y.C. Cheng, K.H.Lee (1994). "Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids." *J Nat Prod* **57**(1): 42-51.

- Huang, W., S. H. Eshleman, et al. (2007). "Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations." *J Virol* **81**(15): 7885-93.
- Hwang, S. S., T. J. Boyle, et al. (1991). "Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1." *Science* **253**(5015): 71-4.
- Jaffe, H. W. and G. Schochetman (1998). "Group O human immunodeficiency virus-1 infections." *Infect Dis Clin North Am* **12**(1): 39-46.
- Janssens, W., J. Nkengasong, L. Heyndrickx, G. Van der Auwera, K. Vereecken, S. Coppens, B. Willems, E. Beirnaert, K. Fransen, M. Peeters, G. van der Groen (1999). "Inpatient variability of HIV type 1 group O ANT70 during a 10-year follow-up." *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**(15): 1325-32.
- Jekle, A., O. T. Keppler, et al. (2003). "In vivo evolution of human immunodeficiency virus type 1 toward increased pathogenicity through CXCR4-mediated killing of uninfected CD4 T cells." *J Virol* **77**(10): 5846-54.
- Jekle, A., B. Schramm, et al. (2002). "Coreceptor phenotype of natural human immunodeficiency virus with nef deleted evolves in vivo, leading to increased virulence." *J Virol* **76**(14): 6966-73.
- Jensen, M. A. and A. B. van 't Wout (2003). "Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis." *AIDS Rev* **5**(2): 104-12.
- Jiang, S., K. Lin, et al. (1993). "HIV-1 inhibition by a peptide." *Nature* **365**(6442): 113.
- Jimenez-Atienzar, M., J. Cabanes, et al. (2004). "Kinetic analysis of catechin oxidation by polyphenol oxidase at neutral pH." *Biochem Biophys Res Commun* **319**(3): 902-10.
- Jimenez-Atienzar, M., J. Escribano, et al. (2005). "Oxidation of the flavonoid eriodictyol by tyrosinase." *Plant Physiol Biochem* **43**(9): 866-73.
- Johnson, I. T. (2004). "New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract." *Mutat Res* **551**(1-2): 9-28.
- Jonassen, T. O., K. Stene-Johansen, et al. (1997). "Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s." *Virology* **231**(1): 43-7.
- Kandathil, A. J., S. Ramalingam, et al. (2005). "Molecular epidemiology of HIV." *Indian J Med Res* **121**(4): 333-44.
- Kanki, P. J., D. J. Hamel, et al. (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression." *J Infect Dis* **179**(1): 68-73.
- Karlsson, I., J.C. Grivel, S.S. Chen, A. Karlsson, J. Albert, E.M. Fenyö, L.B. Margolis (2005). "Differential pathogenesis of primary CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 isolates in ex vivo human lymphoid tissue." *J Virol* **79**(17): 11151-60.
- Kashman, Y., K.R. Gustafson, R.W. Fuller, J.B. McMahon, M.J. Currens, R.W. Jr Buckheit, S.H. Hughes, G.M. Cragg, M.R. Boyd (1992). "The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*." *J Med Chem.* **35**(15): 2735-43.
- Kaul, T. N., E. Middleton, Jr., et al. (1985). "Antiviral effect of flavonoids on human viruses." *J Med Virol* **15**(1): 71-9.
- Keele, B. F., F. Van Heuverswyn, et al. (2006). "Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1." *Science* **313**(5786): 523-6.
- Keller, M. J., M. E. Klotman, et al. (2003). "Development of topical microbicides for prevention of human immunodeficiency virus and herpes simplex virus." *Am J Reprod Immunol* **49**(5): 279-84.
- Keppler, O. T., N. Tibroni, et al. (2006). "Modulation of specific surface receptors and activation sensitization in primary resting CD4+ T lymphocytes by the Nef protein of HIV-1." *J Leukoc Biol* **79**(3): 616-27.
- Kim, H. K., H. K. Lee, et al. (1999). "HIV integrase inhibitory activity of *Agastache rugosa*." *Arch Pharm Res* **22**(5): 520-3.
- Kozluca, O., E. Olcay, et al. (1996). "Prevention of doxorubicin induced cardiotoxicity by catechin." *Cancer Lett* **99**(1): 1-6.
- Kreisberg, J. F., D. Kwa, et al. (2001). "Cytopathicity of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates depends on coreceptor usage and not patient disease status." *J Virol* **75**(18): 8842-7.
- Krishnamachari, V., L. H. Levine, et al. (2004). "In vitro flavon-3-ol oxidation mediated by a B ring hydroxylation pattern." *Chem Res Toxicol* **17**(6): 795-804.
- Kuhmann, S. E., E. J. Platt, et al. (2000). "Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **74**(15): 7005-15.
- Kuo, S. M., C.T. Huang, P. Blum, C. Chang (2001). "Quercetin cumulatively enhances copper induction of metallothionein in intestinal cells." *Biol Trace Elem Res.* **84**: 1-10.

- Lackritz, E. M., G. A. Satten, et al. (1995). "Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in the United States." *N Engl J Med* **333**(26): 1721-5.
- Larrando, J. V. (1995). "Antimicrobial activity of essences from labiates." *Microbios* **82**: 171-72.
- Layne, S. P., M. J. Merges, et al. (1990). "HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection." *Nature* **346**(6281): 277-9.
- Lederman, M. M., R. E. Offord, et al. (2006). "Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV." *Nat Rev Immunol* **6**(5): 371-82.
- Li, B. Q., T. Fu, et al. (2000). "Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry." *Biochem Biophys Res Commun* **276**(2): 534-8.
- Li, F., R. Goila-Gaur, et al. (2003). "PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13555-60.
- Li, Y., J. C. Kappes, et al. (1991). "Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 cloned directly from uncultured human brain tissue: identification of replication-competent and -defective viral genomes." *J Virol* **65**(8): 3973-85.
- Llano, M., D. T. Saenz, et al. (2006). "An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration." *Science* **314**(5798): 461-4.
- Loussert-Ajaka, I., M. L. Chaix, et al. (1995). "Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France." *J Virol* **69**(9): 5640-9.
- Low, A. J., W. Dong, et al. (2007). "Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates." *Aids* **21**(14): F17-24.
- Luciw, P. A. (1996). "Human immunodeficiency viruses and their replication." *Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. 2nd ed. New York: Raven Press: 1881-952.*
- Luo, C., P. Akwara, et al. (2007). "Global progress in PMTCT and paediatric HIV care and treatment in low- and middle-income countries in 2004-2005." *Reprod Health Matters* **15**(30): 179-89.
- Malkevitch, N., D. H. McDermott, et al. (2001). "Coreceptor choice and T cell depletion by R5, X4, and R5X4 HIV-1 variants in CCR5-deficient (CCR5delta32) and normal human lymphoid tissue." *Virology* **281**(2): 239-47.
- Margolis, L. B., S. Glushakova, et al. (1998). "Blockade of CC chemokine receptor 5 (CCR5)-tropic human immunodeficiency virus-1 replication in human lymphoid tissue by CC chemokines." *J Clin Invest* **101**(9): 1876-80.
- Markowitz, M., B. Y. Nguyen, et al. (2007). "Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 Integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study." *J Acquir Immune Defic Syndr* **46**(2): 125-33.
- Mazumder, A., N. Neamati, et al. (1997). "Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action." *J Med Chem* **40**(19): 3057-63.
- Mellors, J. W., J. B. Margolick, et al. (2007). "Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection." *Jama* **297**(21): 2349-50.
- Mellors, J. W., A. Munoz, et al. (1997). "Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection." *Ann Intern Med* **126**(12): 946-54.
- Michel, N., I. Allespach, et al. (2005). "The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4." *Curr Biol* **15**(8): 714-23.
- Michel, N., K. Ganter, et al. (2006). "The Nef protein of human immunodeficiency virus is a broad-spectrum modulator of chemokine receptor cell surface levels that acts independently of classical motifs for receptor endocytosis and Galpha signaling." *Mol Biol Cell* **17**(8): 3578-90.
- Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, et al. (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." *Pharmacol Rev* **52**(4): 673-751.
- Mira, L., M. T. Fernandez, et al. (2002). "Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity." *Free Radic Res* **36**(11): 1199-208.
- Mohrig, A. (1996). "Melissenextrakt bei Herpes simplex – die Alternative zu Nukleosid-Analoga." *Dt Apoth Zt* **136**: 109-114.
- Morel, I., G. Lescoat, P. Cogrel, O. Sergent, N. Padeloup, P. Brissot, P. Cillard, L. Cillard (1993). "Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures." *Biochem Pharmacol* **45**(1): 9-13.
- Munch, J., E. Rucker, et al. (2007). "Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection." *Cell* **131**(6): 1059-71.
- Munch, J., L. Standker, et al. (2007). "Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide." *Cell* **129**(2): 263-75.

- Muro, E., J. A. Droste, et al. (2005). "Nevirapine plasma concentrations are still detectable after more than 2 weeks in the majority of women receiving single-dose nevirapine: implications for intervention studies." *J Acquir Immune Defic Syndr* **39**(4): 419-21.
- Nagasawa, T., K. Tachibana, et al. (1998). "A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection." *Semin Immunol* **10**(3): 179-85.
- Neil, S. J., T. Zang, et al. (2008). "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu." *Nature* **451**(7177): 425-30.
- Neumann, T., I. Hagmann, et al. (2005). "T20-insensitive HIV-1 from naive patients exhibits high viral fitness in a novel dual-color competition assay on primary cells." *Virology* **333**(2): 251-62.
- Neurath, A. R., N. Strick, et al. (2005). "Punica granatum (pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide." *Ann N Y Acad Sci* **1056**: 311-27.
- Nolkemper, S., J. Reichling, et al. (2006). "Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro." *Planta Med* **72**(15): 1378-82.
- Northrop, J. P., K. S. Ullman, et al. (1993). "Characterization of the nuclear and cytoplasmic components of the lymphoid-specific nuclear factor of activated T cells (NF-AT) complex." *J Biol Chem* **268**(4): 2917-23.
- Ogawa (1999). "On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection." *Anal. Chim. Acta* **383**: 221-30.
- Ostrowski, M. A., T.W. Chun TW, S.J. Justement, I. Motola, M.A. Spinelli, J. Adelsberger, L.A. Ehler, S.B. Mizell, C.W. Hallahan, A.S. Fauci (1999). "Both memory and CD45RA+/CD62L+ naive CD4(+) T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals." *J Virol* **73**(8): 6430-5.
- Ottmann, M., C. Gabus, et al. (1995). "The central globular domain of the nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus type 1 is critical for virion structure and infectivity." *J Virol* **69**(3): 1778-84.
- Pantaleo, G., J. F. Demarest, et al. (1994). "Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV." *Nature* **370**(6489): 463-7.
- Penn, M. L., J. C. Grivel, et al. (1999). "CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD4+ T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2): 663-8.
- Philpott, S. M. (2003). "HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression." *Curr HIV Res* **1**(2): 217-27.
- Pierson, T. C., R. W. Doms, et al. (2004). "Prospects of HIV-1 entry inhibitors as novel therapeutics." *Rev Med Virol* **14**(4): 255-70.
- Plumb, G. W., S. De Pascual-Teresa, et al. (1998). "Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation." *Free Radic Res* **29**(4): 351-8.
- Pollard, V. W. and M. H. Malim (1998). "The HIV-1 Rev protein." *Annu Rev Microbiol* **52**: 491-532.
- Popovic, M., M. G. Sarngadharan, et al. (1984). "Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS." *Science* **224**(4648): 497-500.
- Quinones-Mateu, M. E., J. L. Albright, et al. (1998). "Analysis of pol gene heterogeneity, viral quasispecies, and drug resistance in individuals infected with group O strains of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **72**(11): 9002-15.
- Quinones-Mateu, M. E., S. C. Ball, et al. (2000). "A dual infection/competition assay shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression." *J Virol* **74**(19): 9222-33.
- Quinones-Mateu, M. E., V. Soriano, et al. (1997). "Characterization of the reverse transcriptase of a human immunodeficiency virus type 1 group O isolate." *Virology* **236**(2): 364-73.
- Rana, S., G. Besson, et al. (1997). "Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation." *J Virol* **71**(4): 3219-27.
- Resch, W., N. Hoffman, et al. (2001). "Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks." *Virology* **288**(1): 51-62.
- Reutrakul, V., N. Ningnuek, et al. (2007). "Anti HIV-1 flavonoid glycosides from *Ochna integerrima*." *Planta Med* **73**(7): 683-8.
- Ribeiro, M. A. (2001). "Melissa officinalis L.: study of antioxidant activity in supercritical residues." *Journal of Supercritical Fluids* **21**: 51-60.

- Salunkhe, D. K. (1990). "Dietary tannins: consequences and remedies." CRC Press, Inc., Florida 469-82.
- Scarlatti, G., E. Tresoldi, et al. (1997). "In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression." Nat Med **3**(11): 1259-65.
- Schindler, M., J. Munch, et al. (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.
- Schramm, B., M. L. Penn, et al. (2000). "Cytotoxicity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in human lymphoid tissue is coreceptor dependent and comparable to that of HIV-1." J Virol **74**(20): 9594-600.
- Schwartz, O., V. Marechal, et al. (1996). "Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein." Nat Med **2**(3): 338-42.
- Shattock, R. J. and J. P. Moore (2003). "Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection." Nat Rev Microbiol **1**(1): 25-34.
- Sherman, M. P., C. M. de Noronha, et al. (2001). "Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr." J Virol **75**(3): 1522-32.
- Sing, T., A. J. Low, et al. (2007). "Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates." Antivir Ther **12**(7): 1097-106.
- Smith, S. D., M. Shatsky, et al. (1984). "Monoclonal antibody and enzymatic profiles of human malignant T-lymphoid cells and derived cell lines." Cancer Res **44**(12 Pt 1): 5657-60.
- Sodroski, J., W. C. Goh, et al. (1986). "Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with sor gene deletions." Science **231**(4745): 1549-53.
- Stevenson, M., S. Haggerty, C. Lamonica, A.M. Mann, C. Meier, A. Wasiak (1990). "Cloning and characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants diminished in the ability to induce syncytium-independent cytolysis." J Virol **64**(8): 3792-803.
- Stove, V., I. Van de Walle, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alphabeta." J Virol **79**(17): 11422-33.
- Strebel, K. (2003). "Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev." Aids **17** **Suppl 4**: S25-34.
- Strebel, K., D. Daugherty, et al. (1987). "The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity." Nature **328**(6132): 728-30.
- Strizki, J. M., C. Tremblay, et al. (2005). "Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1." Antimicrob Agents Chemother **49**(12): 4911-9.
- Tachibana, K., S. Hirota, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature **393**(6685): 591-4.
- Tebit, D. M., L. Zekeng, et al. (2004). "Construction and characterization of an HIV-1 group O infectious molecular clone and analysis of vpr- and nef-negative derivatives." Virology **326**(2): 329-39.
- Vallejo, A., A. Heredia, et al. (1998). "Tropism, coreceptor use, and phylogenetic analysis of both the V3 loop and the protease gene of three novel HIV-1 group O isolates." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **18**(5): 417-25.
- van Acker, S. A., G.P. van Balen, D.J. van den Berg, A. Bast, W.J. van der Vijgh (1998). "Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids." Biochem Pharmacol **56**(8): 935-43.
- Van Damme, L., G. Ramjee, et al. (2002). "Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial." Lancet **360**(9338): 971-7.
- Vanden Haesevelde, M., J. L. Decourt, et al. (1994). "Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate." J Virol **68**(3): 1586-96.
- Venzke, S., N. Michel, et al. (2006). "Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection." J Virol **80**(22): 11141-52.
- Vlietinck, A. J., T. De Bruyne, et al. (1998). "Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection." Planta Med **64**(2): 97-109.
- Watanabe, M. (2000). "HIV-1 Reverse Transcriptase-Inhibitory Compound in *Salvia officinalis*." Food Sci Technol Res **6**(3): 216-20.
- Wei, X., J. M. Decker, et al. (2002). "Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy." Antimicrob Agents Chemother **46**(6): 1896-905.
- Wieggers, K. and H. G. Krausslich (2002). "Differential dependence of the infectivity of HIV-1 group O isolates on the cellular protein cyclophilin A." Virology **294**(2): 289-95.

- Wild, C. T., D. C. Shugars, et al. (1994). "Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9770-4.
- Wöbling, R. H., K. Leonhardt (1994). "Local Therapy of Herpes Simplex with Dried Extract from *Melissa officinalis*." Phytomedicine **1**: 25-31.
- Wu, H., E. Connick, D.R. Kuritzkes, A. Landay, J. Spritzler, B. Zhang, G.T. Spear, H. Kessler, M.M. Lederman (2001). "Multiple CD4+ cell kinetic patterns and their relationships with baseline factors and virological responses in HIV type 1 patients receiving highly active antiretroviral therapy." AIDS Res Hum Retroviruses. **17**(13): 1231-40.
- Yamasaki, K., M. Nakano, et al. (1998). "Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae." Biol Pharm Bull **21**(8): 829-33.
- Yang, B., A. Kotani, K. Arai, F. Kusu (2001). "Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials." Anal Sci. **17**(5): 599-694.
- Zaidu (1998). "Free flavonoid aglycones from leaves of *Mentha pulegium* and *Mentha suaveolens* (Labiatae)." Phytochemistry **48**(6): 991-94.
- Zekeng, L., L. Gurtler, et al. (1994). "Prevalence of HIV-1 subtype O infection in Cameroon: preliminary results." Aids **8**(11): 1626-8.
- Zou, Y. R., A. H. Kottmann, et al. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-9.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| ACID | <i>Activation-induced cell death</i> |
| AIDS | <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> |
| APC | Allophycocyanin |
| APOBEC | <i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide</i> |
| ARC | <i>AIDS-related complex</i> |
| AZT | Azidothymidin |
| BlaM | β -Laktamase |
| °C | Grad Celsius |
| CA | Capsidprotein |
| CC ₅₀ | Zytotoxische Konzentration 50% |
| ConA | Concavalin A |
| dd | Doppelt destilliert |
| dest. | Destilliert |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Nukleosidtriphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| eGFP | <i>Enhanced green fluorescent protein</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| Env | <i>Envelope</i> |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> |
| FACS | <i>Fluorescent activated cell sorting</i> |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FIV | <i>Feline immunodeficiency virus</i> |
| FKS | Fötale Kälberserum |
| FSC | <i>Forward Scatter</i> |
| Gag | Gruppenspezifisches Antigen |
| GFP | <i>Green fluorescent protein</i> |
| gp | Glykoprotein |
| HAART | <i>Highly active antiretroviral therapy</i> |
| HIV-1 | <i>Human immunodeficiency virus type 1</i> |
| IC ₅₀ | Inhibitorische Konzentration 50% |
| IL-2 | Interleukin-2 |
| IN | Integrase |
| IRES | <i>internal ribosomal entry side</i> |
| LTR | <i>Long terminal repeat</i> |
| M | <i>main</i> |
| MA | Matrixprotein |
| MDM | <i>Monocyte-derived macrophage</i> |
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| MoMLV | <i>Moloney murine leukemia virus</i> |
| mRNS | <i>Messenger RNS</i> |
| MW | Mittelwert |
| N | <i>new</i> |
| NC | Nukleocapsid |

| | |
|------------|--|
| Nef | <i>Negative factor</i> |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance</i> |
| NNRTI | <i>Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor</i> |
| NRTI | <i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i> |
| O | <i>outlier</i> |
| p.i. | <i>post infection</i> |
| p24CA | <i>Capsidprotein 24</i> |
| PBMC | <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PFA | <i>Paraformaldehyd</i> |
| PHA | <i>Phytohämagglutinin</i> |
| PI | <i>Protease inhibitor</i> |
| PIC | <i>Preintegration complex</i> |
| Pol | <i>Polymerase</i> |
| PR | <i>Protease</i> |
| Rev | <i>Regulator of expression of virion proteins</i> |
| RNS | <i>Ribonukleinsäure</i> |
| RRE | <i>Rev responsive element</i> |
| rRNS | <i>Ribosomale RNS</i> |
| RT | <i>Reverse Transkriptase/ Raumtemperatur</i> |
| RTC | <i>Reverse Transcriptase complex</i> |
| SEVI | <i>Semen-derived enhancer of virus infection</i> |
| SIV | <i>Simian immunodeficiency virus</i> |
| SSC | <i>Sideward Scatter</i> |
| TAR | <i>Transactivation region</i> |
| Tat | <i>Transactivator of transcription</i> |
| Tb | <i>Tuberkulose</i> |
| Vif | <i>Virion infectivity factor</i> |
| Vpr | <i>Viral protein r</i> |
| Vpu | <i>Viral protein u</i> |
| V-Schleife | <i>Variable Schleife</i> |
| VSV-G | <i>vesicular stomatitis virus glycoprotein</i> |
| wt | <i>wildtype</i> |